



In questo numero:

Analisi quantitativa di geni funzionali in campioni ambientali mediante PCR quantitativa (qPCR) **2**

Quantificazione diretta, mediante citometria a flusso, delle cellule batteriche in acque reflue e fanghi attivi degli impianti di depurazione **10**

Sviluppi applicativi della citometria a flusso nelle pratiche di monitoraggio delle acque **18**

Circuito di qualificazione per il riconoscimento microscopico su base morfologica dei batteri filamentosi del fango attivo: risultati dei quattro circuiti effettuati **21**

News:

Bonifica ex situ di suoli contaminati mediante polimeri assorbenti e loro successiva rigenerazione in reattori a doppia fase (Tesi di Dottorato) **24**

Distribuzione e valutazione del rischio di composti perfluorurati in bacini fluviali italiani (Tesi di Dottorato) **28**

Il Progetto EU PERSEUS e la Marine Strategy. La pressione antropica e lo stato di qualità dell'ambiente costiero del Mare Adriatico. **32**

Corso Internazionale Di Specializzazione "Controllo e Gestione Del Processo a Fanghi Attivi Tramite Metodi Microbiologici Palermo **37**

Editoriale

In questo secondo numero del Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA News, nuova veste del Notiziario dei Metodi Analitici, vengono presentati nella prima sezione metodi, sviluppi applicativi e risultati sperimentali nel campo biologico. È opportuno sottolineare che l'evoluzione dei metodi analitici per le varie matrici ambientali ha comportato un significativo aumento delle procedure di tipo biologico. Questo trova anche riscontro in questa nuova veste del Notiziario dei Metodi Analitici. In particolare, in questo numero vi sono due contributi relativi all'impiego della citometria a flusso, una tecnica multi-parametrica e automatizzabile, per la quantificazione delle cellule batteriche vive e morte sia in reflui che nei fanghi attivi. Viene inoltre presentato un articolo dedicato all'impiego della PCR per l'analisi quantitativa di geni funzionali in campioni ambientali. La prima sezione si completa con la presentazione dei risultati di quattro Circuiti di Qualificazione per la caratterizzazione microscopica del fango attivo ed il riconoscimento dei batteri filamentosi su base morfologica.

Nella seconda sezione (News) trovano spazio la presentazione di un progetto di ricerca (PERSEUS), finanziato dalla Comunità Europea, dedicato allo studio della pressione antropica ed dello stato di qualità dell'ambiente costiero del Mare Adriatico, e la presentazione di due tesi di dottorato svolte all'interno dell'Istituto.

Infine, abbiamo il piacere di segnalare il 26° Corso Internazionale di Specializzazione "CONTROLLO E GESTIONE DEL PROCESSO A FANGHI ATTIVI TRAMITE METODI MICROBIOLOGICI" che si terrà presso l'Università degli Studi di Palermo dal 27 Giugno al 1° Luglio. Il corso internazionale è organizzato dal CNR-IRSA in collaborazione con il DICAAM dell'Università di Palermo e l'Associazione Biologi della Provincia di Palermo. Il Corso questo anno attribuisce Crediti Formativi sia ECM (21 e 27 Crediti per ciascuno dei due Moduli) che CFP (per Ingegneri, Chimici e Biologi operanti nel comparto Ambientale). Il Corso Internazionale, con traduzione simultanea, pur mantenendo la sua struttura originale, presenta quest'anno nuovi Docenti e tematiche, come ad esempio quella sugli odori nei sistemi di trattamento a fanghi attivi (informazioni del corso su www.unipa.it/26aspmico o sul sito web dell'IRSA: www.irsa.cnr.it).

Giuseppe Mascolo
Direttore del Notiziario

Analisi quantitativa di geni funzionali in campioni ambientali mediante PCR quantitativa (qPCR)

a cura di

Bruna Maturro, Maria Laura Luprano, Caterina Levantesi, Simona Rossetti (*), *Istituto di Ricerca sulle Acque – CNR, Montelibretti (RM)*

RIASSUNTO

La Real Time PCR (qPCR) è una metodologia ampiamente utilizzata per l'analisi quantitativa di specifiche sequenze di DNA in campioni ambientali. Rispetto ai metodi colturali, la tecnica permette di rilevare geni e microrganismi di interesse in modo specifico e rapido dopo una fase preliminare di estrazione degli acidi nucleici dal campione in esame. Il principio di funzionamento ed il protocollo del metodo sono qui descritti insieme alla disamina dei principali vantaggi e limitazioni del saggio qPCR rispetto alle metodologie tradizionali coltivazione-dipendenti. Sono inoltre illustrati due casi di applicazione del metodo per la quantificazione in campioni ambientali di geni funzionali quali i geni di resistenza agli antibiotici e alcuni biomarcatori coinvolti in processi di biodegradazione di contaminanti tossici.

SUMMARY

Real Time PCR (qPCR) is widely used for the quantitative analysis of specific DNA sequences in environmental samples. Compared to culture methods, the technique allows the specific and rapid detection of genes and microorganisms of interest after the preliminary extraction of nucleic acids from the sample. The principle and the protocol of the method are hereinafter detailed along with the description of the main advantages and limitations of the assay compared to traditional cultivation-based methods. Examples of the method application for the quantification of functional genes such as antibiotic resistance genes and biomarkers involved in the biodegradation of toxic contaminants are also reported and critically discussed

1. INTRODUZIONE

La Real Time PCR o PCR quantitativa (qPCR) è un metodo biomolecolare coltura-indipendente che consente il rilevamento e la quantificazione di specifiche sequenze di DNA in campioni ambientali. Grazie alle sue potenzialità è ampiamente utilizzata per il monitoraggio di geni e microrganismi di interesse per la salvaguardia della salute negli studi di igiene ambientale e in generale di specifici biomarcatori nell'ambito di attività di risanamento ambientale (Girones et al., 2010, Smith and Osborne, 2009). L'applicazione della qPCR per analisi ambientali consente di superare molti dei limiti notoriamente associati alle metodologie di analisi tradizionali: non richiede infatti la crescita dei microrganismi e ciò riduce sensibilmente i tempi necessari per l'analisi che include anche la quantificazione della frazione vitale non coltivabile (VBNCs) (Jofre and Blanch 2010). Per queste ragioni, nel corso degli ultimi anni la qPCR è stata proposta e applicata con successo per il monitoraggio della qualità microbiologica delle acque. La disponibilità di protocolli, i limiti e i vantaggi legati all'impiego dei saggi di qPCR per il monitoraggio, ad esempio, di agenti patogeni e biomarcatori di contaminazione, sono stati ampiamente discussi e documentati nella letteratura scientifica (Girones et al., 2010).

In generale, sono stati definiti saggi di qPCR per virus, batteri e protozoi patogeni con limiti di rilevazione stimati pari a 10^3 - 10^4 CFU o cellule 100 mL^{-1}

(Ramírez-Castillo et al., 2013). Nelle acque pulite, come l'acqua potabile, la qPCR può raggiungere limiti di rilevabilità pari a 10^2 batteri L^{-1} con una semplice fase preliminare di concentrazione del campione su filtro. Per l'analisi di specifici geni funzionali in campioni ambientali è stato recentemente indicato un limite di rilevabilità pari a 10^3 cellule mL^{-1} mediante comparazione diretta con tecniche tradizionali di quantificazione cellulare (Fig. 1, Maturro et al., 2013).

Sono già disponibili in commercio kit pronti per il monitoraggio della qualità dell'acqua e in generale l'utilizzo di tale metodologia è approvato dalle agenzie nazionali e internazionali per l'individuazione e la quantificazione di specifici target presenti in campioni di acqua. Tuttavia, tale metodologia è caratterizzata da alcune limitazioni il cui superamento è oggetto di una intensa attività di ricerca finalizzata all'ottimizzazione dei protocolli di qPCR per incrementare le sue potenzialità applicative.

Tradizionalmente la qPCR è in grado di rilevare un solo target per reazione e quindi la simultanea quantificazione di molteplici specie microbiche o geni funzionali può richiedere molto tempo e manodopera. Tuttavia, per alcune specifiche applicazioni, sono attualmente a disposizione saggi qPCR Multiplex, che utilizzano sonde TaqMan marcate con differenti fluorofori, sviluppati per la determinazione e la quantificazione dei target multipli in una singola reazione con una significativa riduzione dei tempi di analisi e di materiale di consumo.

* rossetti@irsa.cnr.it

Non vi è dubbio che i metodi di rilevamento basati sull'utilizzo della PCR siano rapidi e specifici, tuttavia l'uso di questi metodi può essere limitato nelle analisi ambientali a causa della qualità del campione che può negativamente ridurre la sensibilità e l'affidabilità del metodo.

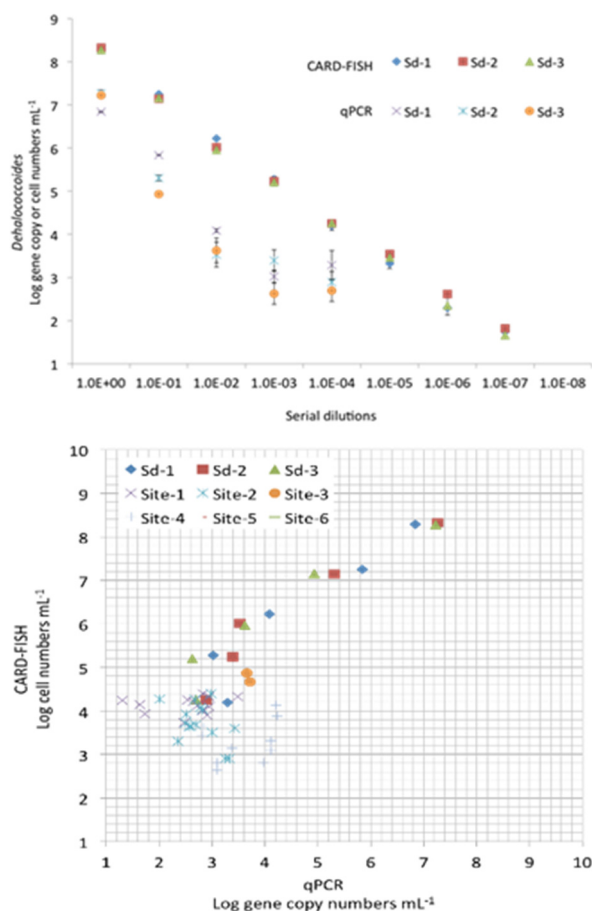


Figura 1. Limite di rilevabilità della qPCR per l’analisi di specifici geni funzionali stimato sia in colture in scala di laboratorio (a) che in campioni ambientali (b) mediante comparazione diretta con tecniche tradizionali di quantificazione cellulare (ad es. CARD-FISH).

Gli enzimi DNA polimerasi possono infatti essere inibiti da sostanze presenti nella matrice acquosa che si concentrano insieme con il DNA durante le fasi di processamento del campione (Girones et al., 2013). Nonostante gli sviluppi ulteriori della qPCR e delle metodiche di PCR semi-quantitative in grado di amplificare direttamente dal campione senza la necessità di estrazione del DNA, la presenza di inibitori rappresenta ancora una limitazione rilevante nell'analisi di campioni ambientali. Ciò non consente pertanto di sfruttare appieno le potenzialità applicative e la validità di tale metodologia per l'analisi di campioni prelevati da matrici ambientali complesse.

2. PRINCIPIO DEL METODO

La qPCR è una tecnica quantitativa di amplificazione genica che si basa sul principio della PCR tradizionale la quale, a differenza della prima, fornisce solo informazioni qualitative

2.1 PCR

Una reazione di PCR, mediante l’azione dell’enzima Taq polimerasi, consente di ottenere fino a milioni di copie di una sequenza del gene di interesse partendo da quantità molto ridotta di DNA genomico iniziale. Per amplificare un gene di interesse, oltre al DNA di partenza, sono richieste corte sequenze oligonucleotidiche di circa 20 paia di basi (primer forward e primer reverse) che fungono da innesco per la polimerizzazione e che sono dunque complementari alle regioni 3’ terminale e 5’ terminale della porzione di gene da amplificare. Inoltre, affinché la polimerizzazione possa generare una nuova copia del gene, sono necessari i desossiribonucleotidi (dNTPs), ossia le singole basi nucleotidiche incorporate dalla DNA polimerasi durante la fase di estensione dei primers.

La reazione di amplificazione genica (PCR) si svolge nelle seguenti fasi:

1. Denaturazione: la doppia elica di DNA viene denaturata a 94 – 96 °C per ottenere due filamenti a singola elica.
2. Appaiamento: gli inneschi oligonucleotidici (primers) si legano ognuno alle due estremità del singolo filamento di DNA bersaglio. In questa fase è molto importante selezionare la migliore temperatura che assicuri un legame specifico dei primers al DNA e che assicuri dunque un’amplificazione efficiente. La temperatura usata in questa fase è detta di annealing (T_a) ed è correlata alla temperatura di melting (T_m), quest’ultima strettamente dipendente dalla composizione in nucleotidi dei primers forward e reverse secondo la formula: T_m = 2 (A+T) + 4 (G+C). La T_a da adottare è di circa 5 °C inferiore alla T_m, calcolata dunque in base alla lunghezza e alla sequenza dei primers. Generalmente un’elevata T_a assicura una buona specificità di reazione, evitando l’amplificazione di sequenze aspecifiche. Le T_a sono comprese tra 50-70 °C, a seconda della composizione in basi delle sequenze da amplificare e dalla specificità di amplificazione desiderata.

3. Estensione: la Taq Polimerasi estende gli inneschi in direzione 5’ → 3’ su ognuno dei due singoli filamenti, aggiungendo i dNTPs al 3’-OH del nucleotide precedente. La temperatura in questa fase può variare da 68 a 72 °C.

I cicli di amplificazione (n) si ripetono fino ad un massimo di 40 volte per ottenere i prodotti (P) di PCR che aumentano in modo esponenziale rispetto al numero di copie di partenza (template, T). La resa teorica di una reazione di PCR è di 2ⁿ e i prodotti ottenuti si possono calcolare come P = (2ⁿ) T. Pertanto al primo ciclo di amplificazione, una singola molecola di DNA si denatura in due singoli filamenti ognuno dei quali funge da stampo per la sintesi della nuova elica, ottenendo così 2 doppie eliche al termine del ciclo. Ognuna di queste 2 nuove eliche a doppio filamento si denatura a sua volta, e i cicli di amplificazione vengono ripetuti fino alla sintesi di 4 nuove molecole di DNA a doppio filamento, procedendo dunque alla sintesi di nuove molecole di DNA a doppio filamento che aumentano in maniera esponenziale (Fig. 2). La PCR qualitativa ha visto la sua evoluzione con lo sviluppo della qPCR, una tecnica che consente di quantificare in tempo reale il numero di copie di un gene (DNA) o di un trascritto (mRNA) inizialmente presente

nel campione in analisi.

L'amplificazione avviene come nella PCR tradizionale con la differenza che, grazie all'utilizzo di una molecola fluorescente, viene rilevato in tempo reale il numero di copie che si stanno amplificando nella fase di amplificazione esponenziale, le quali sono a loro volta proporzionali al numero di copie inizialmente presenti nel campione.

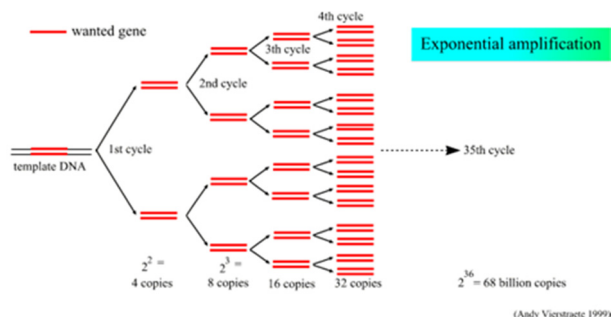


Figura 2. Cicli di amplificazione e formazione dei prodotti di PCR durante i cicli di amplificazione in cui si alternano le fasi di denaturazione, appaiamento ed estensione.

2.2 qPCR

La PCR quantitativa si può eseguire sul DNA per quantificare la presenza di specifici geni di interesse (qPCR) o sull'RNA per la quantificazione dell'espressione genica (Reverse Transcriptase Real-time PCR, RT-qPCR), la quale si basa invece sulla stima del numero di trascritti di RNA presenti nella cellula ed impiegati per la successiva sintesi proteica. In quest'ultimo caso è necessario retrotrascrivere l'RNA, impiegando l'enzima Reverse Transcriptase, in una sequenza complementare di DNA (cDNA) che viene poi impiegata per la qPCR. La RT-qPCR può avvenire sia in due separate reazioni enzimatiche (one-step) che in un'unica reazione (two-steps).

Il funzionamento di base di una saggio di PCR quantitativa prevede che durante la fase di polimerizzazione dei nuovi filamenti del gene bersaglio, una molecola fluorescente (un generico intercalante o una sonda specifica) si legni ad ogni filamento di nuova sintesi ed emetta un segnale fluorescente, il quale viene rilevato dallo strumento in tempo reale ad ogni ciclo di amplificazione.

Generalmente, per la qPCR sono utilizzate due tipi di rilevazione chimiche basate o sull'utilizzo di fluorofori intercalanti del DNA quale il SYBRGreen, o sull'impiego di sonde oligonucleotidiche specifiche per il gene bersaglio come, ad esempio, le sonde TaqMan®. Nel dettaglio:

- SYBRGreen è un intercalante della doppia elica del DNA che lega i prodotti di PCR durante la fase di estensione (Fig. 3) risultando in un incremento della fluorescenza al crescere del numero di prodotti amplificati, e dunque all'aumentare del numero di cicli.

- Sonda TaqMan®: Sonde oligonucleotide specifiche per la sequenza che si sta amplificando. Sono caratterizzate da un Quencher (Q) ed un Reporter (R) fluorescente legati alle estremità opposte della sonda. Il quencher nasconde la fluorescenza del fluoroforo quando questi sono in stretta vicinanza. Durante ogni

ciclo di qPCR, l'enzima DNA polimerasi idrolizza la sonda rilasciando il fluoroforo e producendo un segnale fluorescente per ogni amplificato prodotto. Nello specifico, la sonda lega la sequenza bersaglio quando è a singolo filamento (Fig. 4a) e durante la polimerizzazione la sonda viene scalzata dalla TaqPolimerasi allontanando il Q dal R (Fig. 4b, c) e consentendo così l'emissione del segnale di fluorescenza (Fig. 4d). Indipendentemente dalla chimica di rilevamento, l'amplificazione del DNA comporta un aumento esponenziale dell'intensità del segnale di fluorescenza durante i cicli di amplificazione della qPCR. L'intensità di fluorescenza emessa dal fluoroforo rilevato, sia esso il SYBRGreen o il reporter della sonda TaqMan, è direttamente proporzionale al numero di prodotti di qPCR (amplicons) ottenuti, i quali sono a loro volta proporzionali al numero di copie della sequenza bersaglio inizialmente presente nel campione.

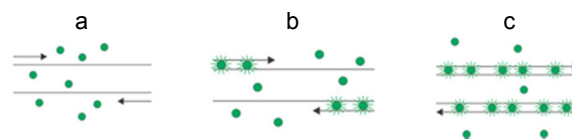


Figura 3. Le molecole di SYBRGreen presenti nel corso dell'amplificazione (a) legano i filamenti a doppia elica prodotti (b) e emettono fluorescenza solo quando legati alle copie del gene di nuova sintesi (c).

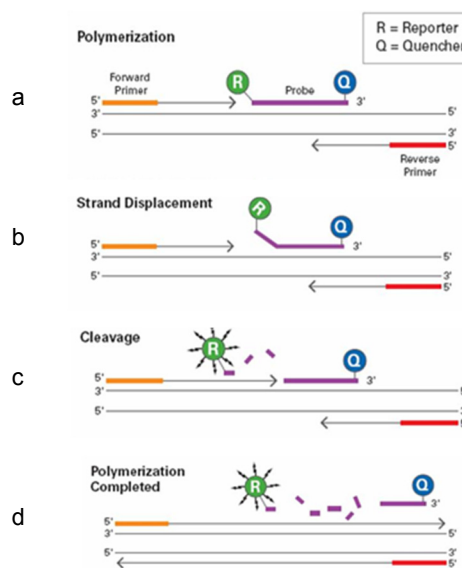


Figura 4. Emissione del segnale di fluorescenza delle sonde TaqMan®. a) Legame della sonda sulla sequenza bersaglio; b) Spostamento della sonda durante l'amplificazione; c) Rottura della sonda all'arrivo della polimerasi; d) separazione tra reporter fluorescente e quencher ed emissione del segnale di fluorescenza.

Inoltre, poiché la reazione di amplificazione avviene in diversi cicli sequenziali, l'incremento dell'intensità di fluorescenza nei primi cicli di amplificazione riflette un elevato numero di copie di gene nel campione in esame, mentre l'incremento dell'intensità di fluorescenza negli ultimi cicli di amplificazione riflette un basso numero di copie di gene nel campione. Al ter-

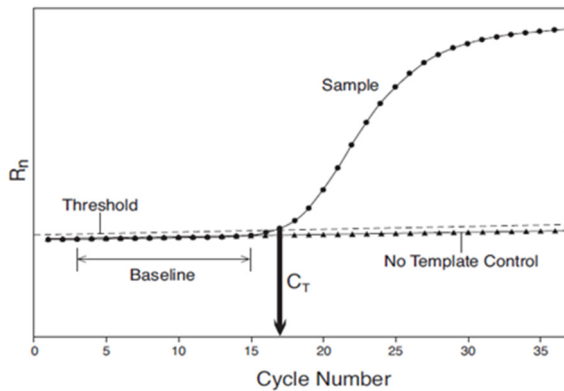


Figura 5. Rappresentazione grafica del segnale di fluorescenza sul numero di cicli di amplificazione (Amplification plot). R_n (normalized reporter): intensità di emissione di fluorescenza del reporter, espresso come rapporto dell'intensità di emissione di fluorescenza del reporter ed intensità di fluorescenza del rumore di fondo della reazione che verrà sottratto al reale segnale di fluorescenza che definisce il numero di copie di geni. Baseline: segnale di fluorescenza di fondo della reazione che verrà sottratto al reale segnale di fluorescenza che definisce il numero di copie di geni. No template control: controllo negativo utilizzato per la verifica della qualità dell'amplificazione.

mine di un saggio qPCR si ottiene un grafico (amplification plot) che definisce la variazione dell'intensità di fluorescenza durante tutti i cicli di amplificazione e di conseguenza il numero di copie di gene inizialmente presenti nel campione (Fig. 5). Sull'asse delle X vengono riportati i cicli di amplificazione mentre sull'asse delle Y sono riportati i valori di intensità di fluorescenza (R_n o RFU).

Con l'aumentare del numero di cicli, si osserva un incremento della fluorescenza oltre la linea di base (Baseline). Il ciclo oltre il quale l'intensità di fluorescenza supera la linea di base è detto ciclo soglia (threshold cycle, C_t o C_q) e rappresenta il parametro fondamentale per la quantificazione in qPCR e per la regressione lineare con la retta di calibrazione.

La retta di calibrazione viene raffigurata in un grafico in cui sono riportati i valori di C_t di ogni standard e la relativa quantità nota di gene. I valori di C_t dei campioni di cui si vuole stimare la quantità del gene bersaglio, sono utilizzati per l'analisi di regressione lineare sulla retta che consente pertanto di stimare il numero di copie di gene per reazione (Fig. 6).

2.3 Influenze e cause d'errore

I fattori che influiscono sui saggi qPCR in campioni ambientali sono dovuti sia al trattamento del campione che alla preparazione della reazione stessa di qPCR. Nel primo caso, le principali problematiche sono connesse alla natura stessa del campione e al trattamento (ad es. quantità di campione, presenza di sostanze inibenti) che può inficiare l'efficienza di estrazione degli acidi nucleici dal campione (DNA o RNA) e la loro qualità. Nel secondo caso, trattandosi di una tecnica biomolecolare molto sensibile, ci sono molteplici fattori tecnici da controllare durante l'esecuzione di un saggio qPCR al fine di fornire dati quantitativi accurati. Sono di seguito riportate in dettaglio

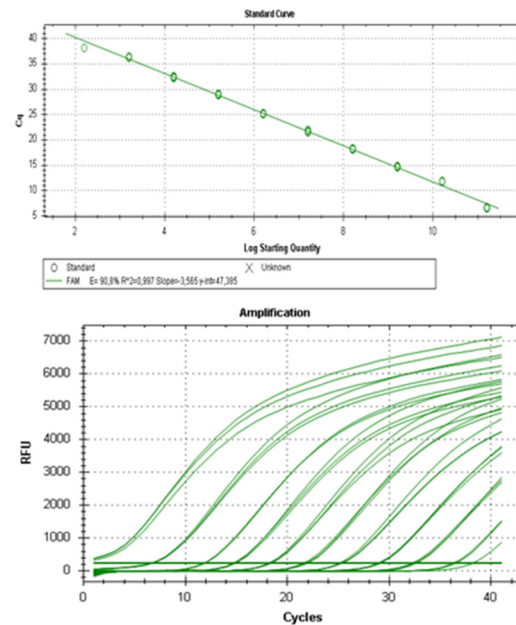


Figura 6. Curve di amplificazione e retta di calibrazione allestita nell'intervallo $10^2 - 10^{11}$ copie di gene per reazione.

le principali cause di errore nelle due fasi di preparazione del saggio qPCR.

2.4 Trattamento del campione

Una delle principali problematiche che riducono la diffusione e l'utilizzo della qPCR in campioni ambientali, e che deve essere attentamente valutata in caso di applicazione di questa metodica, è legata alla presenza di sostanze inibenti, quali acidi umici e fulvici, polisaccaridi complessi, nucleasi e ioni metallici, nel campione da analizzare (Gibson et al., 2013). La presenza di tali sostanze riduce l'efficienza di estrazione del DNA e la sensibilità della reazione stessa, producendo talvolta falsi negativi.

Gli inibitori presenti nei campioni ambientali sono spesso estratti e co-concentrati insieme agli acidi nucleici interferendo con l'attività di polimerizzazione delle polimerasi durante la qPCR (Girones et al., 2010).

Al fine di controllare l'effetto inibitorio causato dalle problematiche connesse all'estrazione del DNA o dell'RNA, sono stati proposti diversi approcci. Tra questi, il più comune prevede l'utilizzo di controlli interni di amplificazione (Internal amplification control IAC) ossia brevi frammenti di DNA a concentrazioni note che sono aggiunti in diverse fasi della preparazione del campione prima del saggio qPCR ed amplificati contemporaneamente alla sequenza target. L'uso di IAC è suggerito in particolare per l'analisi di patogeni, in quanto risultati falsi negativi in tale ambito potrebbero portare ad una sottovalutazione del rischio per la salute umana. La possibile competizione tra la sequenza target ed il controllo positivo per i reagenti e la polimerasi deve però essere attentamente valutata e definita al fine di evitare riduzioni nell'efficienza di amplificazione.

La diluizione seriale è un altro degli approcci comu-

nemente utilizzati, e consiste nell'analisi di diluizioni seriali del DNA estratto al fine di evidenziare l'effetto della presenza di sostanze che inibiscono la reazione di qPCR: tale approccio è ritenuto uno dei requisiti minimi per la pubblicazione di esperimenti di qPCR (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, Bustin et al., 2009). Tale approccio si basa sull'idea che l'effetto dei potenziali inibitori sia ridotto con la diluizione del campione determinando un aumento della concentrazione rilevata nei campioni più diluiti rispetto a quelli meno diluiti, evidenziata anche dalla riduzione del delta CQ, tra campioni diluiti e non. La necessità di effettuare diluizioni porta però all'innalzamento del limite di rilevamento della metodica (King et al., 2009).

Nei campioni ambientali caratterizzati da elevate concentrazioni microbiche, un'ulteriore fonte di interferenza nell'analisi della qPCR è data dal DNA endogeno che può ridurre la quantità massima di campione analizzabile per reazione e di conseguenza la sensibilità della metodica. Elevate concentrazioni di DNA hanno infatti un'azione inibente sulla reazione di amplificazione. Solitamente, nelle istruzioni dei kit con le TaqPolimerasi per la qPCR, 100 ng di DNA sono indicati come massima quantità accettabile per ogni reazione, però in campioni con elevate concentrazioni di biomassa questa quantità di DNA può corrispondere ad una frazione minima del campione trattato.

In Tabella 1 sono riportati, a titolo di esempio, gli intervalli di concentrazione del DNA ottenuti per diversi tipi di campioni ambientali.

Tabella 1. Concentrazione di DNA estratto per tipo di campione.

Tipo di campione	Concentrazione DNA estratto
Acque di scarico	112-4835 ng/ml
Effluenti secondari	17-446 ng/ml
Fanghi di supero	108-713 ng/mg WW

2.5 Saggio qPCR

La qPCR è una tecnica molto sensibile a diversi fattori che possono rappresentare fonte di errore sia per la resa e l'efficienza della reazione che per la precisione e l'accuratezza del dato quantitativo finale. Tra essi si annoverano:

- Qualità del DNA o dell'RNA di partenza: dall'analisi spettroscopica il DNA deve avere valori di assorbanza tali da fornire $A_{260}/A_{230} > 1,5$ (valori troppo bassi indicano la presenza di inibitori quali acidi umici e inibitori organici) e $A_{260}/A_{280} = 1,7-2,0$ (valori bassi indicano la presenza di contaminanti quali carboidrati, peptidi, proteine, fenoli mentre valori troppo alti indicano la presenza di contaminazioni da RNA). Nel caso di RT-qPCR, l'analisi spettroscopica dell'RNA deve fornire valori di assorbanza A_{260}/A_{280}

$> 2,0$ e $A_{260}/A_{230} \sim 2,0$ (valori bassi indicano la presenza di contaminanti quali carboidrati, peptidi, proteine, fenoli);

- Lunghezza dell'amplificato: preferibile tra 70 and 150 paia di basi;
- Specificità dei primers: una T_a non ottimale implica basse efficienze di amplificazione e bassa specificità. E' infatti preferibile una T_a tra i 58°C e 62°C . Inoltre la lunghezza preferibile dei primers tra 18 bp e 22 bp per evitare formazioni di dimeri e/o problemi di efficienza di legame alla sequenza bersaglio;
- Sterilità: le contaminazioni rappresentano una rilevante fonte di errori ed interferenze in un saggio qPCR. E' pertanto necessario utilizzare solo materiale plastico sterile e dedicato alla qPCR (pipette, provette, puntali con filtro). E' inoltre necessario pulire i banconi da lavoro con etanolo assoluto per evitare contaminazioni;
- Manualità dell'operatore: rappresenta la principale fonti di errore che può inficiare i dati quantitativi finali, in quanto si lavora con volumi molto piccoli che richiedono una elevata precisione nella manualità. Inoltre, per un saggio ottimale è fondamentale considerare altri fattori di tipo tecnico per limitare gli errori ed eseguire un saggio di PCR quantitativa ottimale. Tra essi:
- Intervallo dinamico: sono necessarie almeno 3 repliche di ogni campione e almeno 5 diluizioni seriali dello standard di almeno 1 ordine di grandezza (es. 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 copie di gene) per ogni gene bersaglio analizzato. Quanto più ampio è l'intervallo testato, maggiore sarà la possibilità di avere alte efficienze di reazione. L'efficienza di reazione è connessa alla pendenza della retta mediante la seguente formula $E = 10^{-1/\text{slope}}$. Una buona efficienza di reazione varia dal 90 - 110% (valori di pendenza compresa tra -3,6 e -3,1). Questi parametri sono discriminanti per la valutazione di un saggio qPCR. Saggi qPCR i cui valori di efficienza di reazione non rientrano in questo intervallo sono da considerarsi non validi.
- Precisione: la deviazione standard è la più comune misura di precisione. Quanto più i valori delle repliche si avvicinano alla media, tanto minore è la deviazione standard, e viceversa. Un set di dati con un sufficiente numero di repliche formano approssimativamente una distribuzione normale. Nel caso della PCR quantitativa, sono richieste un minimo di 3 repliche per avere una deviazione standard $< 0,167$.
- Sensibilità: Dipende da quanto sono riproducibili le repliche di reazioni eseguite sulle diluizioni seriali dello standard, soprattutto sulle diluizioni più basse. Il parametro che indica la sensibilità è l' R^2 della retta di calibrazione che deve essere necessariamente $\geq 0,980$.

3. CAMPO DI APPLICAZIONE

La qPCR è applicabile in diverse matrici ambientali quali acqua di falda, fluviale, lacustre, marina, acque reflue, effluenti secondari, fanghi di supero, nonché suoli e sedimenti, previa estrazione del DNA (o RNA nel caso della RT-qPCR). La qPCR può essere applicata per la quantificazione di geni funzionali quali biomarcatori coinvolti in processi di biodegradazione di contaminanti tossici e geni di resistenza agli antibiotici.

Diverse pubblicazioni sono state prodotte riguardo l'applicazione della qPCR in campioni ambientali per quantificare una vasta gamma di geni bersaglio (Smith and Osborn, 2009).

4. CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE

I campioni, siano essi liquidi o solidi, vengono riposti in contenitori sterili a -20°C durante il campionamento. L'estrazione del DNA che deve essere eseguita preferibilmente entro le 24 ore dal campionamento al fine di evitare la degradazione cellulare ed eseguire il saggio qPCR su un campione deteriorato.

Per l'estrazione del DNA, i campioni di acqua devono essere pretrattati mediante filtrazione attraverso membrane idrofile a basso assorbimento proteico (ad es. filtri PVDF) con porosità 0,22 µm al fine di trattenere le cellule da cui estrarre il DNA. Diversamente, i campioni di suolo o sedimento non richiedono un trattamento preliminare. Le quantità di campione da trattare variano in base alla composizione e alla tipologia della matrice ambientale e devono essere definite e verificate in base alle concentrazioni del gene target. In tabella 2 sono riportati volumi proposti per l'analisi di acque di diversa tipologia.

Tabella 2. Volumi proposti per l'analisi di acque di diversa tipologia per il rilevamento quantitativo di geni funzionali

Tipo di acqua	Volume ^(a) (mL)
Acque di scarico	50-100
Effluenti secondari terziari	100-250
Acque di falda	500-5000

^a volume filtrabile su un filtro 0.47 µm con porosità 0.22 µm

I campioni pretrattati sono pronti per l'estrazione del DNA che può avvenire mediante utilizzo di:

- protocolli tradizionali: richiedono delle fasi di lisi cellulare (ad es. trattamenti enzimatici, trattamenti termici, trattamenti meccanici) per concentrare gli acidi nucleici, delle fasi di separazione degli acidi nucleici dalle proteine e dai carboidrati cellulari a diversi volumi di fenolo/cloroformio e delle fasi di purificazione degli acidi nucleici estratti (DNA o RNA) mediante utilizzo di etanolo. Questa procedura è generalmente molto econo-

mica seppur lunga e talvolta poco efficiente in termini di purezza del DNA o dell'RNA.

- Kit commerciali: richiedono le stesse fasi di lisi cellulare, separazione e purificazione degli acidi nucleici ma con reattivi già pronti all'uso. Questo approccio è più costoso a fronte di una procedura rapida e maggiore resa e purezza del DNA o dell'RNA.

Il DNA o l'RNA estratti sono pronti per la quantificazione mediante qPCR e possono essere conservati a -20°C (DNA) o a -80°C (RNA) in aliquote per alcuni mesi.

5. APPARECCHIATURE

Sono molte le apparecchiature presenti in commercio per eseguire la PCR quantitativa e sono principalmente termociclatori con la possibilità di leggere i segnali di fluorescenza. Esistono due categorie: le macchine per qPCR in grado di rilevare il segnale fluorescente ad una lunghezza d'onda per volta (anche dette "qPCR simplex") o macchine in grado di leggere molteplici lunghezze d'onda per volta (anche dette "qPCR multiplex").

6. REATTIVI

Per la PCR quantitativa sono necessari:

- nucleotidi (dNTPs) e TaqPolimerasi (acquistati come mix in una soluzione già pronta)
- primers forward e reverse
- SYBRGreen o la sonda TaqMan®
- acqua sterile Nuclease free.

Attualmente esistono in commercio dei kit con elevata efficienza ed affidabilità che consentono di lavorare con volumi di reazione da un minimo di 10 µL a un massimo di 50 µL totali.

7. METODO

La qPCR viene eseguita ponendo tutti i reagenti in ghiaccio, non esposti alla luce, con plastiche sterili e puntali con filtro.

1. Preparare gli standards di riferimento mediante diluizioni seriali 1:10. Gli standard si possono preparare utilizzando un amplificato purificato dello stesso gene da quantificare (metodo dei long amplicon) nei campioni in analisi oppure utilizzando un plasmide con il gene bersaglio clonato all'interno. La prima opzione è preferibile in quanto i long amplicon sono meno predisposti ai problemi di ingombro sterico tipico dei plasmidi, soprattutto quando si utilizzano sonde TaqMan. Gli standard vengono aliquotati e conservati a -20°C per diversi mesi.
2. Preparare una soluzione contenente tutte le componenti riportate in tabella 3 e mescolare pipettando con cura. Per ogni campione si preparano reazioni in triplicato.

3. Dispensare il volume di ogni reazione nella piastra da qPCR e aggiungere l'aliquota necessaria del template di DNA o cDNA (DNA o cDNA: 100 ng – 100 fg) dei campioni da analizzare. Aggiungere inoltre gli standards di riferimento.
4. Coprire la piastra con un apposito film trasparente, centrifugare l'intera piastra per 30 secondi e riporla nell'apposita macchina da qPCR.
5. Impostare i cicli di amplificazione, il fluoroforo (SYBRGreen o TaqMan®) da rilevare, il volume di ogni reazione.

Tabella 3. Principali componenti della soluzione per qPCR

Componenti	Volume per 20 mL	Concentrazione finale
Taq polimerasi	10 µL	1X
Primer forward	Variabile	250-500 mM
Primer Reverse	Variabile	250-500 mM
Acqua Nuclease free	Variabile	-

7.1 Quantificazione

Indipendentemente dalla chimica utilizzata, la quantificazione mediante qPCR può avvenire con due approcci principali: la quantificazione relativa e la quantificazione assoluta. Nel primo caso si usa un riferimento endogeno (un gene costitutivo) per stimare la variazione quantitativa rispetto ad un campione di riferimento.

Nel caso della quantificazione assoluta si utilizzano degli standard a quantità nota del gene o della sequenza bersaglio, allestendo una retta di calibrazione con le diluizioni seriali opportunamente preparate. Il numero di copie di gene del campione in analisi viene definito mediante regressione lineare sulla retta di calibrazione. Il metodo di quantificazione assoluta è quello principalmente utilizzato per l'analisi dei cam-

pioni ambientali. Il dato finale è espresso come numero di copie di gene (qPCR) o numero di trascritti del gene (RT-qPCR) per unità di volume d'acqua, gr suolo, gr sedimento da cui è stato estratto il DNA.

7.2 Validazione del metodo

La PCR quantitativa è stata applicata in diversi campioni ambientali per l'analisi di biomarcatori di degradazione di inquinanti e per l'analisi di geni antibiotico-resistenti in campioni ambientali.

A titolo di esempio, si riportano i dati quantitativi di biomarcatori ottenuti su diversi siti contaminati da solventi clorurati distribuiti sul territorio nazionale (Fig 7) e di geni di resistenza agli antibiotici (Fig. 8). I dati quantitativi forniti dalla qPCR sono distribuiti in un ampio intervallo di concentrazioni variabili da 10⁸ a ≈10³ copie di gene L⁻¹ (Fig. 7).

8. CONCLUSIONI

La qPCR è una tecnica ampiamente utilizzata per l'analisi dei campioni in matrici ambientali di diversa natura. Nonostante l'ampio utilizzo dovuto alla specificità e ai ridotti tempi di analisi, l'applicazione della qPCR richiede molta attenzione da parte dell'operatore sia nelle fasi di trattamento dei campioni che nell'esecuzione del saggio stesso. L'efficacia e sensibilità della qPCR possono infatti variare in base alla tipologia dei campione analizzati e a fattori intrinseci (quali la presenza di sostanze inibenti) che possono fortemente compromettere sia l'efficienza di estrazione del DNA che la sensibilità della reazione stessa.

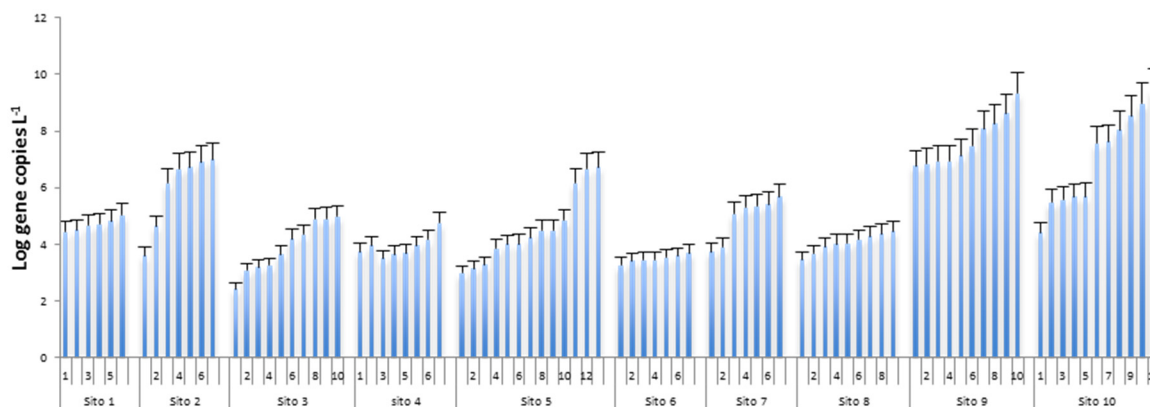


Figura 7. Dati quantitativi del biomarcatore (gene tceA) coinvolto nel processo di dechlorazione riduttiva di eteni clorurati in campioni prelevati da falde acquifere contaminate .

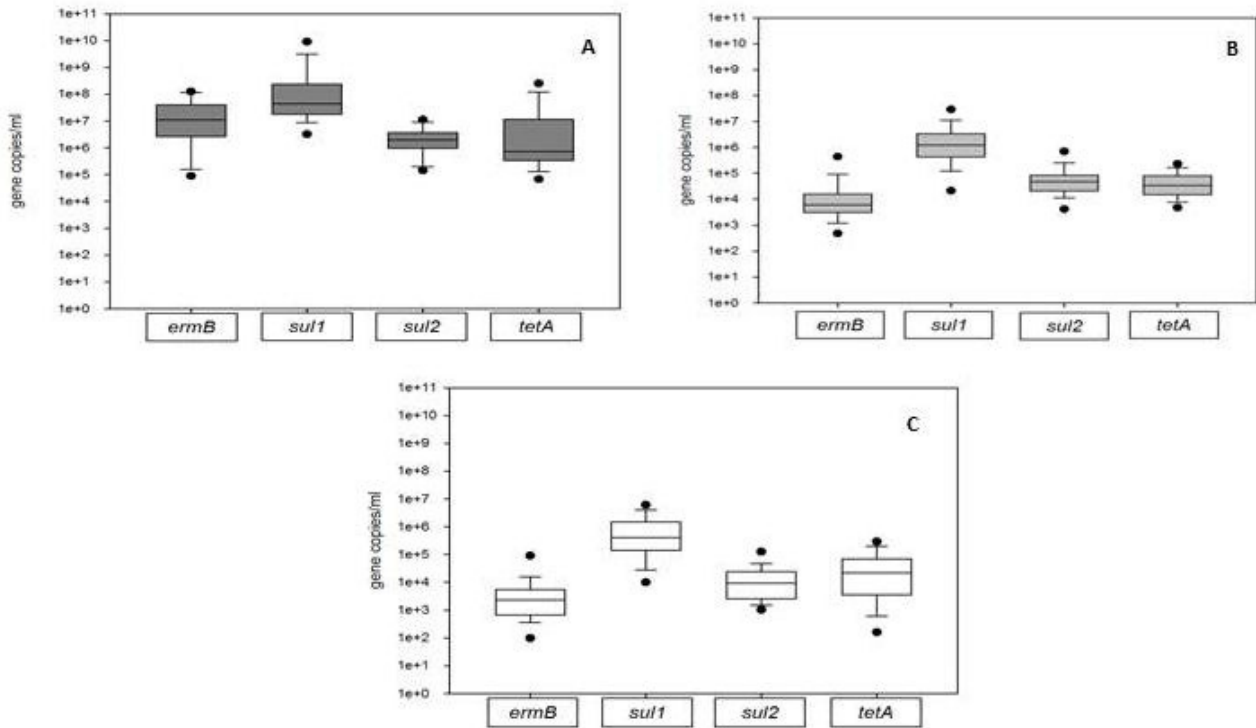


Figura 8. Dati quantitativi relativi all'abbondanza di geni di resistenza agli antibiotici in: A) acque di scarico (n=21); B) effluenti secondari (n=21) e C) effluenti terziari (n=36). I geni di resistenza monitorati codificano per la resistenza alle tetracicline (*tetA*), eritromicine (*ermB*) e sulfonamidi (*sul1* e *sul2*).

BIBLIOGRAFIA

GIBSON K.E., SCHWAB K.J., SPENCER S.K. BORCHARDT M.A. (2012): "Measuring and mitigating inhibition during quantitative real time PCR analysis of viral nucleic acid extracts from large-volume environmental water samples", *Water Res.* 13, 4281-4291.

GIRONES R., FERRUS M.A., ALONSO J.L., RODRIGUEZ-MANZANO J., CALGUA B., CORREA ADE A., HUNDESA A., CARRATALA A., BOFILL-MAS S. (2010): "Molecular detection of pathogens in water—the pros and cons of molecular techniques", *Water Res.*, 44, 4325–4339.

JOFRE J. AND BLANCH A.R. (2010): "Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality", *J. Appl. Microbiol.*, 109, 1853-1867.

MATTURRO B., HEAVNER G.L., RICHARDSON R.E., ROSSETTI S. (2013): "Quantitative estimation of *Dehalococcoides mccartyi* at laboratory and field scale: comparative study between CARD-FISH and Real Time PCR", *J. Microbiol. Methods.*, 93 (2), 127-133.

RAMÍREZ-CASTILLO F.Y., LOERA-MURO A., JACQUES M., GARNEAU P., AVELAR-GONZÁLEZ F.J., HAREL J., GUERRERO-BARRERA A.L., (2015): "Waterborne pathogens: detection methods and challenges", *Pathogens*, 21, 4(2), 307-334.

SMITH C.J., OSBORN A.M. (2009): "Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 67, 6 – 20.

Quantificazione diretta, mediante citometria a flusso, delle cellule batteriche in acque reflue e fanghi attivi degli impianti di depurazione

a cura di

Laura Bruni (*), *Provincia Autonoma di Trento, Agenzia per la Depurazione*

Paola Foladori, *Università degli Studi di Trento, Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale e Meccanica*

RIASSUNTO

La citometria a flusso (FCM), una tecnica diretta, multiparametrica e potenzialmente adatta all'automazione, è stata applicata alle matrici dei diversi comparti di un impianto di depurazione (acqua reflua in ingresso, fango attivo ed effluente) per la quantificazione delle cellule batteriche vive e morte. Il citometro a flusso rileva due o più segnali di fluorescenza e due segnali di scattering simultaneamente per ogni singola cellula analizzata. FCM è in grado di enumerare più di 1000 cellule/s, permettendo una quantificazione rapida e precisa delle cellule in sospensione. Per disperdere e disaggregare i fiocchi di fango, che in tale forma non sarebbero analizzabili dallo strumento, è stata impiegata la sonicazione con energia specifica di 80 kJ/L. L'identificazione delle cellule batteriche vive o morte è avvenuta previa marcatura fluorescente con i fluorocromi SYBR Green I e Ioduro di Propidio, per distinguere l'integrità o la permeabilizzazione di membrana. Nei campioni prelevati da un depuratore per acque reflue urbane, le concentrazioni di cellule batteriche vive sono risultate mediamente $8,4 \times 10^{10}$ cell/L nell'acqua reflua in ingresso, $2,3 \times 10^{12}$ cell/L nel fango attivo e $1,7 \times 10^9$ cell/L nell'effluente.

SUMMARY

Flow cytometry, a direct, multiparametric procedure potentially amenable to automation, was applied to the various stages of a wastewater treatment plant (influent raw wastewater, activated sludge and effluent) for the quantification of viable and dead bacterial cells. The flow cytometer simultaneously acquires two or more fluorescence signals as well as two light scattering signals for each bacterial cell. Such a technique is able of counting more than 1000 cells/s, allowing a rapid and precise quantification of the cells in a suspension. For the dispersion and disaggregation of activated sludge flocs, which cannot be directly analysed by flow cytometry, a pre-treatment based on sonication was used at specific energy of 80 kJ/L. Identification of bacteria cells was performed after fluorescent staining with SYBR-Green I and Propidium Iodide, in order to distinguish cell integrity or permeabilisation. In the samples collected from a municipal wastewater treatment plant the average concentrations of viable bacteria were $8,4 \times 10^{10}$ cell/L in raw wastewater, $2,3 \times 10^{12}$ cell/L in activated sludge and $1,7 \times 10^9$ cell/L in the effluent.

1. INTRODUZIONE

Le acque reflue grezze, di origine domestica ed urbana, contengono un gran numero di batteri, che includono principalmente Coliformi totali (10^5 - 10^6 /mL), Coliformi fecali (10^4 - 10^5 /mL), Streptococchi fecali (10^2 - 10^4 /mL) ed Enterococchi (10^2 - 10^3 /mL), ma anche molte altre specie tra cui batteri patogeni. Quando le acque reflue grezze vengono trattate in un impianto di depurazione, la concentrazione di batteri viene abbattuta grazie ad un decadimento spontaneo e all'accumulo di questi nei fanghi, cosicché il numero di batteri nell'effluente è sensibilmente inferiore rispetto a quello delle acque in ingresso. Il refluo trattato in uscita dall'impianto viene monitorato dal punto di vista microbiologico solo per quanto riguarda la quantificazione degli indicatori fecali, in particolare *Escherichia coli*, anche in relazione alla stima delle prestazioni di processi di disinfezione.

I batteri possiedono un ruolo fondamentale nella decomposizione e nella stabilizzazione della sostanza organica, sia in natura sia negli impianti di depurazione. Infatti, ad oggi, i trattamenti maggiormente impiegati per la depurazione delle acque reflue urbane sono basati su processi biologici, realizzati soprattutto mediante fango attivo, dove la degradazione degli inquinanti si attua in condizioni aerobiche o in condizioni anossiche mediante proteobatteri delle sottoclassi Alfa, Beta o Gamma (Wagner et al., 1993). I microrganismi, con colloidali, polimeri organici e cationi, concorrono a formare i fiocchi di fango attivo. I fiocchi, presenti nel mixed liquor in differenti dimensioni (orientativamente da < 150 a > 500 μm) (Jenkins et al., 1993), sono costituiti da diverse decine di migliaia di cellule batteriche singole di dimensione media inferiore ad alcuni micrometri o aggregate in clusters o filamenti (Frølund et al, 1996; Voltertsen et al, 2001; Foladori et al., 2008).

L'enumerazione delle singole cellule batteriche costi-

* laura.bruni@provincia.tn.it

tuenti i fiocchi di fango attivo risulta di difficile effettuazione e non viene pressoché mai praticata a causa della mancanza di tecniche disponibili. Comunque, nel settore degli impianti di depurazione, il parametro più utilizzato per quantificare la massa di fango attivo è rappresentato dal contenuto di solidi sospesi, espresso sia come SST (Solidi Sospesi Totali) che come SSV (Solidi Sospesi Volatili). Tuttavia gli SSV non sono un'indicazione diretta della biomassa batterica, dal momento che tale parametro comprende anche la biomassa endogena (prodotto residuo della morte e della lisi batterica) e particolato organico non vivente ed inerte. Per questo la biomassa batterica dei fanghi attivi è a tutt'oggi generalmente stimata mediante calcoli teorici basati sulla massa di sostanza organica introdotta con il refluo in ingresso e rimossa nei bioreattori, impiegando opportuni parametri cinetici e stechiometrici (Ekama et al., 1984; Henze et al., 2000). Del resto, conoscere la biomassa batterica in un sistema a fanghi attivi è di fondamentale importanza nella comprensione dei processi e delle cinetiche di rimozione dei substrati.

In letteratura, diversi autori (tra cui Gilbride et al., 2006) hanno effettuato approfondite indagini sulla microbiologia dei fanghi attivi, ma finora nessun metodo di routine è disponibile per quantificare in modo rapido e preciso il numero di batteri nei fanghi attivi e nelle acque reflue a causa dei seguenti principali ostacoli: a) la struttura fortemente aggregata dei fiocchi, aspetto che limita la possibilità di contare direttamente le cellule batteriche; b) la difficoltà di quantificare i batteri mediante microscopio, poiché tale approccio richiede molto tempo con conseguente progressiva diminuzione dell'efficienza dell'operatore e, comunque, il numero di batteri osservabili su un vetrino è contenuto, aspetto che riduce la validità statistica del risultato; c) la difficoltà di enumerare tutte le tipologie di batteri presenti in un campione mediante le classiche metodiche colturali, poiché le diverse condizioni metaboliche e le differenti richieste nutritive ed ecologiche dei vari microrganismi non permettono la crescita di tutte le specie presenti.

I primi studi atti a recuperare e quantificare in qualche modo i batteri nei fanghi attivi ed acque reflue in genere, erano basati su metodi colturali (Williams et al., 1971; Banks e Walker, 1977). Negli ultimi decenni è stato dimostrato che tale approccio conduce a forti sottostime, con risultati parziali e fortemente distorti (Wagner et al., 1993), dal momento che solo una parte dei batteri costituenti i fiocchi di fango attivo è coltivabile mediante metodi microbiologici classici (colture in piastra per inclusione, spatolamento o filtrazione su membrana, o metodo MPN). Per superare la limitazione delle tecniche colturali, nell'ultimo decennio sono stati proposti i metodi molecolari, come le tecniche FISH di ibridizzazione in situ, che nel frattempo erano stati messi a punto (Aulenta et al., 2004, Levantesi et al., 2006, Rossetti et al., 2005).

Nell'ambito delle tecniche innovative atte ad enumerare cellule, la citometria a flusso (FCM) è una potente tecnica analitica a singola-cellula in grado di contare fino a 1000 cellule/s e di fornire una quantificazione diretta, rapida e precisa di batteri in una so-

sensione, con buona riproducibilità e precisione dei risultati ottenuti, permettendo di determinare anche le cellule con membrana cellulare integra e quindi vitali, ma non in grado di riprodursi (Viable But Not Culturable cells; Wagner et al., 1993) che sfuggono al conteggio con le tecniche microbiologiche classiche. FCM è impiegata già da tempo in ambito clinico ed il suo utilizzo associato a sonde molecolari fluorescenti è stato indicato come efficace anche in campo microbiologico ambientale in vari casi (inter alia Porter et al., 2006; Steen, 2000; Vives-Rego et al., 2000; Bergquist et al., 2009). Con opportuni fluorocromi, FCM permette anche di definire lo stato fisiologico delle cellule ed il loro grado di attività metabolica, condizione più restrittiva rispetto all'integrità di membrana, poiché comporta la presenza di varie componenti del metabolismo cellulare, quali la biosintesi, l'attività delle pompe protoniche, il potenziale di membrana, l'attività respiratoria e quella enzimatica. Per esempio, quest'ultima può essere identificata con FCM utilizzando substrati fluorogenici come BCECF-AM ed FDA (Ziglio et al., 2002), FDG (Plovins et al., 1994) o altri che dopo essere stati metabolizzati, diventano fluorescenti e marcano le cellule enzimaticamente attive.

FCM è un'analisi multi-parametrica che registra, per ogni cellula batterica analizzata, due o più segnali di fluorescenza e due segnali di scattering di luce contemporaneamente. Rispetto alla quantificazione mediante osservazione microscopica in epifluorescenza, FCM è più veloce, più affidabile ed in grado di processare molti più campioni al giorno. Inoltre, la marcatura fluorescente diretta dei batteri permette di ottenere un duplice obiettivo: (1) distinguere i batteri da altri componenti non biologici, come particelle organiche e inorganiche che costituiscono la maggior parte del residuo secco nel fango attivo e nei reflui; (2) differenziare i batteri vitali da quelli morti, la cui quantificazione ha un preciso ruolo nella valutazione del processo depurativo; per esempio, l'efficienza depurativa dipende dalla vitalità dei batteri nel fango attivo, mentre l'efficienza della disinfezione dipende dalla mortalità dei batteri nelle acque reflue.

Questo lavoro si propone di indicare un metodo basato su FCM per la rapida e diretta quantificazione dei batteri totali (distinti anche in vitali e morti) presenti in un fango attivo e in acque reflue grezze o depurate.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il protocollo qui illustrato (vedi Tab. 1) prevede l'applicazione della tecnica FCM per l'enumerazione delle cellule batteriche presenti in un fango attivo o in un'acqua reflua (grezza o depurata), con la definizione del loro stato fisiologico associato a vitalità o mortalità.

Come si evince dalla sintesi di Tabella 1, il protocollo è composto da 6 semplici passaggi, i cui dettagli vengono descritti di seguito, portando come esempio dati di fanghi ed acque reflue prelevati da un depuratore reale.

Tabella 1. Schema protocollo per analisi FCM.

Passaggi protocollo	Tipo di campione		
	Acqua reflua grezza	Fango attivo	Acqua reflua depurata
1. Diluizione in PBS	1:1	1:10	1:1
2. Ultrasonificazione: energia specifica	25 kJ L ⁻¹	80 kJ L ⁻¹	Non necessaria
3. Diluizione in PBS	1:20	1:40	1:1 (o 1:2)
4. Filtrazione a 20- μ m		si	
5. Colorazione SYBR I + PI		si	
6. Analisi FCM e determinazione delle cellule vitali e morte		si	

3. CAMPIONI DI FANGO ATTIVO E DI ACQUE REFLUE

Campioni di fango attivo sono stati prelevati dalla vasca di ossidazione dell'impianto di depurazione di Trento Nord (Trento, Italia) che tratta reflui civili, caratterizzato da una configurazione di ossidazione-nitrificazione con età del fango di circa 12 giorni, carico organico di 0,15 kgBOD5 kgTSS⁻¹ d⁻¹ e concentrazione di solidi sospesi totali (SST) di circa 4 kg SST m⁻³.

Campioni di acque reflue grezze sono stati prelevati direttamente dall'ingresso dello stesso impianto di depurazione civile, prima della sedimentazione primaria, mentre quelli di acqua depurata sono stati campionati dal labirinto di disinfezione in uscita all'impianto, comparto che non presenta sistemi di disinfezione operanti in continuo.

Tutti i campioni sono stati processati nel più breve tempo possibile e mediamente il tempo intercorso fra il prelievo e l'analisi non era superiore alle 2 ore.

4. ULTRASONICAZIONE

Requisito fondamentale della tecnica FCM è disporre di un campione costituito da cellule singole e libere nel liquido solvente.

Nel caso di campioni di fango attivo, viene impiegato il trattamento fisico dell'ultrasonificazione che permette di disaggregare e rompere i fiocchi di fango e liberare così le cellule batteriche fra di loro e da altro materiale inorganico. Poiché lo scopo è quello di mantenere il più possibile la vitalità delle cellule recuperate, in FCM vengono applicati modesti livelli di energia (Falcioni et al., 2006; Foladori et al., 2007), mentre in altri campi gli ultrasuoni vengono impiegati per indurre l'inattivazione e la lisi cellulare mediante applicazione di elevati livelli energetici (Zhang et al., 2007).

I principali parametri da considerare nel processo di ultrasonificazione, sono: a) potenza trasferita P espressa in Watt; b) durata del trattamento espresso in secondi; c) volume trattato V , espresso in L. Questi termini permettono di calcolare il parametro di riferimento "energia specifica". E_s . La potenza specifica o intensità (I) è calcolata come P/V e viene espressa in W

L⁻¹. L'energia specifica E_s viene calcolata moltiplicando I per la durata del trattamento ($E_s = I \times t$) e viene espressa in W s L⁻¹, o in modo equivalente, in J L⁻¹ or kJ L⁻¹ (Foladori et al., 2007). E' preferibile utilizzare la potenza trasferita al liquido (che si misura mediante metodo calorimetrico) al posto della potenza applicata, per poter comparare sonicatori di diversa tipologia.

Il valore di E_s ottimale per ottenere un'efficace ultrasonificazione dei fanghi attivi senza compromettere la vitalità cellulare è descritto di seguito. La figura 1

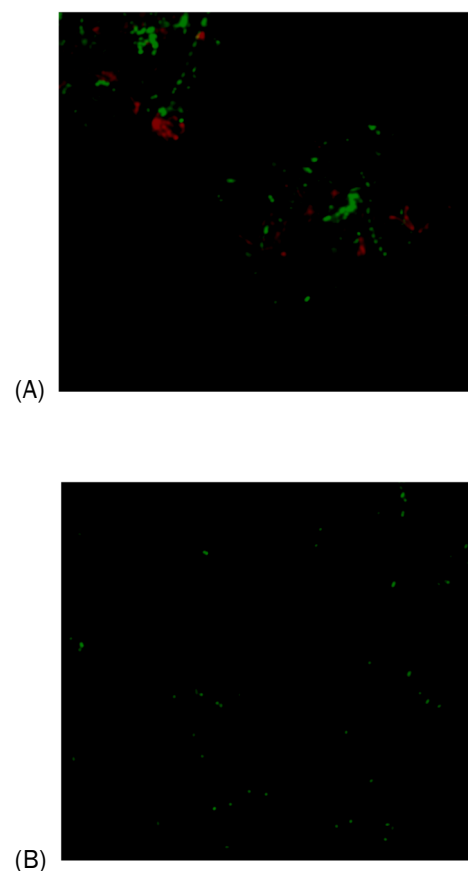


Figura 1. (A) Aggregati fioccosi nei fanghi attivi; (B) sospensione di singole cellule ottenuta dopo ultrasonificazione.

compara i fiocchi di fango attivo con la sospensione di cellule singole ottenute dopo ultrasonificazione

La Figura 2 rappresenta la concentrazione di singole cellule vitali e morte (identificate sulla base dell'integrità di membrana, accoppiando SYBR-I + PI come descritto nella sezione 3 "Colorazione del campione") disaggregate dai fiocchi e rilasciate in sospensione, al variare dell'energia specifica di ultrasonificazione, Es.

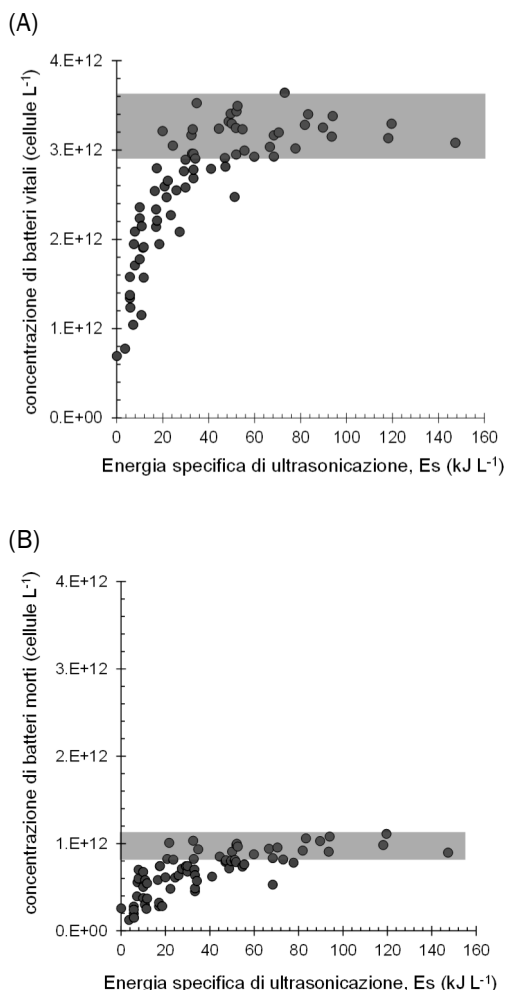


Figura 2. Concentrazione di singole cellule disaggregate in seguito ad ultrasonificazione a diversi livelli di Es: (A) cellule vitali; (B) cellule morte.

Dalla fig. 2 si osserva come l'incremento di Es causi un progressivo aumento della concentrazione di singole cellule, sia vitali che morte, rilasciate nel bulk liquido, fino al raggiungimento di un plateau identificato con l'area grigia. Il range massimo di cellule disaggregate, ottenibile per Es di 80 kJ/L o superiore, risulta di $2,9-3,6 \times 10^{12}$ cellule/L per i batteri vitali e di $0,9-1,1 \times 10^{12}$ cellule/L per i batteri morti.

A causa della complessa struttura in fiocchi in cui i batteri si organizzano, non è possibile conoscere a priori l'esatto numero di batteri presenti in un campione di fango attivo. Un pretrattamento efficace è quindi quello che permette di recuperare il massimo numero di singole cellule, ma senza causare un significativo danneggiamento delle cellule vitali. Per valutare quest'ultimo aspetto si osserva il rapporto tra le singole cellule morte (M) e le singole cellule vitali (V): per Es di 80 kJ/L o superiore il rapporto M/V rimane piuttosto costante attorno a 0,20, potendo così escludere l'ipotesi di danneggiamento per i valori di Es qui testati.

Per i fanghi attivi, è stato determinato un valore ottimale di Es pari a 80 kJ/L, in accordo anche con altre esperienze di letteratura: Biggs and Lant (2000) indicano che la sonicazione di 100 mL di fango per 3 minuti a 50 W (corrispondente a Es di 90 kJ/L) è ottimale per disaggregare i fanghi attivi senza evidente danneggiamento cellulare.

Sulla base del pretrattamento mediante ultrasonificazione sopra descritto, si definiscono i seguenti protocolli, in cui Es differisce a seconda che si considerino fanghi attivi o acque reflue come di seguito descritto.

Fanghi attivi - Si considera un volume noto di fango attivo (100 mL diluito 1:10 in soluzione isotonica salina PBS, 3 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 and 8,5 g NaCl per Litro; pH=7,2), che viene sottoposto a trattamento di ultrasonificazione utilizzando un sonicatore ad immersione Branson 250 Digital Ultrasonifier operante alla frequenza di 20 kHz. Per i campioni di fango attivo, l'Es applicata è stata pari a 80 kJ L⁻¹. Il campione così pre-trattato viene ulteriormente diluito 1:40 in PBS, per ottenere una concentrazione di 10^6-10^7 batteri per mL (concentrazione ottimale per l'analisi FCM), filtrato su filtro grossolano e colorato, prima dell'analisi FCM.

Acque reflue grezze - I campioni di acque grezze in ingresso al depuratore vengono ultrasonificati con

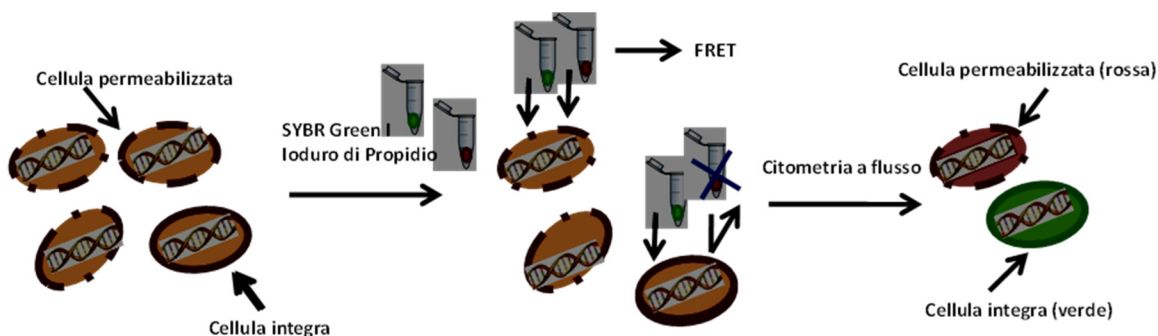


Figura 3. Schema semplificato della doppia marcatura con SYBR Green I e Ioduro di Propidio.

energia inferiore rispetto a quella applicata ai fanghi attivi, per disaggregare gli eventuali piccoli fiocchi presenti. L'Es applicata è stata pari a 25 kJ L⁻¹ ed il campione sonicato è stato ulteriormente diluito 1:20 in PBS prima di essere filtrato grossolanamente, colorato e analizzato mediante FCM.

Acque reflue depurate - I campioni di acque reflue depurate effluenti dall'impianto non sono stati sottoposti ad ultrasonificazione, ma vengono solo agitati vigorosamente per alcuni minuti (senza necessità di ultrasonificazione) al fine di assicurare una buona omogeneizzazione dei batteri presenti. Possono essere eventualmente diluiti 1:2 in PBS, secondo necessità. Dopo diluizione, anche questi ultimi sono stati sottoposti a filtrazione grossolana, colorazione ed analisi FCM.

5. COLORAZIONE DEL CAMPIONE

Tutte le sospensioni batteriche ottenute dopo ultrasonificazione e diluizione sono state filtrate con filtri grossolani a pozzetto aventi pori da 20 µm (Celltrics, Partec) per eliminare particelle che possono ostruire l'iniettore del citometro a flusso. Le particelle escluse dall'analisi citometrica, perché trattenute sul filtro da 20-µm, sono meno del 3% rispetto al fiocco originale da cui sono state liberate (cifra stimata mediante microscopia ad epifluorescenza).

Dopo filtrazione i campioni sono stati colorati con fluorocromi fluorescenti. Per distinguere i batteri vitali da quelli morti sono stati dosati assieme due fluorocromi: SYBR-Green I (lo stock commerciale di SYBR-I, Invitrogen, USA; λ_{ex}=495 nm, λ_{em}=525 nm viene diluito 1/30 in DMSO) e ioduro di Propidio (PI, concentrazione dello stock commerciale di 1 mg/mL, Invitrogen, USA; λ_{ex}=536 nm, λ_{em}=617 nm). Un quantitativo pari a 10 µL di entrambi i coloranti viene aggiunto ad 1 mL di sospensione batterica contenente all'incirca 10⁶-10⁷ cellule/mL. Il campione viene incubato al buio a temperatura ambiente per 15 minuti e successivamente analizzato mediante FCM.

Come indicato in figura 3, SYBR-I è in grado di entrare in tutte le cellule mentre PI, a causa del maggior ingombro sterico e della polarità, penetra e colora solamente le cellule permeabilizzate cioè con membrana danneggiata. I due fluorocromi sono degli intercalanti delle basi degli acidi nucleici cellulari e qui si pongono a breve distanza l'uno dall'altro. Dopo eccitazione, le cellule integre emettono solamente fluorescenza verde derivante dal SYBR-I, unico colorante presente in esse, mentre nelle cellule permeabilizzate la simultanea presenza di SYBR-I e PI permette di attivare il fenomeno definito Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), grazie al quale tutta l'energia di emissione del SYBR-I a λ_{em}=525 nm serve ad eccitare il PI con conseguente unica fluorescenza rossa emessa dalla cellula.

In questo modo le cellule integre e permeabilizzate possono essere distinte facilmente e simultaneamente, sulla base della loro integrità di membrana.

Per le cellule, avere la membrana integra è il requisito fondamentale per la protezione degli organuli e delle strutture intracellulari, per assicurare l'attività meta-

bolica ed i sistemi di riparazione cellulare, nonché per permettere la capacità replicativa (figura 4). Pertanto le cellule con membrana integra vengono definite vitali. Le cellule con membrana danneggiata possono invece essere considerate permeabilizzate e quindi classificate come morte, poiché le loro strutture intracellulari sono esposte liberamente all'ambiente esterno e probabilmente si decomporranno (Nebe-von-Caron et al., 2000, Ziglio et al., 2002, Foladori et al., 2007).

Stato funzionale della cellula	Cellule totali			
	Cellule vitali			Cellule morte
	Cellule metabolicamente attive		membrana integra	
	Cellule in grado di replicarsi	attività metabolica		membrana permeabile
Criterio di riconoscimento	divisione cellulare	attività metabolica	membrana integra	membrana permeabile

Figura 4. Il "concetto di vitalità" (tratto da Nebe-von-Caron et al., 2000, modificato).

6. ANALISI MEDIANTE CITOMETRO A FLUSSO

I campioni colorati vengono analizzati con citometro a flusso Apogee-A40 (Apogee Flow Systems, UK), che ne aspira un'aliquota e la inietta in un'apposita camera per mezzo del fluido vettore (acqua ultrapura). Qui, con flusso laminare, le cellule passano davanti ad un punto di fuoco e vengono singolarmente colpite da un raggio luminoso prodotto da un laser ad argon che emette luce di lunghezza d'onda pari a 488 nm. Le cellule emettono così segnali di fluorescenza e segnali di scattering, che vengono raccolti da detectors ed amplificati da fotomoltiplicatori in grado di trasformarli in impulsi elettrici e quindi in segnali inviati al programma per la loro elaborazione. Lo strumento fornisce direttamente i dati relativi alla concentrazione dei batteri nella sospensione originale, poiché è dotato di una siringa che misura il volume inoculato nella camera di conteggio nell'unità di tempo.

I segnali raccolti dallo strumento, acquisiti su scala logaritmica (4 decadi) ed opportunamente scremati da particelle inerti e rumore di fondo dello strumento mediante una soglia, sono quelli della fluorescenza verde (segnali di SYBR-I), rossa (segnali di PI) e del "Forward Angle Light Scatter" (FALS), parametro correlato alla dimensione ed al biovolume cellulare (Foladori et al., 2008). Per controllare ed eventualmente calibrare il settaggio dello strumento, prima di analizzare i campioni viene impiegata una soluzione di sfere standard fluorescenti a concentrazione nota (circa 5.000/µL) e soluzioni contenenti sfere non fluorescenti in silice di diametro noto (da 0,5 a 1,0 µm).

L'accoppiamento dei due fluorocromi (SYBR-I + PI) e l'impiego di due soglie, una per il segnale della fluorescenza verde e l'altra per quello della fluorescenza rossa, permette di ottenere un citogramma che può essere suddiviso in quattro regioni, come mostrato nell'esempio di figura 5.

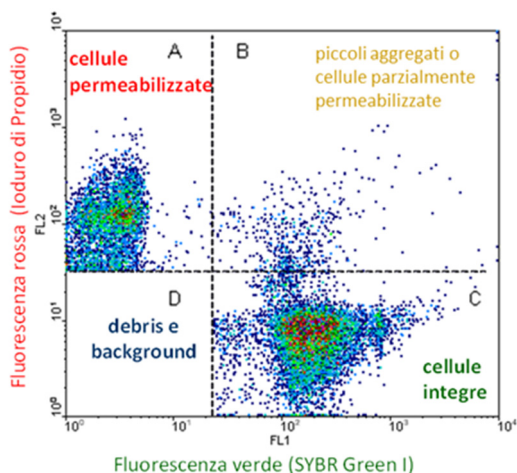


Figura 5. Esempio di citogramma ottenuto con l'analisi FCM, per la determinazione di batteri vitali e morti.

7. ASPETTI STATISTICI

Il metodo in oggetto è stato messo a punto mediante citometro a flusso Apogee-A40 (Apogee Flow Systems, UK) equipaggiato con un laser ad argon (luce emessa a 488 nm) e fotomoltiplicatori per 5 segnali (due di scattering e 3 di fluorescenza).

Sono stati valutati alcuni aspetti statistici, con specifico riferimento a:

- riproducibilità inter-campione dell'intera procedura, utilizzando fanghi attivi tal quali;
- riproducibilità intra-campione dell'analisi FCM, utilizzando fanghi attivi disaggregati;
- riproducibilità dell'analisi FCM, utilizzando sfere standard.

L'intera procedura FCM per l'analisi di fanghi attivi e acque reflue è stata controllata mediante 5 repliche indipendenti dell'intero protocollo (diluizioni + ultrasonificazione + filtrazione + colorazione + analisi FCM) applicato al medesimo tipo di fango attivo (riproducibilità inter-campione), ottenendo un coefficiente di variazione pari a 8,7% per le cellule vitali e pari a 15,3% per le cellule morte (Foladori et al., 2010).

La sola analisi FCM è stata controllata mediante 10 repliche indipendenti (colorazione + analisi FCM) applicate al medesimo fango attivo pretrattato (riproducibilità intra-campione), ottenendo un coefficiente di variazione inferiore al 10% (range 2,4-9,7%) per le cellule vitali e morte (Ziglio et al., 2002).

Controllando lo strumento con sfere standard in

silice (beads) fornite dal produttore, aventi diametro di 1 µm e concentrazione pari a circa 5.000 beads/µL, sono stati ottenuti i risultati mostrati in tab. 2 (il campione è stato processato ad una velocità di 9,73 µL/min):

Il materiale di riferimento impiegato non ha una concentrazione certificata, il fornitore dichiara solamente che il contenuto è pari a circa 5.000 beads/µL (l'inaccuratezza è stata comunque calcolata considerando tale valore e risulta essere abbastanza elevata). Se si considera invece la media delle medie e l'intervallo di accettabilità al 95% (± 2 volte DS), tutti i valori rientrano nel range 5105 - 6088, di riferimento per la costruzione di una carta di controllo, il cui impiego permette di monitorare nel tempo la bontà dello strumento in oggetto.

Con l'impiego inoltre di sfere di silice di diverso diametro, si riesce a determinare la sensibilità dello strumento nei confronti del segnale di Forward-angle-light-scattering (Foladori et al., 2008), che risulta essere molto elevata, poiché il citometro discrimina segnali di particelle anche molto piccole (diametro pari a 0,5 µm).

8. RISULTATI OTTENUTI SU ACQUE REFLUE E FANGHI ATTIVI

La procedura descritta è stata applicata a campioni di fanghi attivi ed acqua reflue prelevati dall'impianto di depurazione di Trento Nord. Una sintesi dei risultati ottenuti è riportata in tabella 3.

La concentrazione media di batteri vitali è di 8,4 x 10¹⁰ cellule/L nel refluo grezzo, 2,3 x 10¹² cellule/L nei fanghi attivi, mentre si riduce a 1,7 x 10⁹ cellule/L nell'effluente trattato. La concentrazione media di batteri morti è di 6,9 x 10¹⁰ cellule/L nel refluo grezzo, 5,6 x 10¹¹ cellule/L nei fanghi attivi (24% dei batteri vitali), mentre si riduce a 3,6 x 10⁸ cellule/L nell'effluente trattato (21% dei batteri vitali).

La concentrazione media di SSV nei fanghi attivi è pari a 3,0 kgSSV/m³. I valori specifici dei batteri vitali sono stati espressi per unità di SSV solo nel caso dei fanghi attivi (in quanto SSV è un comune parametro di quantificazione dei fanghi attivi), mentre sono stati espressi per unità di COD nel caso delle acque reflue in ingresso ed in uscita dal depuratore, in quanto il parametro SSV non è di uso comune per caratterizzare le acque reflue.

Dati relativi alla quantificazione dei batteri in acque reflue e fanghi sono piuttosto rari nella letteratura scientifica, se si considerano unicamente metodi

Tabella 2. Risultati ottenuti nel controllo di FCM con sfere standard.

tipo di segnale*	n. letture	Media	Scarto tipo	CV %	incertezza %
Scattering FALS* (LS1)	10	5726	181,4	3,2	14,5
Fluorescenza verde (FL1)	10	5571	233,1	4,2	11,4
Fluorescenza rossa (FL3)	10	5611	228,1	4,1	12,2

Tabella 3. Risultati ottenuti nella quantificazione diretta, mediante FCM, delle cellule batteriche in acque reflue e fanghi attivi di un impianto di depurazione. Valori indicati come media \pm deviazione standard.

Parametro	Refluo grezzo	Fango attivo	Effluente trattato
Concentrazione di batteri vitali (cellule/L)	$(8,4 \pm 2,3) \times 10^{10}$	$(2,3 \pm 0,4) \times 10^{12}$	$(1,7 \pm 0,9) \times 10^9$
Concentrazione di batteri morti (cellule/L)	$(6,9 \pm 2,4) \times 10^{10}$	$(5,6 \pm 1,6) \times 10^{11}$	$(3,6 \pm 1,8) \times 10^8$
COD totale (mg/L)	721 \pm 212	4555 \pm 200	30 \pm 6
SSV (mg/L)	404 \pm 137	3053 \pm 138	8 \pm 4
Valori specifici			
Batteri vitali per unità SSV (cellule/gSSV)	-	$7,5 \times 10^{11}$	-
Batteri vitali per unità COD (cellule/gCOD)	$1,16 \times 10^{11}$	-	$5,7 \times 10^{10}$

molecolari e si escludono i metodi colturali che comportano sempre grossolane sottostime, pari ad ordini di grandezza. Nella letteratura i metodi molecolari sono molto diversificati includendo DAPI, FISH, PCR, ecc. e allo stato attuale il livello di applicazione di questi metodi non è esaustivo, rendendo difficoltose eventuali comparazioni, ma suggerendo la necessità di continuare il lavoro di ricerca in questo campo, che appare ad oggi estremamente promettente.

9. CONCLUSIONI

In questo studio è stato sviluppato un protocollo per l'enumerazione diretta dei batteri in campioni di fango attivo ed acque reflue grezze e depurate, grazie all'applicazione di una tecnica innovativa rappresentata dalla citometria a flusso. L'impiego contemporaneo di due fluorocromi ha permesso di determinare e quantificare rapidamente e con precisione le cellule totali, integre (vitali) e permeabilizzate (morte) presenti nel campione analizzato.

Per quanto riguarda i fanghi attivi, misurare la concentrazione dei batteri può permettere un'accurata interpretazione dei processi (da cui dipendono rendimenti depurativi, produzione di fanghi, consumo di ossigeno, ecc.) per una migliore gestione e verifica di funzionalità degli stessi.

Nel caso di acque reflue grezze e depurate, la citometria a flusso permette di avere una quantificazione realistica della concentrazione di batteri del campione e del livello di contaminazione microbiologica dello stesso, con verifica dell'efficacia dell'abbattimento batteriologico, sia nella filiera dell'impianto che nel caso di applicazione di sistemi di disinfezione.

BIBLIOGRAFIA

AULENTA F., ROSSETTI S., MAJONE M., TANDOI V., (2004): "Detection and quantitative estimation of *Dehalococcoides* spp. in a dechlorinating bioreactor by a combination of fluorescent in situ hybridisation (FISH) and kinetic analysis" *Applied microbiology and biotechnology*, 64 (2), 206-212.

BANKS C.J., WALKER I. (1977): "Sonication of activated sludge flocs and the recovery of their bacteria on solid media" *Journal of General Microbiology* 98, 363-368.

BERGQUIST P.L., HARDIMAN E.M., FERRARI B.C., WISLEY T. (2009): "Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology" *Extremophiles* 13, 389-401.

BIGGS, C.A., LANT, P.A. (2000): "Activated sludge flocculation: on-line determination of floc size and the effect of shear" *Water Research*, 34(9): 2542-2550.

EKAMA G.A., MARAIS G.V.R., SIEBRITZ I.P., PITMAN A.R., KEAY, G.F.P., BUCHAN, L., GERBER, A., SMOLLEN, M. (1984): "Theory, Design and Operation of Nutrient Removal Activated Sludge Processes" *Water Research Commission of South Africa*, Pretoria.

FALCIONI T., MANTI A.; BOI P.; CANONICO B.; BALSAMO M.; PAPA S. (2006): "Comparison of disruption procedures for enumeration of activated sludge floc bacteria by flow cytometry" *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 70(3):149-53.

FOLADORI P., BRUNI L., ANDREOTTOLA G., ZIGLIO G. (2007): "Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry - fecal indicators, wastewater and activated sludge" *Water Research*, 41: 235-243.

FOLADORI P., QUARANTA A., ZIGLIO G. (2008): "Use of silica microspheres having refractive index similar to bacteria for conversion of flow cytometric forward light scatter in biovolume" *Water Research*, 42(14): 3757-3766.

- FOLADORI P., BRUNI L., TAMBURINI S., ZIGLIO G. (2010): "Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry" *Water Research*, 44: 3807-3818.
- FRØLUND, B., PALMGREN, R., KEIDING, K., NIELSEN, P.H. (1996): "Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin" *Water Research* 30, 1749-1758.
- GILBRIDE, K.A., LEE, D.-Y., BEAUDETTE, L.A. (2006): "Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real time process control" *Journal of Microbiological Methods* 66, 1-20.
- HENZE, ET AL. (2000): "Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3" In: IWA Task Group on Mathematical Modelling for Design and Operation of Biological Wastewater Treatment (Ed.), Scientific and Technical Report No. 9. IWA Publishing, London, UK.
- JENKINS D., RICHARD M.G., DAIGGER G.T. (1993): "Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming" 2nd Edition. Lewis Publishers, Inc. - Chelsea, Michigan 48118 pp.
- LEVANTESI C., ROSSETTI S., THELEN K., KRAGELUND C., KROONEMAN J., EIKELBOOM D., NIELSEN P. H., TANDOI V. (2006): Phylogeny, physiology and distribution of 'Candidatus *Microthrix calida*', a new *Microthrix* species isolated from industrial activated sludge wastewater treatment plants. *Environmental microbiology*, 8 (9), 1552-1563.
- NEBE-VON-CARON G., STEPHENS P.J., HEWITT C.J., POWELL J.R., BADLEY R.A. (2000) Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 42: 97-114.
- PLOVINS, A., ALVAREZ, A.M., IBANˆEZ, M., MOLINA, M., NOMBELA, C. (1994) Use of fluorescein-di-b-D-galactopyranoside (FDG) and C12FDG as substrates for b-galactosidase detection by flow cytometry in animal, bacterial and yeast cells. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (12), 4638-4641.
- PORTER J., DEERE D., HARDMAN M., CLIVE EDWARDS C., PICKUP R. (2006) Go with the flow - use of flow cytometry in environmental microbiology. *FEMS Microbiology Ecology* 42(2): 93.101.
- ROSSETTI S. NIELSEN P., TOMEI M.C., TANDOI V. (2005): *Microthrix parvicella* in activated sludge systems: an overview of the physiological and kinetic properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 29, 49-64.
- STEEN, H.B. (2000) Flow cytometry of bacteria: glimpses from the past with a view to the future. *Journal of Microbiological Methods* 42, 65-74.
- VIVES-REGO, J., LEBARON, P., NEBE-VON CARON, G. (2000) Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 429-448.
- VOLLERTSEN, J., JAHN, A., NIELSEN, J.L., HVITVED-JACOBSEN, T., NIELSEN, P.H. (2001) Comparison of methods for determination of microbial biomass in wastewater. *Water Research* 35, 1649-1658.
- WAGNER M., AMANN R., LEMMER H., SCHLEIFER K.H. (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied Environmental Microbiology*, 59(5): 1520-1525.
- WILLIAMS, A.R., FORSTER, C.F., HUGHES, D.E. (1971) Using an ultrasonic technique in the enumeration of activated sludge. *Effluent and Water Treatment Journal* 11, 83-86.
- ZHANG, P., ZHANG, G., WANG, W. (2007) Ultrasonic treatment of biological sludge: floc disintegration, cell lysis and inactivation. *Bioresource Technology* 98, 207-210.
- ZIGLIO G., ANDREOTTOLA G., BARBESTI S., BOSCHETTI G., BRUNI L., FOLADORI P., VILLA R. (2002) Assessment of activated sludge viability with flow cytometry. *Water Research*, 36: 460-468.

Sviluppi applicativi della citometria a flusso nelle pratiche di monitoraggio delle acque

a cura di

Stefano Amalfitano (*), Istituto di Ricerca sulle Acqua – CNR, Monterotondo, RM

La citometria a flusso consente la quantificazione e caratterizzazione multiparametrica di cellule e particelle presenti in una sospensione liquida sulla base delle specifiche proprietà ottiche di ogni singolo evento analizzato. Dopo oltre 50 anni di evoluzione strumentale e metodologica, questa tecnologia analitica è ad oggi molto diffusa e consolidata nella ricerca biomedica e nella diagnostica clinica (Robinson & Roederer, 2015). Soprattutto nei campi dell'oncematologia e dell'immunologia, il livello di standardizzazione metodologica che è stato raggiunto non richiede necessariamente la formazione di personale altamente qualificato e, di conseguenza, ogni laboratorio pubblico o privato per analisi biologiche è dotato di un citofluorimetro o di analoghe strumentazioni certificate (*cell counter*) per il conteggio automatizzato e la fenotipizzazione di linee cellulari in liquidi di origine biologica.

Dopo aspirazione e iniezione del campione nel sistema fluidico, lo strumento genera un flusso laminare tramite un liquido di guaina (*sheath fluid*) e le particelle in sospensione vengono allineate e spinte ad attraversare singolarmente un punto di eccitazione luminosa, solitamente determinata da un fascio di luce laser. Il processo è noto come focalizzazione idrodinamica (*hydrodynamic focusing*). Diverse proprietà fisiche e chimiche possono essere determinate a livello di singola particella scansionata, rilevando la diffusione o *scatter* della luce (segnali di *forward* e *side scatter*) e la presenza di fluorofori, cioè composti che generano fluorescenza quando eccitati ad una lunghezza d'onda appropriata. Nel punto di interroga-

zione i fluorofori, eventualmente presenti all'interno di una cellula, assorbono l'energia del fascio laser ed emettono fotoni in un intervallo di lunghezze d'onda, in proporzione alla quantità di luce incidente e al numero di molecole fluorescenti. I fotoni vengono rilevati da fotomoltiplicatori che, dotati di filtri dicroici selettivi, amplificano i segnali di fluorescenza e luce diffusa anche di bassa intensità. I dati raccolti vengono quindi convertiti in informazioni digitali e un software consente l'analisi multiparametrica e la visualizzazione multidimensionale dei dati relativi ad ogni singolo evento acquisito (ogni particella o cellula è visibile come un punto sul grafico o citogramma). Migliaia di particelle al secondo possono essere analizzate consentendo una specifica caratterizzazione morfologico-strutturale e fornendo una quantificazione diretta della loro abbondanza nel liquido di origine. La versatilità applicativa della tecnica deriva anche dalla varietà di sorgenti luminose (laser a diverse lunghezze d'onda) e fluorofori commercializzati che possono essere utilizzati per la marcatura selettiva di svariate componenti eso- ed endocellulari (Manti et al., 2012) (Fig. 1).

Nonostante gli sviluppi strumentali e gli interessi commerciali siano ancora chiaramente rivolti a soddisfare le esigenze del settore clinico-medico, le applicazioni della citometria a flusso sono state adattate con successo alla ricerca microbiologica ambientale e applicata. Le potenzialità sono legate principalmente alla rapidità analitica, che permette di rilevare in tempo reale la presenza di popolazioni eterogenee di microrganismi in soluzione, fornendo una vasta gamma di

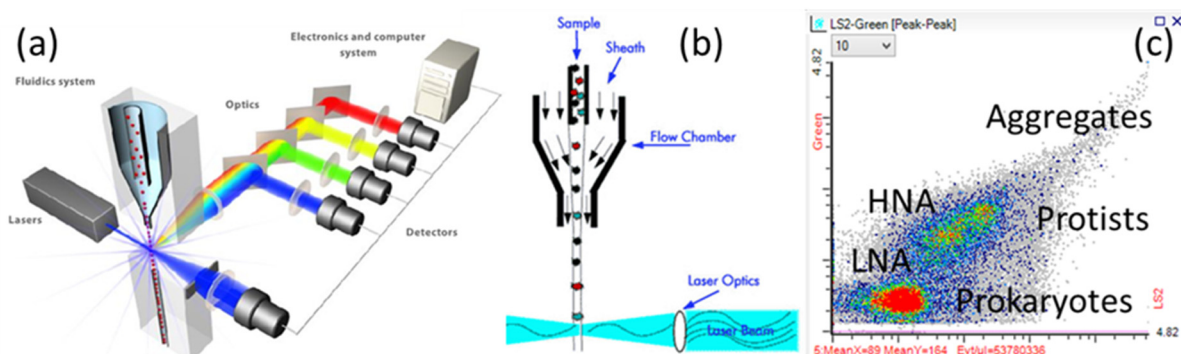


Figura 1. Rappresentazione schematica del funzionamento di un citometro a flusso (a) e del processo di focalizzazione idrodinamica (b). Esempio di citogramma di un campione di acqua superficiale a seguito di marcatura con il fluoroforo Sybr Green I. Ogni punto sul diagramma di densità identifica uno o più eventi rilevati dal sistema (c).

* amalfitano@irsa.cnr.it

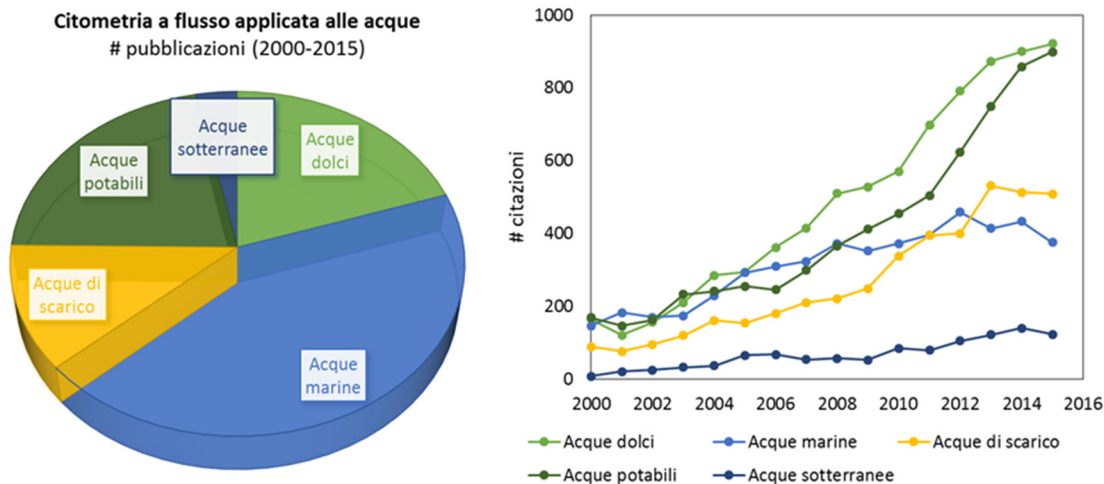


Figura 2. Numero di pubblicazioni e citazioni degli articoli scientifici che hanno applicato la citometria a flusso per l’analisi delle acque destinate all’uso umano negli ultimi 15 anni (fonte Scopus).

informazioni e parametri cellulari a livello di singola cellula (Amalfitano et al., 2015).

I primi studi pionieristici per l’identificazione citometrica di microorganismi acquatici risalgono agli anni ’80, e un gran numero di protocolli è attualmente disponibile per la caratterizzazione quali-quantitativa di cellule procariotiche (batteri, cianobatteri e archaea in un intervallo dimensionale di 0,2-2 µm), ma anche virus (con capsidi >0,02 µm) e microrganismi di maggiori dimensioni (<200 µm) come protisti, pico- e microalghe fotosintetiche (Gasol & Moran, 2015).

La letteratura scientifica sta documentando l’utilizzo della citometria a flusso per valutare lo stato di qualità microbiologica delle acque destinate all’uso umano, nel senso più ampio del termine, come testimoniato dal crescente numero di articoli pubblicati e citazioni ricevute in ogni ambito ambientale e biotecnologico (Fig. 2).

Lo stato delle risorse idriche è stato messo in relazione alla presenza di specifiche caratteristiche “citometriche” della comunità microbica in tutti gli ecosistemi acquatici naturali, comprese le acque sotterranee, superficiali, marine costiere e profonde (Amalfitano et al., 2014; Boi et al., 2016; Casotti, 2010). Inoltre diversi indici citometrici sono stati utilizzati per valutare l’efficienza e le prestazioni di sistemi ingegnerizzati per il trattamento delle acque, come impianti di potabilizzazione, di desalinizzazione o gestione delle acque reflue (Foladori et al., 2010; Van Der Merwe et al., 2014; Wang et al., 2010). Anche numerosi impianti industriali possono beneficiare di metodi citometrici per il controllo delle acque di processo, ad esempio nella preparazione di prodotti farmaceutici e alimentari (Diaz et al., 2010). Recentemente è stato messo a punto e testato con successo un prototipo strumentale, on-line, automatizzato e programmabile, per eseguire analisi citometriche in tempo reale e valutare l’evoluzione qualitativa dell’acqua potabile in termini microbiologici, dalle fasi di trattamento fino al rubinetto domestico (Besmer et al., 2014). Le applicazioni in situ sono dirette anche alla miniaturizzazione degli strumenti, consentendo

quindi il loro utilizzo anche su unità mobili (es., navi e veicoli di trasporto) e postazioni fisse (es., boe e piattaforme off-shore), con la possibilità di controllo e trasferimento dati in remoto (Campbell et al., 2013; Pomati et al., 2011; Thyssen et al., 2008).

Nonostante i notevoli sviluppi applicativi, l’unica normativa nazionale che include la citometria a flusso tra i metodi analitici necessari per il controllo qualitativo delle risorse idriche è in vigore in Svizzera (SLMB 2012). In Italia e nella maggior parte dei paesi industrializzati, la contaminazione microbiologica di acque destinate all’uso umano viene ancora valutata in modo esclusivo con metodi di coltivazione su terreni selettivi, basati sul conteggio delle unità formanti colonia (batteri vitali coltivabili) e sulla presenza di specie indicatrici di contaminazione fecale (es. *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.). Si tratta di pratiche consolidate dagli inizi del diciannovesimo secolo il cui limite principale è però legato alle basse efficienze di coltivazione (solo lo 1-10% dei batteri attualmente conosciuti è in realtà coltivabile) e alle lunghe tempistiche analitiche (> 24-48h, a seconda delle specie di interesse).

Anche la citometria a flusso presenta ovviamente dei limiti tecnici che hanno contribuito alla sua lenta diffusione in campo ambientale e nel monitoraggio delle acque. Tra questi vanno citati gli alti costi di acquisizione, la mancanza di protocolli standardizzati e la formazione del personale per l’analisi di dati multiparametrici che, soprattutto se automatizzata, presenta difficoltà matematiche di non semplice soluzione. Tuttavia, proprio grazie ai continui sviluppi tecnologici, è facile prevedere che l’uso di questa tecnica si consoliderà tra le pratiche di monitoraggio ambientale, così come è ormai avvenuto nella ricerca biomedica, fornendo quindi un supporto rilevante ai tradizionali metodi di identificazione dei microrganismi acquatici per una più accurata e rapida valutazione della qualità microbiologica delle acque destinate all’uso umano.

BIBLIOGRAFIA

- AMALFITANO, S., DEL BON, A., ZOPPINI, A., GHERGO, S., FAZI, S., PARRONE, D., STANO, F., & PREZIOSI, E. (2014). Groundwater geochemistry and microbial community structure in the aquifer transition from volcanic to alluvial areas. *Water Research*, 65: 384-394.
- BESMER, M., WEISSBRODT, M. D., KRATOCHVIL, B., SIGRIST, J. A., WEYLAND, M. S. AND HAMMES, F. (2014). The feasibility of automated on line flow cytometry for in-situ monitoring of microbial dynamics in aquatic ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 5: 265.
- BOI, P., AMALFITANO, S., MANTI, A., SEMPRUCCI, F., SISTI, D., ROCCHI, M. B., BALSAMO, M., & PAPA, S. (2016). Strategies for water quality assessment: a multiparametric analysis of microbiological changes in river waters. *River Research and Applications* 3, 490-500.
- BUTTINO I., CABRINI M., MANGONI O., PENNA A., TOTTI C. (eds.) *Metodologie di studio del plancton*
- CAMPBELL, L., HENRICHS, D.W., OLSON, R. J. AND SOSIK, H. M. (2013). Continuous automated imaging-inflow cytometry for detection and early warning of *Karenia brevis* blooms in the Gulf of Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 6896-6902.
- CASOTTI R. La citometria a flusso per lo studio dei microorganismi planctonici. (2010) In: Socal G.,
- DÍAZ, M., HERRERO, M., GARCÍA, L. A., & QUIRÓS, C. (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical engineering journal*, 48(3): 385-407.
- FOLADORI, P., BRUNI, L., TAMBURINI, S., & ZIGLIO, G. (2010). Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry. *Water Research*, 44(13): 3807-3818.
- GASOL, J.M., & MORAN, X.A.G. (2015). Flow cytometric determination of microbial abundances and its use to obtain indices of community structure and relative activity. pp. 1-29. *Springer Protocols Handbooks*.
- MANTI, A., BOI, P., & PAPA, S. (2012). *What Flow Cytometry Can Tell Us About Marine Micro-Organisms-Current Status and Future Applications*. INTECH Open Access Publisher.
- POMATI, F., JOKELA, J., SIMONA, M., VERONESI, M. AND IBELINGS, B. W. (2011). An automated platform for phytoplankton ecology and aquatic ecosystem monitoring. *Environmental Science and Technology* 45: 9658-9665.
- ROBINSON, J. P., & ROEDERER, M. (2015). Flow cytometry strikes gold. *Science*, 350(6262), 739-740.
- SLMB, 2012. Determining the total cell count and ratios of high and low nucleic acid content cells in freshwater using flow cytometry. Analysis method 333.1, Swiss food book. Federal Office of Public Health, Swiss Confederation.
- THYSSEN, M., TARRAN, G. A., ZUBKOV, M. V., HOLLAND ROSS, J., GREGORI, G., BURKILL, P. H. AND DENIS, M. (2008). The emergence of automated high-frequency flow cytometry: revealing temporal and spatial phytoplankton variability. *Journal of Plankton Research*, 30: 333-343.
- VAN DER MERWE, R., HAMMES, F., LATTEMANN, S., & AMY, G. (2014). Flow cytometric assessment of microbial abundance in the near-field area of seawater reverse osmosis concentrate discharge. *Desalination*, 343: 208-216.
- WANG, Y., HAMMES, F., DE ROY, K., VERSTRAETE, W., & BOON, N. (2010). Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in biotechnology*, 28(8): 416-424.

Circuito di qualificazione per il riconoscimento microscopico su base morfologica dei batteri filamentosi del fango attivo: risultati dei quattro circuiti effettuati

a cura di

Claudia Davoli (*), Lorena Guglielmi, Cristina Stefanini, Gruppo Iren - sede di Reggio Emilia

RIASSUNTO

Vengono presentati i risultati di quattro Circuiti di Qualificazione effettuati negli anni 2008, 2010, 2012 e 2014, per la caratterizzazione microscopica del fango attivo e il riconoscimento su base morfologica dei batteri filamentosi. Nel corso del tempo sono stati apportati aggiustamenti al protocollo di valutazione ed i risultati possono essere considerati soddisfacenti: nell'intero periodo hanno ottenuto il Certificato di Qualificazione circa l'80% dei Laboratori che hanno partecipato al Circuito.

SUMMARY

The results of four Qualification Circuit Test, made in 2008, 2010, 2012 and 2014, for microscopic activated sludge characterization and filamentous bacteria description. Several adjustments have been introduced in the defined protocol and the results can be considered satisfying: in the whole period almost 80 % of participating Laboratories have obtained the Qualification Certificate.

1. INTRODUZIONE

L'analisi microscopica dei fanghi attivi è entrata ormai da diversi anni a far parte del monitoraggio routinario degli impianti di depurazione a fanghi attivi. Essa è risultata essere un valido aiuto per comprendere il reale funzionamento degli impianti, ma anche e soprattutto per riuscire ad intervenire in casi di mal-funzionamento e/o problemi gestionali, consentendo di individuare le disfunzioni presenti e fornendo un valido aiuto nel definire i migliori interventi da applicare. Questo tipo di analisi, pur non essendo rigorosa, se effettuata da personale esperto, presenta il vantaggio di essere relativamente veloce e riesce a valutare i reali impatti dovuti all'ingresso di reflui particolari, a errate manovre gestionali o a variazioni impiantistiche.

Dalle diverse esperienze maturate negli anni precedenti è stato possibile verificare e mettere in pratica molte delle indicazioni presenti in bibliografia per affrontare problemi come *bulking* e *foaming* negli impianti a biomassa sospesa; alcune di queste esperienze sono state descritte in alcuni specifici Manuali (Jenkins et al 2006, Tandoi et al. 2006, Ramadori Ed, 1999, Madoni et al. 2005). Da tutto ciò è stato possibile determinare un tipo di approccio che mira a minimizzare la possibilità di insorgere di questi problemi, iniziando ad applicare i criteri studiati già al momento della costruzione o della ristrutturazione di impianti.

Tra gli interventi di maggior impatto sul processo biologico in generale la presenza di selettori, per la maggior parte anossici, in testa al comparto biologico è risultata essere un punto importante, tanto che da alcuni anni è pratica consolidata, in fase di costruzione e/o ristrutturazione di impianti, inserire un comparto in testa alla vasca di denitrificazione/ossidazione che possa essere attivato come selettore della biomassa. L'inserimento di questo piccolo com-

parto ha portato ad una netta diminuzione di problematiche legate alla cattiva sedimentabilità del fango e alla formazione di schiume biologiche.

2. I CORSI DI FORMAZIONE

Grazie ai numerosi corsi tenuti in Italia a partire dagli anni 90 (corsi CNR IRSA internazionali di Perugia, Corsi presso Iren a Reggio Emilia) si è formato un nutrito gruppo di operatori in grado di eseguire l'analisi microscopica dei fanghi attivi per il riconoscimento dei batteri filamentosi responsabili di fenomeni di *bulking* e *foaming*. Alcuni operano in laboratori che hanno scelto di certificare o accreditare tale prova analitica ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 del 2005. In Italia il riferimento metodologico è costituito dal Quaderno IRSA CNR Q110:1999 Appendice A (Ramadori Ed., 1999), il quale consente di adottare una traccia analitica, ovvero una scheda di rilevazione dei risultati dell'osservazione microscopica a 100 ed a 1000 ingrandimenti, e indica criteri comuni, ad esempio per la stima della classe di abbondanza dei batteri filamentosi, per eseguire un'analisi che altrimenti sarebbe del tutto qualitativa.

3. RISULTATI

Mentre all'interno di un unico laboratorio la congruità dei risultati tra analisi condotte da più operatori qualificati in modo indipendente sullo stesso campione può essere sufficiente a garantire la bontà dell'esito analitico, per laboratori con un solo operatore qualificato o che eseguono l'analisi saltuariamente, diventa indispensabile dimostrare la propria affidabilità analitica ed il mantenimento della competenza tecnica degli operatori tramite il confronto con altri laboratori.

* claudia.davoli@gruppoiren.it

Tabella 1. Dati salienti dei 4 circuiti organizzati

Anno	Numero partecipanti	Numero esperti	Risultati positivi campione A	Risultati positivi campione B	Risultati negativi/laboratori non qualificati
2008	23	8	21	18	7/6
2010	13	8	13	12	1/1
2012	15	8	9	14	6/5
2014	19	8	18	19	1/1

Nel 2008 il laboratorio Enia di Reggio Emilia, oggi gruppo Iren, in collaborazione con IRSA-CNR ed Università di Parma, ha organizzato il 1° circuito interlaboratoriale per l'analisi microscopica dei fanghi attivi coinvolgendo alcuni analisti "esperti" nella scelta delle modalità e nella redazione del Regolamento del circuito. Gli analisti Esperti erano otto: Valter Tandoi e Caterina Levantesi (CNR-IRSA), Paola Miana (VERITAS), Alessandra Goffredi (Uniacque spa), Gianpiero Cesaro (Impianto di Depurazione Area Nolana), Claudia Davoli, Lorena Guglielmi e Cristina Stefanini (Iren); la prima versione del Regolamento è reperibile presso il Notiziario dei Metodi Analitici, IRSA CNR, 2008.

Il circuito ha cadenza biennale, prevede il superamento tramite l'acquisizione di un punteggio minimo sulla base della congruità tra l'analisi eseguita dai partecipanti e quella eseguita dagli "esperti" su due campioni di fango, denominati A e B. I campioni di fango provengono da impianti di depurazione civili o industriali; la scelta del campione "idoneo" viene condotta da un gruppo di esperti nella settimana che precede la spedizione, lo stesso gruppo controlla le caratteristiche del campione prima della spedizione e ne esegue l'analisi, al pari dei partecipanti, nei tempi stabiliti dal circuito. In questa fase vengono eseguite anche delle immagini fotografiche per fissare le caratteristiche del fiocco, la classe di abbondanza dei filamentosi, l'aspetto dei batteri filamentosi principali e le relative risposte alle colorazioni differenziali normalmente utilizzate per il riconoscimento (Gram e Neisser).

Nel 2008 e 2010 vennero condotte analisi per più giorni consecutivi per monitorare la stabilità delle caratteristiche dei campioni di fango. Vista la relativa stabilità dei campioni si è deciso di spedire piccole aliquote di campione, circa 20 ml, in contenitori refrigerati tramite corriere veloce in modo che tutti i partecipanti possano eseguire l'analisi in tempi prestabiliti, ad esempio entro 5 giorni dal prelievo, e comuni a tutti, compresi gli esperti.

Ai partecipanti viene consegnata la scheda di registrazione dei risultati insieme alle modalità di compilazione ed al regolamento prima dell'invio dei campioni; le schede compilate dagli "esperti" sono elaborate in tempi brevi, prima dell'arrivo delle schede dei partecipanti, in modo da far emergere eventuali incongruenze. La Moda di ogni voce della scheda indicata dagli esperti è la base di valutazione per le schede dei partecipanti. Nella determinazione dei punteggi viene premiata la massima concordanza con la Moda. Dopo l'inoltro ai partecipanti del Rapporto di prova finale, il quale contiene la sintesi delle schede degli

esperti ed i punteggi di tutti i partecipanti in forma anonima, viene convocata una riunione di tutti gli interessati per discutere i risultati ottenuti ed, eventualmente, pianificare momenti formativi o modifiche ai successivi circuiti. Questo momento è particolarmente significativo perché, insieme al confronto sulle caratteristiche dei campioni, grazie alla presenza di ricercatori ed esponenti del campo applicativo nel gruppo di esperti, può consentire un aggiornamento sulle tecniche di riconoscimento o sull'ecologia dei batteri filamentosi.

4. CONCLUSIONI

Il primo circuito (Tabella 1) servì a mettere a punto le modalità di svolgimento, tanto che molte difficoltà nell'elaborazione dei risultati furono dovute ad insoddisfacente compilazione delle schede. Il circuito del 2014 è quello in cui si registrano le migliori prestazioni dei partecipanti, malgrado problemi legati al trasporto del campione; nel 2010 invece si dovette ricorrere all'analisi con tecniche di marcatura genetica (FISH) eseguite presso i laboratori IRSA CNR di Roma per dirimere dubbi sorti tra gli esperti rispetto al riconoscimento della specie Dominante del campione A. In tutti gli altri casi la concordanza tra gli esperti basata sull'analisi morfologica associata alle colorazioni Gram e Neisser è sempre stata buona, come dimostrato dai risultati dell'analisi degli esperti riportati nella tabella 2.

5. BIBLIOGRAFIA

MADONI P., DAVOLI C., DAVOLI D., GUGLIELMI L., PERGETTI M., STEFANINI C., 2005, *Depurazione biologica nei fanghi attivi*, ENIA S.p.A Ed., Reggio Emilia

Notiziario Metodi Analitici (2008): 1° Circuito interlaboratoriale di qualificazione per l'analisi microscopica dei batteri filamentosi dei fanghi attivi. 2, 11-13.

JENKINS D., M.G. RICHARD, G.T. DAIGGER, 2006 *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming and other solids separation problems*, 3rd Ed. Lewis Publishers

RAMADORI R. Ed.: *Quaderno IRSA CNR 110, 1999, Il problema del bulking filamentoso e delle schiume biologiche negli impianti a fanghi attivi*

TANDOI V., JENKINS D., WANNER J. 2006, *Activated sludge separation problems, theory, control measures, practical experience*. IWA STR N° 16

Tabella 2. Dettaglio delle valutazioni dei vari esperti nella caratterizzazione dei campioni di fango attivo esaminati

Campione/ parametri della scheda	2008 A	2008 B	2010 A	2010 B	2012 A	2012 B	2014 A	2014 B
Classe di abbondanza dei filamenti	Frequenti (8)	Frequenti (5) Moderati (3)	Abbondanti (6) Frequenti (2)	Pochi(1) Moderati (5) Frequenti (2)	Abbondanti (8)	Pochi (2) Moderati (5) Frequenti (1)	Moderati (6) Frequenti (2)	Alcuni(4) Moderati (4)
Effetto dei filamenti sulla struttura del fiocco	Ponti tra i fiocchi (6) Nessuno (2)	Nessuno (4) Maglia larga (4)	Ponti tra i fiocchi (8)	Nessuno (6) Maglia larga (2)	Ponti tra i fiocchi (8)	Nessuno (8)	Nessuno (5) Ponti tra i fiocchi (3)	Nessuno (7) Maglia larga (1)
Diametro del fiocco	Medio (7) Piccolo (1)	Medio (7) Grande (1)	Medio (5) Piccolo (3)	Medio (8)	Medio (6) Piccolo (2)	Medio(6) Piccolo (2)	NA	NA
Aspetto del liquido tra i fiocchi	Limpido (7) Frammenti (1)	Limpido (6) Frammenti (1) Filamenti liberi (1)	Filamenti liberi (7) Limpido (1)	Limpido (7) cellule libere (1)	Limpido(6) Filamenti liberi (2)	Limpido (6) Filamenti liberi (2)	Limpido (8)	Limpido (8)
Morfologia del fiocco	Irregolare (6) rotondeggiante (2) Compatto (8)	Irregolare (8) Frammentato (8)	Rotondeggiante (5); irregolare (3) Resistente (6)- debole (2)	Irregolare (8); Resistente (6); debole (2)	Irregolare (8) Resistente (6); debole (2)	Irregolare (6)- Rotondeggiante (2) Resistente (6) (6)-debole (2)	Irregolare (7) Rotondeggiante (1) Resistente (8)	Irregolare (7) Rotondeggiante (1) Debole (6) Resistente (2)
Morfotipo Dominante	Tipo 021N (8)	N.limicola (6) tipo 0092 (2)	N.limicola (5) Tipo 021N (3)	Tipo 0041/0675 (5) N.limicola (3)	Tipo 021N (8)	MACO (8)	Tipo 0041/0675 (4) MACO (4)	Tipo 0041 /0675 (8)
Morfotipi secondari	Tipo 0041/0675(6) -Thiothrix (6) N.limicola (1) Tipo 1851 (1) Tipo 0092 (1) H.hydroxysys (1)	N.limicola (2) Tipo 0092 (6) Tipo 0041/0675 (5) M.parvicella (3)	H. hydroxysys (8) Tipo 0041/0675 (4) N.limicola (2) Thiothrix (1) Tipo 0914 (1)	Tipo 0041/0675 (3) N.limicola (5) M.parvicella(6) Tipo 0092 (2)	Maco (8) Tipo 0041/0675 (4) Tipo 1851 (4)	Tipo 0041/0675(8) Tipo 0092 (7) Tipo 1851 (1)	Tipo 1851 (8) Tipo 0041/0675 (4) MACO (4) Tipo 021N (1)	Thiothrix (6)-tipo 0092 (4) N.limicola (3) funghi (2)- H.hydroxysys (1) Tipo 021N (1)

Tra parentesi il numero di esperti che ha fornito la medesima indicazione. In corsivo la Moda. Il punteggio maggiore è assegnato per la coincidenza con le prime tre specie indicate dagli esperti (Dominante e 2 Secondari)



Bonifica ex situ di suoli contaminati mediante polimeri assorbenti e loro successiva rigenerazione in reattori a doppia fase (Two-Phase Partitioning Bioreactor - TPPB)

XXVII ciclo di Dottorato in Ingegneria Chimica e dei Processi

Università degli Studi di Roma La Sapienza

D.ssa Domenica Mosca Angelucci

La tematica affrontata in questo progetto di dottorato riguarda le problematiche connesse alla presenza di composti xenobiotici nelle diverse matrici ambientali e la loro rimozione mediante tecnologie innovative. Oggetto dello studio è l'applicazione di reattori a doppia fase (TPPB - Two Phase Partitioning Bioreactors) al biorisanamento ex situ di suoli contaminati da composti fenolici mono e pluri-sostituiti (inquinanti molto diffusi negli scarichi industriali e costituenti di pesticidi).

La tecnologia proposta prevede l'applicazione dei reattori TPPB, già testati con successo nel trattamento di reflui industriali, in combinazione con un processo di estrazione polimero-suolo. Il principio di funzionamento dei TPPB è basato sull'impiego di una fase di partizione (solvente organico o polimero) biocompatibile con la biomassa ed in grado di immagazzinare elevate quantità di contaminante che si distribuisce, in funzione del coefficiente di partizione, tra la fase acquosa e la fase di partizione. Nell'applicazione dei TPPB alla bonifica ex situ di suoli contaminati il concetto di base è l'utilizzo di una fase di estrazione (polimero granulare) in grado di assorbire i contaminanti presenti nel suolo e la sua successiva biorigenerazione in un reattore biologico TPPB in cui il polimero costituisce la fase di partizione, secondo il processo a doppio stadio riportato in Figura 1.

I vantaggi di tale soluzione tecnologica rispetto alle soluzioni convenzionali sono riconducibili a:

- realizzazione dell'intervento di bonifica in tempi molto brevi e a costi contenuti;
- completa degradazione del contaminante realizzata con la biorigenerazione del polimero che può essere successivamente riutilizzato per ulteriori cicli di trattamento.

L'applicabilità della soluzione tecnologica proposta è stata verificata in laboratorio per una vasta gamma di contaminanti, quali composti fenolici, idrocarburi a basso peso molecolare, idrocarburi policiclici aromatici, policlorobifenili.

Nel progetto di dottorato (svolto in collaborazione tra il Dipartimento di Ingegneria Chimica, Materiali e Ambiente dell'Università La Sapienza di Roma, relatore Prof. M. Cristina Annesini, e l'IRSA-CNR, correlatore Ing. Maria Concetta Tomei) l'attività di ricerca si è articolata sulla sperimentazione della tecnologia TPPB per diversi casi di studio al fine di valutarne l'effettiva applicabilità, sul confronto della tecnologia proposta con altre tecnologie di biorisanamento convenzionali, quali i bioreattori in fase semi-solida. È stata inoltre affrontata la modellizzazione dei processi coinvolti nella tecnologia sperimentata, con lo scopo di comprendere le interazioni tra i meccanismi di trasferimento di materia e quelli della cinetica biologica nel sistema investigato. La fattibilità del processo è stata sperimentalmente verificata per due diversi casi di contaminazione: inizialmente sono stati testati suoli contaminati da 4-nitrofenolo per l'ottimizzazione

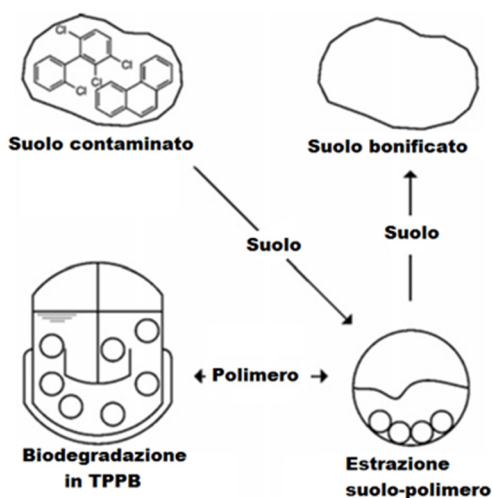


Figura 1. Schema del processo a doppio stadio

News

della strategia operativa da seguire per le fasi di estrazione e rigenerazione. Successivamente sono stati esaminati casi di contaminazione più complessi, ossia suoli contenenti clorofenoli mono e pluri-sostituiti (4-clorofenolo, 2,4-diclorofenoli e pentaclorofenolo) singoli e in miscela binaria e ternaria.

A monte dell'applicazione di tale tecnologia è necessario mettere a punto una strategia di ottimizzazione della fase di estrazione. Diversi polimeri commerciali sono stati testati in uno screening preliminare allo scopo di selezionare la fase di partizione con maggiore affinità per i contaminanti investigati, ossia in grado di fornire le migliori prestazioni di "uptake" (nella fase di estrazione da suolo) e "release" (nella fase di rigenerazione biologica).

Una volta individuato il polimero da utilizzare per la sperimentazione, l'Hyrel 8206 (DuPont, Canada), l'estrazione di contaminanti dal suolo mediante polimero è stata valutata a diverse condizioni operative, variando il livello di contaminazione del suolo (0,1-10 mg/kg), il rapporto suolo/polimero (2-10% v/v) e il grado di umidità del suolo (0-100%). Dettagli procedurali relativi alle analisi di contaminanti nelle varie matrici solide e liquide e condizioni operative delle fasi abiotiche e biotiche della sperimentazione sono riportate in Tomei et al., 2013; Tomei et al., 2015; Mosca Angelucci e Tomei, 2015a.

Sono state ottenute efficienze di rimozione del 70-90% in sole 24 ore di trattamento operando con il 100% di umidità e senza aggiunta di solventi per favorire il processo di estrazione.

È stata quindi investigata la fase di processo relativa alla rigenerazione biologica del polimero contaminato mediante prove di biodegradazione in batch, finalizzate all'ottimizzazione delle condizioni operative e alla verifica del riutilizzo del polimero rigenerato. Prima di procedere con la fase

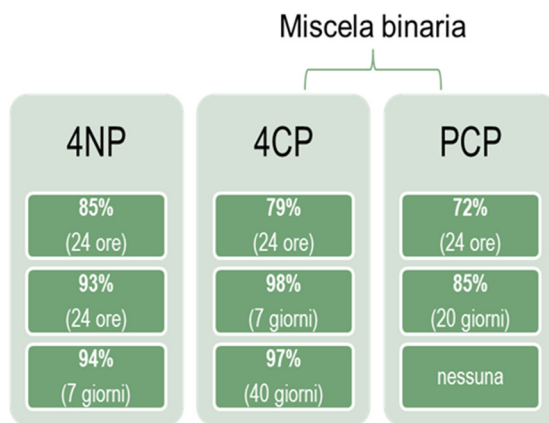


Figura 2. Efficienze di rimozione e tempi richiesti nel caso del 4-nitrofenolo (4NP) e della miscela costituita da 4-clorofenolo (4CP) e pentaclorofenolo (PCP)

rigenerativa, è stato necessario sviluppare una biomassa capace di biodegradare i contaminanti testati. A tale scopo, sono state arricchite in reattori SBR aerobici delle colture microbiche provenienti dall'impianto di depurazione di reflui civili di Roma nord (Tomei et al., 2014; Mosca Angelucci e Tomei, 2015b). Le prove di biorigenerazione dei polimeri hanno raggiunto efficienze dell'ordine dell'85-99%, anche nel caso di composti di difficile biodegradabilità come il pentaclorofenolo, favorendo il riuso del polimero in successivi cicli di trattamento. Anche in questo secondo stadio di processo, i tempi relativi alla biorigenerazione sono sensibilmente ridotti rispetto a quelli tipici dei trattamenti di biorisanamento ex situ.

A completamento dello studio di fattibilità, è stato effettuato un confronto

News

tecnologico con un metodo di bonifica ex situ convenzionalmente utilizzato, i reattori in fase semi-solida (slurry bioreactors), operanti con sospensioni di suolo in acqua al 10-40% in peso. Il processo a doppio stadio ha fornito, rispetto al sistema slurry, prestazioni superiori (Tomei et al., 2013; Mosca Angelucci e Tomei, 2016), soprattutto nel caso dei clorofenoli (Figura 2) con velocità di biodegradazione pari a 88,5 e 29,7 mg/(L d), rispettivamente per il 4-clorofenolo (4CP) e il pentaclorofenolo (PCP). Nel reattore slurry la velocità di biodegradazione del 4CP è stata pari a 18,8 mg/(L d), mentre il PCP non è stato degradato. I vantaggi della tecnologia TPPB, in confronto ad altre tecniche di bonifica ex situ convenzionali non si limitano solo alle migliori prestazioni: oltre alle elevate efficienze di rimozione ottenute, infatti, è stata riscontrata una sensibile riduzione dei volumi impiantistici e quindi dei costi sia di impianto che di esercizio, derivanti dalla concentrazione del contaminante in volumi sino al 2% di quelli del suolo da trattare. Il mancato contatto diretto tra il suolo e un solvente, oppure tra suolo e biomassa,

è un ulteriore vantaggio dal momento che non si va incontro alla rimozione della microflora e dei nutrienti del suolo e il depauperamento delle sue qualità.

L'ultima parte dello studio è stata focalizzata sulla modellizzazione matematica del processo e sullo sviluppo di uno schema applicativo. Il modello proposto include una descrizione completa dei complessi fenomeni di trasferimento di massa e reazioni biologiche che avvengono in entrambe le fasi di estrazione e biorigenerazione e ha dato ottimi risultati nella simulazione dei dati sperimentali di cui un esempio è riportato in Figura 3.

I risultati del presente progetto di dottorato sono riportati nei lavori elencati in bibliografia.

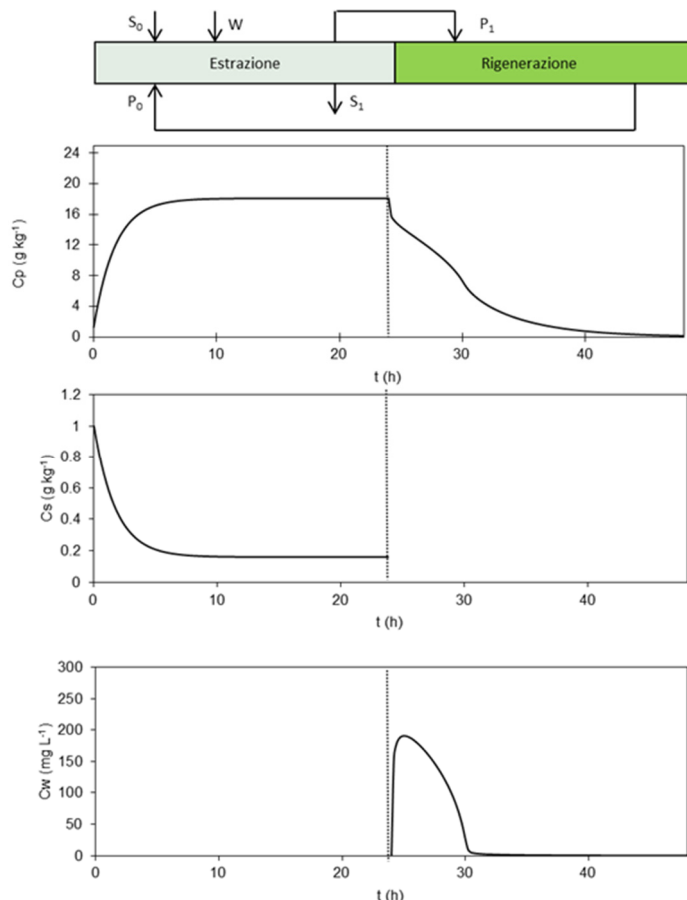


Figura 3. Modellizzazione e sviluppo dello schema di processo: simulazione delle concentrazioni di 4-nitrofenolo nel polimero (C_P), nel suolo (C_S) e nell'acqua (C_W).

News

BIBLIOGRAFIA

MOSCA ANGELUCCI D., TOMEI M.C. (2016) Ex situ remediation of chlorophenol contaminated soil: comparison of slurry and two phase partitioning bioreactors. *J Chem Technol Biotech*, DOI: 10.1002/jctb.4882.

MOSCA ANGELUCCI, D., TOMEI, M.C. (2015a) Regeneration strategies of polymers employed in ex situ remediation of contaminated soil: bioregeneration versus solvent extraction. *J. Environ. Manage.* 159, 169-177.

MOSCA ANGELUCCI, D., TOMEI, M.C. (2015b) Pentachlorophenol aerobic removal in a sequential reactor: start up procedure and kinetic study. *Environ. Technol.* 36(3), 327-335.

TOMEI, M.C., MOSCA ANGELUCCI, D., ADEMOLLO N., DAUGULIS, A.J. (2015) Rapid and effective decontamination of chlorophenol-contaminated soils by sorption onto commercial polymers and process modelling. *J. Environ. Manage.* 150, 81-91.

TOMEI, M.C., MOSCA ANGELUCCI, D., DAUGULIS, A.J. (2014) The Use of Used Automobile Tires in a Partitioning Bioreactor for the Biodegradation of Xenobiotic Mixtures, *Environ. Technol.* 35, 75-81.

TOMEI M.C., MOSCA ANGELUCCI D., ANNESINI M.C., DAUGULIS A.J. (2013) Ex situ Remediation of Polluted Soils by Absorptive Polymers, and a Comparison of Slurry and Two-Phase Partitioning Bioreactors for Ultimate Contaminant Degradation. *J. Haz. Mater.* 262, 31-37.



XXVII ciclo di Dottorato in Scienze Ambientali
Università degli Studi dell'Insubria

D.ssa Marianna Rusconi

Delle centinaia di molecole di sintesi che quotidianamente vengono riversate in ambiente da fonti puntuali o diffuse, solo una minima parte è stata studiata per conoscerne la distribuzione in ambiente e gli effetti tossicologici a livello ambientale. Di conseguenza una frazione ancora inferiore della totalità delle molecole immesse in ambiente è soggetta a regolamentazione.

Solo recentemente la comunità scientifica ha iniziato a considerare un nuovo gruppo di contaminanti, meno persistenti dei Persistent Organic Pollutants (POP, già regolamentati dalla Convenzione di Stoccolma), che vengono definiti "emergenti" (Emerging Pollutants o Emerging Substances, ES) in quanto sono costantemente presenti anche in minime concentrazioni nelle matrici ambientali ma non sono correntemente inclusi nei programmi di monitoraggio delle agenzie di controllo. Molti di questi composti mantengono concentrazioni costanti nell'ambiente poiché sono costantemente emessi da attività umane legate alla vita quotidiana: benché il destino, gli effetti tossicologici ed ecotossicologici degli inquinanti emergenti non siano pienamente conosciuti, è possibile prevedere che anche bassissime concentrazioni di alcuni di queste molecole biologicamente attive possano indurre effetti negli ecosistemi acquatici.

Tra i composti emergenti, le sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) sono composti organici costituiti da una catena alchilica di lunghezza variabile (in genere da 4 a 14 atomi di carbonio) parzialmente o totalmente fluorurata e da un gruppo funzionale idrofilico.

La presenza di numerosi legami carbonio-fluoro conferisce particolari caratteristiche fisico-chimiche a queste sostanze, incluse la repellenza all'acqua e ai grassi, la stabilità termica e la tensioattività che le rendono molto utili in un ampio campo di applicazioni industriali (i.e. trattamenti di tessuti, materiali per la microelettronica, componenti di vernici) e nella produzione di prodotti di largo consumo (i.e. shampoo, contenitori alimentari).

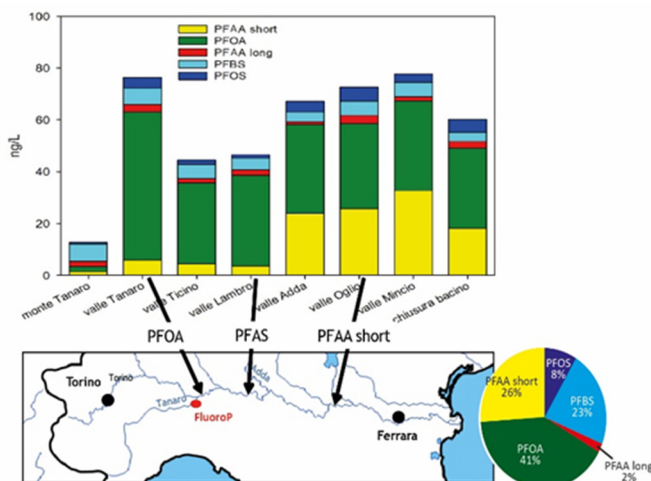


Figura 1. Concentrazioni di PFAS misurate lungo l'asta del fiume Po e contributo in percentuale dei carichi a chiusura di bacino

Come conseguenza dell'estensiva produzione e uso dei PFAS e a causa delle loro caratteristiche fisico-chimiche, questi composti sono stati spesso rilevati in concentrazioni significative in campioni ambientali e in organismi viventi, inclusi gli esseri umani.

In un'indagine eseguita alcuni anni fa a chiusura di bacino dei principali fiumi Europei, è emerso che il Po era tra tutti i fiumi valutati il più contaminato da acido perfluoroottanoico (PFOA, 200 ng/L), l'acido perfluoroalchilico (PFAA) attualmente più diffuso. A seguito dell'allarme generato da questi dati pubblicati a livello europeo, il ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATT) ha finanziato l'Istituto di Ricerca Sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR) per la "Realizzazione di uno studio di valutazione del rischio ambientale e sanitario associato alla contaminazione da sostanze perfluoroal-

News

chiliche nel bacino del fiume Po e nei principali fiumi italiani” al fine di generare un quadro realistico sulla situazione italiana.

Durante il progetto, all'interno del quale si è inserito il lavoro di dottorato, sono state svolte diverse attività, sia a livello di monitoraggio per l'identificazione di hot-spot e possibili sorgenti, sia per studiare l'impatto che i composti perfluorurati possono avere a livello delle comunità residenti in siti contaminati per determinare le possibili conseguenze ecologiche .

Per la determinazione dei composti perfluorurati in campioni acquosi è stato sviluppato un metodo UHPLC-MS/MS accoppiato a pre-concentrazione on-line del campione. Il metodo multiresiduale sviluppato ha permesso di identificare simultaneamente durante un'unica analisi 12 composti perfluorurati (9 acidi perfluorocarbossilici e 3 acidi perfluorosolfonici).

L'indagine svolta sul territorio italiano si è occupata di determinare la concentrazione dei PFAS nei principali bacini fluviali della penisola (bacini dei fiumi Po, Adige, Tevere, Arno e Brenta), che coprono un'area pari a circa il 40% del territorio nazionale e sulla quale vive il 45% della popolazione italiana.

L'analisi dei dati ha messo in luce che nei bacini interessati principalmente da territorio agricolo o da aree urbane, la concentrazione di PFAS nelle acque superficiali è spesso vicino al limite di rivelabilità o ai livelli di fondo, mentre le situazioni in cui le concentrazioni sono più elevate si riferiscono a fiumi nei cui bacini sono presenti insediamenti industriali che recapitano più o meno direttamente i propri reflui nel fiume.

I fiumi che apportano il maggior flusso di PFAS a mare sono Po (Figura 1) e Brenta, nei bacini dei quali sono presenti due stabilimenti industriali che producono rispettivamente polimeri fluorurati e intermedi fluorurati per la sintesi di polimeri; le loro emissioni raggiungono il 57% del carico totale di PFAS stimato.

Tra le altre attività produttive, le industrie tessili e conciarie emergono come sorgenti di PFBS (acido perfluorobutansolfonico) e di PFOA accoppiati ai PFCA (acidi perfluorocarbossilici) a corta catena. L'impatto dovuto ad attività tessili e conciarie è stato studiato nel bacino del fiume Arno, lungo il cui corso sono situati il distretto conciario di S. Croce sull'Arno e il distretto tessile di Prato.

Per eseguire un'efficace valutazione e bilanciamento delle masse in gioco negli scarichi industriali, agricoli e urbani, è stato scelto come area di studio il bacino del fiume Lambro in Lombardia, che si trova nell'area italiana più popolata e industrializzata e presenta tutti e tre i tipi di impatto. Avendo contestualmente campionato anche diversi impianti di depurazione che collezionano aree industriali piuttosto che urbane, è stato possibile stimare il carico di composti perfluorurati provenienti da ciascun tipo di pressione. Il bilancio di massa delle emissioni ha mostrato una costante crescita nelle emissioni da nord a sud e ha rilevato le differenze nella composizione degli omologhi da est a ovest, infatti l'area ovest del bacino è sorgente di PFBS che probabilmente è emesso dai distretti industriali del tessile e del mobile. Nel complesso il bacino del Lambro emerge come una delle principali sorgenti di PFAS per il fiume Po per quanto riguarda i composti perfluoroalchilsolfonici (PFBS e PFOS, acido perfluorooctansolfonico) che sono diffusi in

News

molte lavorazioni dove è richiesta una impermeabilizzazione delle superfici.

Per valutare se la costante presenza di PFAS può avere degli effetti a lungo termine sulle popolazioni residenti in ambiente fluviale contaminato, è stato scelto come caso studio il fiume Bormida (Piemonte), corpo recettore dello scarico diretto dell'industria di polimeri fluorurati che costituisce la principale sorgente di PFOA per il fiume Po. Negli ultimi anni la concentrazione di PFOA a valle dello scarico del polo chimico è sempre risultato rilevante e ciò significa che le popolazioni bentoniche residenti a valle dello scarico sono state esposte per lungo tempo ad elevate concentrazioni di PFOA (tra 250 e 6480 ng/L in funzione della portata del fiume). Si è valutato se la sorgente inquinante ha un impatto sulla struttura della comunità macrobentonica residente a valle dello scarico e se si rilevano effetti permanenti sulla popolazione legati ad una possibile pressione selettiva generata dal composto. L'approccio utilizzato per affrontare entrambi i quesiti è stato un confronto "monte-valle". Le analisi eseguite hanno evidenziato una leggera differenza nelle due comunità che comunque non incide sulla qualità ecologica dei siti, valutata secondo i criteri del campionamento standard di monitoraggio.

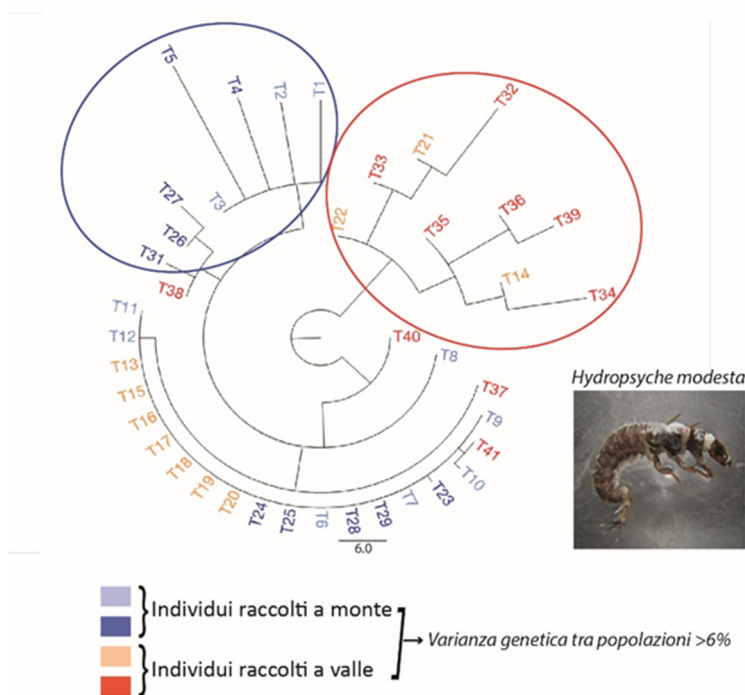


Figura 2. Rappresentazione della distanza genetica tra individui di *Hydropsyche modesta* campionati a monte e a valle di una sorgente puntuale di PFOA

L'analisi genetica è stata eseguita su individui di *Hydropsyche modesta* (Trichoptera) attraverso la tecnica molecolare Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Figura 2). E' stata valutata la varianza genetica tra le due popolazioni, evidenziando una limitata percentuale di varianza compatibile con una pressione che agisce non ubiquitariamente sul genoma ma solo su un numero limitato di loci. L'analisi di outlier loci non ha però determinato la presenza di una pressione selettiva. La divergenza genetica potrebbe quindi essere legata più a fattori ambientali che alla presenza del contaminante stesso.

Il contributo apportato dal lavoro di ricerca ha colmato le lacune di conoscenza sulla situazione italiana di questa classe di inquinanti e ha permesso l'individuazione di situazioni locali di rischio che hanno portato alla messa in atto, da parte degli enti locali, di misure di attenuazione e alla fissazione di standard di qualità ambientali da parte del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare

News

BIBLIOGRAFIA

RUSCONI M, MARZIALI L, STEFANI F, VALSECCHI S, BETTINETTI R, MAZZONI M, ROSIGNOLI F, POLESELLO S (2015). Evaluating the impact of a fluoropolymer plant on a river macrobenthic community by a combined chemical, ecological and genetic approach. *Science of the Total Environment*, 538: 654-663. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.08.086

VALSECCHI S, RUSCONI M, MAZZONI M, VIVIANO G, PAGNOTTA R, ZAGHI C, SERRINI G, POLESELLO S (2015). Occurrence and sources of perfluoroalkyl acids in Italian river basins. *Chemosphere*, 129: 126-134. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.07.044

CASTIGLIONI S, VALSECCHI S, POLESELLO S, RUSCONI M, MELIS M, PALMIOTTO M, MANENTI A, DÁVOLI E, ZUCCATO E (2015). Sources and fate of perfluorinated compounds in the aqueous environment and in drinking water of a highly urbanized and industrialized area in Italy. *Journal of hazardous materials*, 282: 51-60. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.06.007

MAZZONI M, RUSCONI M, VALSECCHI S, MARTINS CPB, AND POLESELLO S (2015). An On-Line Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Perfluoroalkyl Acids in Drinking and Surface Waters. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015, 1-13. doi:10.1155/2015/942016



Il Progetto EU PERSEUS e la *Marine Strategy*. La pressione antropica e lo stato di qualità dell'ambiente costiero del Mare Adriatico: esiste un legame tra la contaminazione dei sedimenti da inquinanti organici prioritari e i processi *in situ* della comunità microbica?

a cura di

A. Zoppini, N. Ademollo, S. Amalfitano, L. Patrolecco
 Istituto di Ricerca sulle Acque – CNR, Area della Ricerca RM1, Monterotondo (Roma)

Il progetto europeo PERSEUS (Policy-oriented marine Environmental Research for the Southern EUropean Seas), finanziato nell'ambito del settimo programma quadro dell'Unione Europea e conclusosi lo scorso dicembre, ha avuto come obiettivo primario quello di individuare nel Mar Mediterraneo e nel Mar Nero le modalità di interazione tra pressioni naturali e antropiche che agiscono sinergicamente, al fine di valutare il loro impatto sugli ecosistemi marini. La Direttiva quadro (MSFD, 2008/56/CE) pone agli Stati membri l'obiettivo di raggiungere entro il 2020 il buono stato ambientale (GES, Good Environmental Status) per gli ecosistemi marini. Facendo propri gli obiettivi della Direttiva, il progetto PERSEUS ha cercato di tradurre le conoscenze scientifiche in raccomandazioni politico-gestionali basate su evidenze sperimentali, per una migliore gestione dei mari dell'Europa del sud.

In tale contesto, il mare Adriatico, per via della sua specifica conformazione e della crescente pressione delle attività, rappresenta un laboratorio naturale in cui osservare gli effetti della pressione antropica. In particolare, le aree costiere nord-occidentali ricevono una grande quantità di sostanza organica di origine fluviale/terrestre e sono potenzialmente in grado di sequestrarne una frazione significativa nei sedimenti. Questo comparto è di

fondamentale importanza nell'ecosistema acquatico agendo sia da serbatoio che da fonte di materiale organico, nutrienti e sostanze inquinanti. Il sedimento ospita comunità biologiche diversificate in cui le comunità microbiche eterotrofe, poste alla base della catena trofica, giocano un ruolo importante nei processi di biodegradazione. I sedimenti marini non sono attualmente



monitorati con la stessa frequenza dell'acqua superficiale al fine della definizione degli standard di qualità ambientali (SQA) e sono disponibili soglie di concentrazione solo per un numero di inquinanti inferiore a quelli riportati per l'acqua (Dlgs 172/2015). Al contrario, gli SQA sono previsti per le acque superficiali dalla direttiva 2008/105/CE, modificata dalla Direttiva 2013/39/EU, sulla base di un elenco di 45 sostanze prioritarie. Inoltre nell'attuale versione della MSFD (2008/56/CE) il monitoraggio della componente microbica è totalmente trascurato (Caruso et al., 2016).

Per il Mare Adriatico in letteratura sono disponibili informazioni riguardanti la contaminazione dei sedimenti da inquinanti organici (ad es. Magi et al., 2002) e le attività microbiche (ad es. Danovaro et al., 2001), ma sono ancora carenti quelle riguardanti i possibili legami tra presenza di inquinanti organici e l'effetto sui processi delle comunità microbiche residenti.

Nell'ambito del Progetto EU PERSEUS, l'IRSA-CNR ha contribuito alla tematica Pressures and impacts at basin and subbasin scale (WP1) partecipando all'attività sperimentale prevista nell'ambito del Subtask ADREX: Adriatic and Ionic Experiments, tra i cui obiettivi vi era la descrizione dei flussi biogeochimici mediati dalla comunità microbica e la descrizione della sostanza

News

organica nei sedimenti in relazione alla pressione antropica. Durante due campagne oceanografiche i sedimenti sono stati descritti per alcune classi di inquinanti organici che per i parametri strutturali e funzionali delle comunità microbiche naturali. In particolare sono stati analizzati tre classi di inquinanti organici di interesse ambientale:

- gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA, 15 congeneri) derivanti dalla incompleta combustione di materiali organici, sono potenzialmente cancerogeni, mutageni, e tossici;
- il nonilfenolo e i precursori etossilati (4-NP, NPE01 e NPE02), derivanti da tensioattivi non ionici e pesticidi, sono considerati interferenti endocrini;
- il bisfenolo A (BPA), utilizzato nella fabbricazione del policarbonato, è un potenziale interferente endocrino

Di seguito è illustrata una sintesi dei risultati ottenuti da questo approccio sperimentale.

MATERIALI E METODI

I campioni di sedimento sono stati raccolti in 12 aree costiere del Mare Adriatico occidentale, distribuite tra Venezia e Otranto, e rappresentative di un gradiente di pressione antropica. I campionamenti sono stati eseguiti a bordo della R/V Dallaporta (CNR) (novembre 2013) e R/V Explora (OGS) (ottobre 2014). I sedimenti sono stati raccolti da box corer e carotiere SW104 per un totale di 80 campioni, di cui 68 superficiali e 12 carote, in

Sampling area (sites)	Σ PAH mean concentration (ng/g)
Venice (1)	831
Adige (3)	522 ± 286
Po (9)	356 ± 98
Ancona (6)	193 ± 75
Pescara Gargano (5)	69 ± 15
Bari (5)	112 ± 44
Otranto (3)	23 ± 7

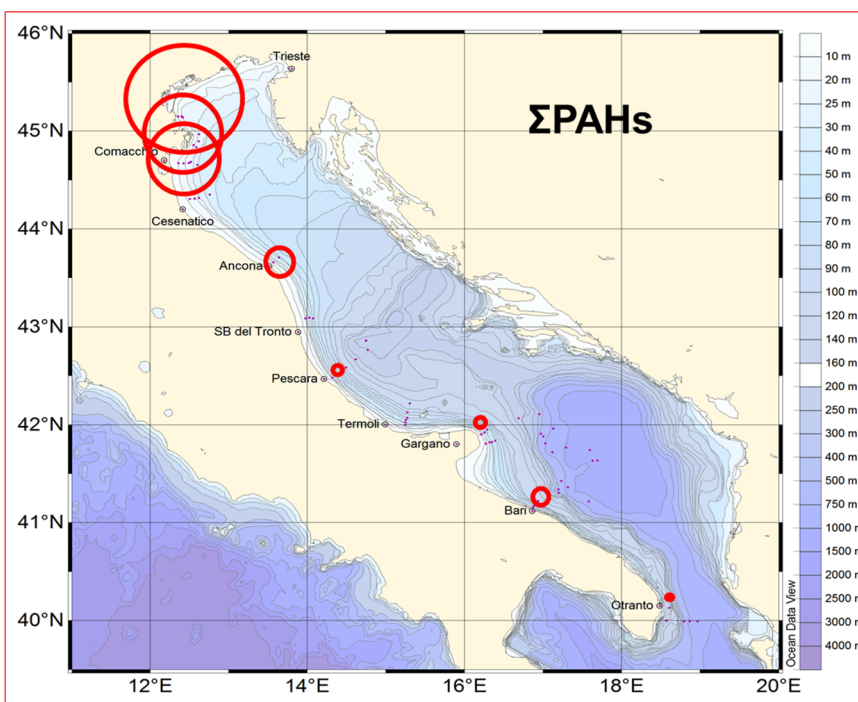


Figura 1. Concentrazione media (± dev. standard) di IPA e mappa di distribuzione nelle aree di campionamento

News

collaborazione con ISMAR-CNR.

La determinazione degli inquinanti organici (15 congeneri IPA, 4-NP, NPEO1, NPEO2, BPA), è avvenuta previa estrazione in ASE (Accelerated Solvent Extraction) con gli opportuni solventi e analisi in LC-MS e HPLC-fluorescenza (Patrolecco et al., 2010). L'abbondanza cellulare batterica è stata determinata mediante microscopia in epifluorescenza (DAPI) e trasformata in biomassa (BB), il tasso di produzione batterica di carbonio (BCP) tramite la misura dei tassi di incorporazione di ^3H -leucina (Amalfitano et al., 2008). Il tasso di respirazione della comunità microbica (CR) è stato stimato tramite la misura dell'attività del sistema di trasporto degli elettroni (ETS), mentre la concentrazione di ATP è stata determinata tramite il metodo a luminescenza (Zoppini et al., 2016). L'efficienza di crescita batterica (BGE) è stata calcolata come segue: $\text{BGE} = \text{BCP} / \text{CR} + \text{BCP}$. Tutti i dati sono stati normalizzati in base al peso secco di sedimento.

I sedimenti sono stati infine caratterizzati per gli isotopi stabili ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) e per il contenuto della sostanza organica e dell'azoto totale (ISMAR-CNR).

RISULTATI

Le più elevate concentrazioni di IPA, come sommatoria di tutti i congeneri, sono state rilevate nella zona costiera situata di fronte alla laguna di Venezia (831 ng IPA/g), mentre si è osservata una progressiva diminuzione procedendo verso sud, fino a raggiungere i valori più ridotti nei siti posti di fronte a Otranto (23 ng IPA/g) (Figura 1). Le concentrazioni di IPA osservate sono comunque comprese nell'intervallo di valori definito in letteratura come inquinamento di tipo moderato (<1000 ng/g, Baumard et al., 1998). Nelle aree più inquinate alcuni congeneri (antracene, fluorantene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene) superano i limiti di concentrazione posti per i sedimenti dal Dlgs. 172/2015.

La concentrazione totale di 4-nonilfenolo (4-NP) e dei suoi etossilati varia tra 79 e 347 ng/g, mentre per il bisfenolo A (BPA) tra 0,7 e 38 ng/g. Le concentrazioni di NP osservate in questa indagine sono paragonabili a quelle riscontrate nella laguna di Venezia, mentre le concentrazioni di BPA sono risultate inferiori (Pojana et al., 2007).

La variazione di concentrazione degli IPA nei sedimenti superficiali, è risultata essere positivamente correlata ai cambiamenti nel tasso di respirazione della comunità microbica ($R^2=0,69$, $p<0,05$). Le concentrazioni di IPA sono inoltre negativamente correlate ai valori di efficienza di crescita batterica (BGE, $R^2=0,26$, $p<0,05$), evidenziando come all'aumentare della contaminazione si verifichi una riduzione dell'efficienza con cui la componente microbica utilizza il substrato per incrementare la biomassa. Simili correlazioni sono state ottenute tra la concentrazione di NP sia verso i tassi di respirazione che verso i valori di efficienza di crescita ($p<0,05$). Le concentrazioni di IPA e NP non correlano invece con i parametri che indicano la produzione di nuova biomassa (BCP) o la biomassa stessa (BB, ATP, $p>0,05$).

Utilizzando il metodo del Fattore di Equivalenza Tossica (TEF, Toxic Equi-

News

valency Factor) è stata stimata la tossicità potenziale dei sedimenti studiati contaminati da IPA e NP (Nisbet e LaGoy, 1992). Con tale metodo, la tossicità di una miscela di contaminanti può essere espressa in termini di tossicità equivalente (TEQ) come sommatoria dei valori di TEQ di ciascun composto della miscela, relativamente alla propria concentrazione. Dall'analisi dei risultati si osserva una correlazione positiva e significativa tra la sommatoria dei TEQ e i tassi di respirazione della comunità (Σ TEQ-IPA $R^2=0,69$, $p<0,01$; Σ TEQ-NP $R^2=0,79$, $p<0,01$) (Figura 2).

CONCLUSIONI

I risultati preliminari ottenuti in questo studio, ed esperienze sperimentali precedenti (Zoppini et al., 2016), forniscono alcune importanti indicazioni sugli aspetti riguardanti la possibile interazione tra inquinamento dei sedimenti da composti organici prioritari e le risposte delle comunità microbiche residenti. Gli effetti riscontrati sembrano causare uno squilibrio metabolico della comunità microbica con possibili ripercussioni sulla catena trofica. Lo studio ha infatti evidenziato come l'aumentare del livello di contaminazione (in particolare della concentrazione di IPA e NP), provochi lo spostamento del metabolismo microbico verso il processo di mineralizzazione (CR, emissione di CO_2) piuttosto che di produzione di biomassa (BCP, incorporazione di C). Questo andamento sta ad

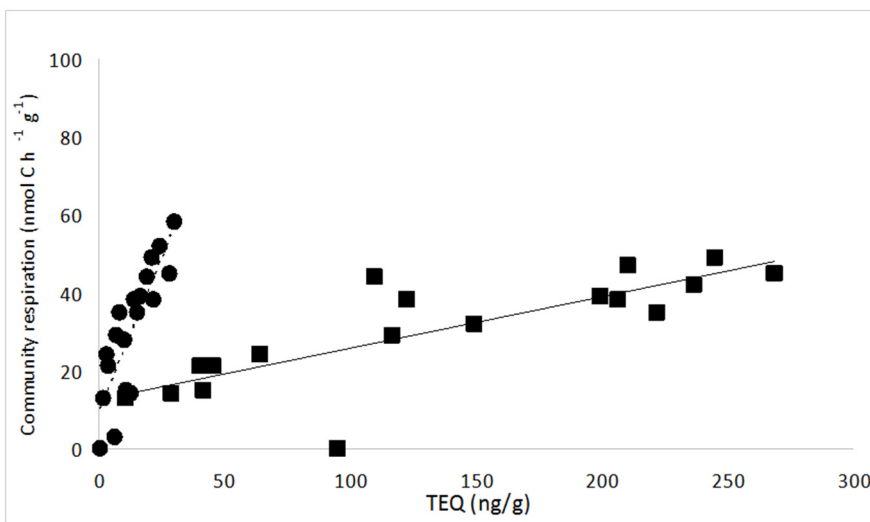


Figura 2. Analisi di regressione tra la tossicità potenziale dei sedimenti, valutata tramite il fattore TEQ (Tossicità Equivalente) degli IPA (quadrati) e dei NPs (cerchi) e il tasso di respirazione.

indicare una potenziale perdita di energia per il sistema, con ripercussioni negative sulla rete alimentare. Il grado di tossicità degli inquinanti in esame (IPA e NP), espressa come TEQ, è inoltre in grado di spiegare l'aumento dei tassi di respirazione delle comunità microbiche residenti. I risultati di questa indagine mettono infine in luce come l'osservazione delle comunità microbiche residenti, che include una più ampia diversità strutturale e funzionale rispetto ai test di laboratorio,

possa descrivere con successo uno stato di alterazione legato alla presenza di inquinanti. Nel contesto della MSFD, tali risultati dovrebbero indirizzare l'attenzione delle politiche legislative rivolte alla protezione dell'ambiente marino

costiero, sull'importanza dell'osservazione congiunta delle caratteristiche chimiche e biologiche dei sedimenti, includendo l'osservazione delle comunità microbiche al momento trascurate.

News

BIBLIOGRAFIA

AMALFITANO, S., FAZI, S., ZOPPINI, A., CARACCILOLO, A. B., GRENNI, P., PUDDU, A. (2008). Responses of benthic bacteria to experimental drying in sediments from Mediterranean temporary rivers. *Microbial Ecology*, 55(2), 270-279.

BAUMARD, P., BUDZINSKI, H., GARRIGUES, P. (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean Sea. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(5), 765-776.

CARUSO, G., LA FERLA, R., AZZARO, M., ZOPPINI, A., MARINO, G., PETOCHI, et al. (2015). Microbial assemblages for environmental quality assessment: Knowledge, gaps and usefulness in the European Marine Strategy Framework Directive. *Critical Reviews in Microbiology*, 1-22.

DANOVARO, R., ARMENI, M., DELL'ANNO, A., FABIANO, M., MANINI, E., MARRALE, D., VANUCCI, S. (2001). Small-scale distribution of bacteria, enzymatic activities, and organic matter in coastal sediments. *Microbial Ecology*, 42(2), 177-185.

MAGI, E., BIANCO, R., IANNI, C., DI CARRO, M. (2002). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the Adriatic Sea. *Environmental Pollution*, 119(1), 91-98.

NISBET, I.C.T., LAGOY, P.K., 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul. Toxicol. Pharm.* 16, 290-300.

PATROLECCO, L., ADEMOLLO, N., CAPRI, S., PAGNOTTA, R., POLESELLO, S. (2010). Occurrence of priority hazardous PAHs in water, suspended particulate matter, sediment and common eels (*Anguilla anguilla*) in the urban stretch of the River Tiber (Italy). *Chemosphere*, 81(11), 1386-1392.

POJANA, G., GOMIERO, A., JONKERS, N., MARCOMINI, A. (2007). Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International*, 33(7), 929-936.

ZOPPINI A, ADEMOLLO N., AMALFITANO S., CASELLA P., PATROLECCO L., POLESELLO S. (2014). Organic priority substances and microbial processes in river sediments subject to contrasting hydrological conditions. *Science of Total Environment*, 484,74-83.

ZOPPINI A., ADEMOLLO A., AMALFITANO S., CAPRI S., CASELLA P., FAZI S., MARXSEN J., PATROLECCO L. (2016). Microbial responses to polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in temporary river sediments: experimental insight. *Science of the Total Environment*, 541, 1364-1371

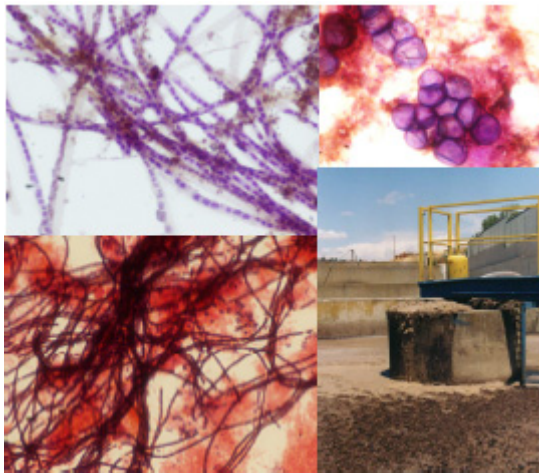


26° Corso Internazionale Di Specializzazione “Controllo e Gestione Del Processo a Fanghi Attivi Tramite Metodi Microbiologici”.

27 giugno - 1 luglio 2016
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO,
Orto Botanico - Via Lincoln, 2
Edificio 19 – Viale delle Scienze
Palermo (Italy)

E' in programma nei giorni 27 Giugno – 1 Luglio 2016, il 26° Corso Internazionale Di Specializzazione “Controllo e Gestione Del Processo a Fanghi Attivi Tramite Metodi Microbiologici”,

organizzato da IRSA_CNR in collaborazione con il DICAAM dell'Università di Palermo, e l'Associazione Biologi della Provincia di Palermo. Il Corso questo anno attribuisce Crediti Formativi sia ECM (21 e 27 Crediti per ciascuno dei due Moduli) che CFP (per Ingegneri, Chimici e Biologi operanti nel comparto Ambientale).



Il Corso Internazionale, con traduzione simultanea, pur mantenendo la sua struttura originale, presenta questo anno nuovi Docenti e tematiche, come ad esempio

quella sugli Odori nei sistemi di trattamento a fanghi attivi.

Per maggiori informazioni visitare (www.unipa.it/26aspmico) o la pagina WEB dell'IRSA (www.irsa.cnr.it), oppure contattare:

- michele.torregrossa@unipa.it;
- tandoi@irsa.cnr.it



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA News

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

ISSN 2465-017X

Autorizzazione Tribunale di Tivoli n°5/2015

Direzione e Redazione

Istituto di Ricerca sulle Acque, Area della Ricerca RM1, Montelibretti, via Salaria km 29+300.

C.P. 10 - 00015 Monterotondo (RM)

Telefono: 06 90672 850

Fax: 06 90672 787

e-mail: notiziario@irsa.cnr.it

Direttore responsabile

Giuseppe Mascolo

Comitato di Redazione

L. Campanella, L. Guzzella, S. Polesello, L. Patrolecco, S. Valsecchi

Segreteria di Redazione

S. Ghergo

<http://www.irsa.cnr.it/Notiziario>