



**Consiglio Nazionale  
delle Ricerche**



doi: 10.3274/NOTIZIRSA-2025-02

### In questo numero:

**L'** uso combinato di lunghi transetti subacquei e di immersioni puntiformi per la ricerca di esemplari vivi di *Pinna nobilis* (Linneo, 1758) **3**

**E**strazione di proteine da acque reflue e fanghi attivi, e determinazione dei *pattern* proteici tramite elettroforesi bidimensionale (2D PAGE) per la caratterizzazione tassonomica e funzionale della biomassa **8**

**A**nalisi della presenza di azitromicina e del rischio ambientale in acque superficiali mediante monitoraggio e modelli **16**

**G**li antibiotici e i geni della resistenza come inquinanti emergenti: un contributo CNR-IRSA alla ricerca sul loro destino ambientale ed effetti sulle comunità microbiche del suolo **23**

**Newsletter** **40**

**Eventi, Progetti & Networking**

**P**resentazione Volume "Siccità, scarsità e crisi idriche – Il contributo della ricerca a supporto della definizione del bilancio idrico" **43**

**I**l Progetto AGRARSENSE – Ricerca e tecnologia per l'agricoltura sostenibile **48**

**P**roPla - Trasformare la plastica in risorsa **51**

**W**INCA4TI - Water Interaction with Nature, Climate and Agriculture for Ticino **53**

**P**artecipazione del CNR-IRSA a DIDACTA Italia per la promozione del progetto BLU DIGITALE **56**

**C**NR-IRSA attore protagonista a eventi nazionali e internazionali **58**

**A**ttività dell'Area Seminari del CNR-IRSA **60**

### Editoriale

Le risorse idriche, che rivestono un ruolo fondamentale per la vita sul pianeta, sono al contempo limitate e soggette a diverse minacce. Tra i principali fattori di criticità si annoverano i cambiamenti climatici, la siccità e l'inquinamento da sostanze chimiche, sia normate che emergenti. Secondo quanto riportato a settembre 2025 dall'Agenzia Europea per l'Ambiente (EEA), solo il 37% delle acque dolci europee soddisfa gli standard di qualità, mentre il **62% di fiumi e laghi presenta un stato ecologico compromesso**. È pertanto fondamentale che la gestione delle risorse idriche avvenga in modo responsabile e innovativo, per rispondere efficacemente alle sfide ambientali dinanzi alle quali ci troviamo.

In tale prospettiva, l'acqua, il suolo, e più latamente l'ambiente risultano strettamente interconnessi anche in rapporto alla salute dell'uomo e del pianeta. L'acqua, infatti, esercita un'influenza significativa sulla salute del suolo, agendo come solvente, mezzo di trasporto e fonte di nutrienti, mentre il suolo funge da filtro per l'acqua, regolandone il flusso e contribuendo al suo processo di purificazione. Insieme, forniscono servizi ecosistemici cruciali come la regolazione idrogeologica, la prevenzione dell'erosione e il mantenimento della biodiversità.

Rileva in proposito l'avvenuta approvazione (dopo un lungo iter legislativo) a Ottobre 2025 della **Direttiva sul monitoraggio e la resilienza del suolo** (<https://data.consilium.europa.eu/doc/document/ST-9474-2025-REV-1/en/pdf>), che dovrà essere recepita dagli Stati membri entro i prossimi tre anni, e che ha l'obiettivo di garantire suoli in buona qualità in tutta Europa entro il 2050. Potrà essere questo anche un tema di approfondimento futuro.

Il Notiziario dell'IRSA, grazie ad un **approccio multidisciplinare**, si propone come uno strumento snello e allo stesso tempo approfondito, volto a rispondere alle sfide legate alla scarsità delle risorse, valorizzando l'interazione tra le diverse discipline coinvolte, come la scienza, la tecnologia e la gestione ambientale.

Questo secondo fascicolo del 2025 contiene quattro articoli che, riflettendo la multidisciplinarietà dell'Istituto, si allineano con le tematiche sopradescritte, offrendo significativi contributi. Il primo propone lo **sviluppo di protocolli e strategie di monitoraggio del più grande bivalve presente nel Mar Mediterraneo, *Pinna nobilis***, specie protetta che svolge importanti funzioni ecologiche, e che purtroppo si sta estinguendo nei nostri mari.

Il secondo contributo riporta una metodica avanzata, sviluppata dall'IRSA, per la **caratterizzazione tassonomica e funzionale della biomassa di acque reflue e fanghi attivi**, al fine di verifi-



# Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA News

carne le capacità metaboliche. Tali capacità sono fondamentali per attestare il corretto trattamento delle acque reflue prima del loro rilascio in natura, in quanto permettono l'eliminazione o la forte riduzione degli inquinanti.

I due articoli successivi approfondiscono il tema dei **contaminanti emergenti**, quali gli antibiotici e i geni della resistenza, in qualità di inquinanti ambientali. Tali articoli ben si collocano nel contesto della **World AMR Awareness Week** (18-24 novembre 2025, <https://www.who.int/campaigns/world-amr-awareness-week/2025>), organizzata ogni anno dall'OMS che quest'anno ha per tema "Act Now: Protect Our Present, Secure Our Future" ed il cui scopo è quello di aumentare la consapevolezza della resistenza antimicrobica e promuovere le migliori pratiche per ridurre l'emergenza e la diffusione di infezioni resistenti agli antibiotici, in una prospettiva *One health*, che dunque coinvolge l'ambiente come uno dei tre fattori collegati insieme alla salute dell'uomo e degli animali.

Non di poco conto poi la sezione **News** e **Progetti** che riportano alcune delle attività dell'Istituto, che vanno circolarizzati per una loro ulteriore valorizzazione e conoscenza, nonché per fungere da stimolo per iniziative future.

Si è certi che il Notiziario dia un contributo rilevante nel comunicare riflessioni scientifiche e raccogliere le iniziative, italiane ed internazionali, sulle attuali sfide ambientali.

Buona lettura!

**Paola Grenni**  
*Direttore Scientifico*



# L'uso combinato di lunghi transetti subacquei e di immersioni puntiformi per la ricerca di esemplari vivi di *Pinna nobilis* (Linneo, 1758)

a cura di

Fernando Rubino (\*), Giovanni Fanelli, Giuseppe Denti, CNR, Istituto di Ricerca sulle Acque, Sede di Taranto

## RIASSUNTO

Il mollusco bivalve *Pinna nobilis*, specie endemica del Mar Mediterraneo, è oggetto dal 2016 di un evento di mortalità di massa, le cui cause sono ascrivibili a vari fattori e vari patogeni, con conseguente rischio di estinzione. In questo contesto, la ricerca di aree non soggette al fenomeno e/o di esemplari "resistenti" è essenziale per garantire la sopravvivenza della specie. A tal fine si evidenzia la necessità di sviluppare e implementare protocolli e strategie di monitoraggio che ottimizzino la potenzialità di successo, tenendo anche conto dell'attuale scarsa probabilità di reperire individui ancora vivi. Per conseguire tali obiettivi è stato implementato e adottato un approccio che integra lunghi transetti subacquei a differenti profondità con immersioni in siti specifici caratterizzati dalla presenza di praterie di *Posidonia oceanica*, un habitat preferenziale di *P. nobilis*. Le attività sono state condotte lungo la costa ionica pugliese della Provincia di Taranto. Nonostante un considerevole sforzo in termini di chilometri percorsi sott'acqua e di immersioni effettuate, non sono stati trovati individui vivi, ma solo valve vuote, un chiaro segno, purtroppo, della scomparsa di questa specie dalle coste pugliesi.

## SUMMARY

Since 2016, the bivalve mollusc *Pinna nobilis*, endemic to the Mediterranean Sea, has been subject to a mass mortality event in the whole basin caused by multiple pathogens. This situation has led to the species on the brink of the extinction. In this scenario, the identification of safe zones and/or individuals resistant to the infection is of crucial importance. To achieve this goal, due to the low probability of identifying living specimens, it is necessary to develop and apply a monitoring strategy that can optimise the probability of success in relation to the survey effort. We adopted an integrated approach which involved the execution of underwater linear transects at varying depths and location-specific dives in the preferred habitats of *P. nobilis*, i.e., the *Posidonia oceanica* meadows, situated along the Ionian coast of Apulia (Southern Italy) in the Province of Taranto. Despite comprehensive investigations, no survivors were discovered; only empty shells were found, which is indicative of the extinction of the species from the Apulian seabed.

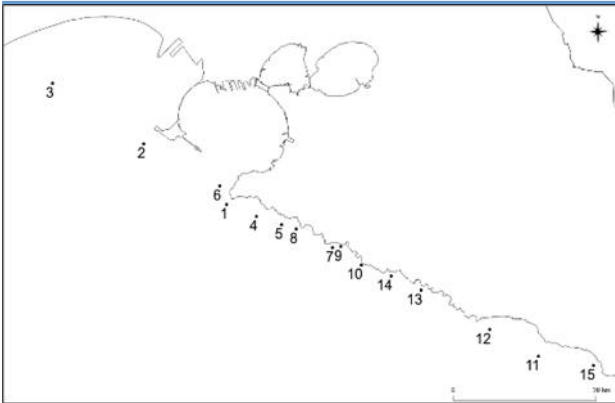
## 1. INTRODUZIONE

*Pinna nobilis* (Linneo, 1758), anche conosciuta come nacchera o cozza pinna, è un mollusco bivalve endemico del Mar Mediterraneo. Si può trovare in fondali profondi da poche decine di centimetri fino a 60 metri, su un'ampia varietà di substrati, da incoerenti sabbiosi o fangosi a rocciosi, e soprattutto in praterie di fanerogame come *Posidonia oceanica* (Linneo) Delile (Basso et al., 2015). È una specie protetta da leggi nazionali e direttive europee (Kersting et al., 2019) che svolge importanti funzioni ecologiche, la più affascinante delle quali è forse quella di "ecosystem engineer": in habitat di fondi molli le grandi conchiglie delle nacchere offrono un substrato idoneo per tante specie che colonizzano fondi duri, contribuendo ad accrescere la biodiversità dell'area (Iannucci et al., 2023). Inoltre, dal 2016 le popolazioni di questa specie in tutto il Mediterraneo stanno affrontando una mortalità massiva legata all'infezione di diversi patogeni, in particolare *Haplosporidium pinnae* (Catanese et al., 2022), e oggi *P. nobilis* è considerata a rischio di estinzione (Katsanevakis et al.,

2022). Infatti, lo stato di questa specie, già presente nelle liste rosse dell'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (IUCN), è stato definito come "sotto grave minaccia" (Scarpa et al., 2020). Per tale motivo, come suggerito dalla IUCN, la ricerca di esemplari vivi di *P. nobilis* è prioritaria ed è stata l'obiettivo dell'attività di monitoraggio condotta dal gruppo subacquei del CNR IRSA di Taranto, lungo tutta la costa della Provincia ionica tra il 2022 e il 2023. *P. nobilis* è sempre stata presente lungo questi litorali del sud Italia e molto abbondante soprattutto nei bacini confinati come il Mar Grande e il Mar Piccolo di Taranto, dove le popolazioni di questo bivalve hanno raggiunto densità superiori a 0,2 ind m<sup>-2</sup> (Rubino et al., 2015). In questi bacini, fino al 2018 erano presenti più di 10.000 esemplari di *P. nobilis*, molti dei quali censiti durante le attività di monitoraggio dai ricercatori subacquei del CNR IRSA di Taranto. Successivamente, a partire dalla tarda primavera dello stesso anno, nel giro di pochi mesi, è stata registrata una mortalità massiva con pochi sopravvissuti che sono però morti in un breve arco di tempo (Tiscar et al., 2022). La causa di questo fenomeno di mortalità massiva è

\* fernando.rubino@cnr.it





**Figura 1.** I siti investigati per la ricerca di individui vivi di *Pinna nobilis* lungo la costa della Provincia di Taranto.

1. San Vito, 2. Isola di San Pietro, 3. Secca dell'Armeleia, 4. Lido Bruno, 5. Lama, 6. San Vito fanale verde, 7. Mon Reve, 8. Saint Bon, 9. Lido Gandoli, 10. Saturo, 11. Le Conche, 12. Torre Zozzoli, 13. Monte D'Arena, 14. Baia d'Argento, 15. Torre Ovo.

stata un'infezione da parte di *H. pinnae* e altri microorganismi come *Mycobacterium* sp. (Panarese et al., 2019; Tiscar et al., 2022). Ulteriori studi in altre aree del Mediterraneo hanno evidenziato come in realtà l'elevatissima mortalità avesse un'eziologia multifattoriale (Carella et al., 2020); sebbene *Haplosporidium* e *Mycobacterium* fossero stati individuati come principali agenti patogeni del fenomeno, è stato dimostrato che anche *Vibrio* spp., *Perkinsus* spp. e picornavirus (Pensa et al., 2022) possono essere associati allo sviluppo della sindrome infiammatoria che causa la morte delle nacchere.

## 2. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto tra il 2022 e il 2023 in 15 siti localizzati lungo la costa ionica della regione Puglia nella Provincia di Taranto (Figura 1).

In ciascun sito sono state applicate due metodologie di indagine, finalizzate alla ricerca di esemplari vivi di *P. nobilis*:

1. Transetti lineari georeferenziati (lungi circa 200-300 m) realizzati da due subacquei in immersione con ARA (autorespiratori ad aria), equipaggiati con scooter subacquei e boa segna-sub con GPS integrato (Figura 2); tali transetti sono stati realizzati alle profondità di 5, 15 e 25 m in ogni sito, eccetto per la "Secca dell'Armeleia", una isolata area rocciosa, con profondità che va da 8 a 19 m, che si trova al largo della litoranea



**Figura 2.** Due operatori subacquei con scooter durante le attività di *visual census* su transetti lineari.

occidentale tarantina, dove sono stati effettuati due transetti a 15 m;

2. Transetti circolari di 20 m di raggio realizzati da due subacquei in immersione con ARA a profondità comprese tra 15 e 17 m su fondali caratterizzati dalla presenza di una prateria di *Posidonia oceanica* (immersioni "spot"), habitat preferenziale della specie oggetto d'indagine.

Entrambe le metodiche applicate prevedevano il *visual census* (conta ed identificazione visiva) come metodo di rilevamento della presenza degli individui della specie; nel caso di ritrovamento, sia vivo sia morto, ciascun esemplare è stato fotografato e misurato. Si evidenzia che i frammenti di valve non sono stati considerati nell'indagine. Per quanto riguarda la lunghezza totale delle valve (TL) sono state stabilite 3 classi: Grande (L) TL > 60 cm, Media (M) 30 < TL < 60 cm, Piccola (S) TL < 30 cm. Infine, è stata registrata la natura del substrato su cui ciascun esemplare è stato ritrovato.

## 3. RISULTATI

Nella conduzione dei transetti lineari sono stati percorsi in totale 15,7 km di distanza in immersione alle 3 diverse profondità previste. Sono stati censiti 67 esemplari di *P. nobilis*, tutti osservati morti (Figura 3; Tabella 1). La maggior parte degli individui sono stati censiti su fondali a coralligeno e in praterie di *P. oceanica*. Molte valve di esemplari di *P. nobilis* avevano la parte anteriore o posteriore della conchiglia danneggiate, per cui è stato possibile misurare la lunghezza totale solo di 19 delle 67 conchiglie registrate. Nello specifico, nei transetti condotti a 5 m di profondità, è stato osservato un solo esemplare morto, nel sito 1 (San Vito), mentre nei restanti 14 siti esaminati non è stato osservato alcun esemplare a tale profondità. Il maggior numero di esemplari morti è stato osservato nel sito 12 (Torre Zozzoli), mentre il sito 2 (Isola di San Pietro) è stato l'unico in cui non è stato ritrovato alcun esemplare.

Nonostante un gran numero degli esemplari registrati durante la conduzione dei transetti lineari sia stato osservato tra le fronde di *P. oceanica*, nessun esemplare è stato osservato durante i transetti circolari delle immersioni "spot" che sono state condotte specificatamente in questo habitat.

## 4. DISCUSSIONE

Il ritrovamento esclusivamente di individui morti di *P. nobilis* conferma quanto già osservato durante una campagna di ricerca condotta da Pensa et al. (2022) lungo tutto il litorale pugliese nel 2020 in cui è stata registrata una mortalità del 100%. In questo studio è stata utilizzata una metodica simile per quanto riguarda la conduzione di transetti lineari che erano più lunghi ma molto distanziati geograficamente. L'utilizzo di transetti più brevi, condotti in parallelo su batimetriche diverse, ha permesso di aumentare la risoluzione spaziale di osservazione, con l'obiettivo di massimizzare la probabilità di rinvenire individui vivi, pur in un areale più ridotto. In ogni caso i due studi hanno

**Tabella 1.** Risultati delle osservazioni sui transetti lineari condotti nei 15 siti e alle tre profondità previste. Taglia: L= grande; M=media; S=piccola; nm=non misurabile..

Sito	Temp (°C)	Prof. transetti (m)	n° ind.	Stato di salute	Taglia	Substrato
San Pietro	24	5	0			Roccia
		15	0			Coralligeno/Posidonia
		25	0			Coralligeno
San Vito	25	5	1	Morto	1L	Roccia
		15	1	Morto	1M	Coralligeno
		25	1	Morto	1S	Coralligeno
Secca dell'Armeleia	26	15	3	Morto	1S/1M	Pre-coralligeno
Lido Bruno	25	5	0			Roccia
		15	0			Coralligeno/Posidonia/Sabbia
		25	4	Morto	1M	Coralligeno/Sabbia
Lama	26	5	0			Roccia
		15	0			Coralligeno/Posidonia/Sabbia
		25	2	Morto	1L	Coralligeno
San Vito - Fanale Verde	26	5	0			Roccia
		15	1	Morto	1M	Posidonia
		25	0			Posidonia
Mon Reve	24	5	0			Roccia
		15	1	Morto	nm	Sabbia
		25	0			Coralligeno
Saint Bon	24	5	0			Roccia/Sabbia
		15	0			Sabbia
		25	2	Morto	nm	Posidonia/Sabbia
Gandoli	25	5	0			Roccia
		15	1	Morto	1S	Coralligeno/Posidonia/Sabbia
		25	3	Morto	2S/1M	Coralligeno
Saturo	25	5	0			Roccia
		15	2	Morto	2S	Coralligeno/Posidonia
		25	2			Coralligeno
Le Conche	20	5	0			Sabbia
		15	3	Morto	nm	Posidonia
		25	1			Coralligeno/Posidonia
Torre Zozzoli	20	5	0			Sabbia
		15	12	Morto	4M/1L	Posidonia
		25	6	Morto	nm	Posidonia
Monte d'Arena	16	5	0			Sabbia
		15	0			Coralligeno/Posidonia/Sabbia
		25	7	Morto	2L	Coralligeno/Posidonia/Sabbia
Baia d'Argento	16	5	0			Roccia
		15	1	Morto	nm	Sabbia
		25	7	Morto	2M/1L	Coralligeno
Torre Ovo	15	5	0			Sabbia
		15	3	Morto	3M	Posidonia
		25	3	Morto	2M/1L	Coralligeno

prodotto risultati sovrapponibili e questo evidenzia come il fenomeno di mortalità di massa che sta interessando le popolazioni di *P. nobilis* sia diffuso in tutto il Golfo di Taranto, oltre che nel Mar Piccolo e Mar Grande di Taranto.

Tuttavia, in concomitanza con la rapida scomparsa di *P. nobilis*, recentemente stanno aumentando le segnalazioni della specie congenere, anch'essa sotto regime di protezione, *Pinna rudis* (Zotou et al., 2023; Rubino et al., 2024) (Figura 4). Pur condividendo alcune caratteristiche morfologiche ed ecologiche (Zotou et al., 2023), *P. rudis* si differenzia da *P. nobilis* per la sua più ampia distribuzione; oltre che in Mediterraneo è presente lungo la costa africana dell'Oceano Atlantico e nei diversi arcipelaghi che si trovano al largo di essa (i.e., Canarie, Capo Verde e Madei-

ra) fino alle isole Azzorre, al largo del Portogallo (Barreiros et al., 2016; Gvozdenovic et al., 2019; Kersting & Ballesteros, 2021). Preferisce habitat rocciosi sebbene, come *P. nobilis*, si possa trovare nelle praterie di Posidonia e in habitat detritici a rodoliti (Kersting & Ballesteros, 2021). Ha delle importanti caratteristiche morfologiche che permettono di distinguere abbastanza facilmente da *P. nobilis*; infatti, oltre alle minori dimensioni, la conchiglia ha una forma spiccatamente triangolare con evidenti costolature ad andamento radiale lungo tutta la conchiglia (Gvozdenovic et al., 2019).

Durante immersioni svolte sui fondali dell'isola di Pantelleria (Sicilia, Italia) nel 2022 (Rubino et al., 2024), sono stati osservati individui che presentavano caratteri morfologici tipici di entrambe le specie



**Figura 3.** Due esemplari di *P. nobilis* morti rinvenuti su coralligeno con *Posidonia oceanica* (in alto) e fondo sabbioso (in basso).

(dimensioni e morfologia della conchiglia in particolare), suggerendo la possibilità di un fenomeno di ibridazione.

Tale ipotesi è stata confermata successivamente per individui di altre aree del Mar Mediterraneo (Catanese et al., 2024); pertanto, risulta estremamente importante monitorare queste dinamiche e le eventuali conseguenze (Catanese et al., 2024), oltre ad accrescere le conoscenze sulla diversità genetica di *P. nobilis* (Nebot-Colomer et al., 2025).

La strategia attualmente più efficace per la conservazione della specie *P. nobilis* consiste nel mantenere efficienti le attività di monitoraggio delle popolazioni e nella ricerca di esemplari vivi, come dimostrato da Karadurmuş et al. (2024) il quale ha rilevato una popolazione in salute nel Mar di Marmara (nord-ovest della penisola anatolica, in comunicazione con l'Egeo e il Mar Nero).

Inoltre, sin dall'inizio della diffusione dell'evento di mortalità di massa, sono stati effettuati diversi studi sul mantenimento e riproduzione in cattività della



**Figura 4.** Un esemplare di *Pinna rudis* osservato sul fondale antistante il faro di San Vito (Taranto, Italia).

specie (Cortes-Melendreras et al., 2022), affiancati a tentativi di ripopolamento (Catanese et al., 2024; Ferranti et al., 2024) che potrebbero rappresentare un ulteriore strumento per la salvaguardia di *P. nobilis*. Ovviamente il successo di queste attività presuppone l'assenza dei patogeni nei siti di ripopolamento e ancor di più lo sviluppo di una resistenza all'infezione degli esemplari trapiantati.

Alla luce dei risultati ottenuti, si può concludere che: 1) il 100% di mortalità di *P. nobilis* registrata potrebbe indicare l'estinzione della specie dalle coste ioni-pugliesi; 2) sebbene i transetti utilizzati in questo studio (200-300 m) siano più corti rispetto al lavoro di Pensa et al. (2022) (800 m), i risultati qui riportati tra i due studi sono confrontabili, con il vantaggio di una maggiore risoluzione spaziale di campionamento; 3) l'integrazione di transetti lineari con transetti circolari in immersioni "spot" su praterie di *P. oceanica*, nonostante la maggiore probabilità di rinvenire esemplari di *P. nobilis*, non ha condotto a risultati significativi; questo non preclude la possibilità che tale metodologia possa essere considerata efficace.

## BIBLIOGRAFIA

- Barreiros J, Pacheco R, Gonçalves S (2016) A New Insight on the Symbiotic Association between the Fan Mussel *Pinna Rudis* and the Shrimp *Pontonia Pinnophylax* in the Azores (NE Atlantic). *Glob. J. Zool.* 1 (1): 001-002. <https://doi.org/10.17352/gjz.000001>
- Basso L, Vazquez-Luis M, Garcia-March JM, Deudero S, Alvarez E, Vicente N, Duarte CM, Hendriks IE (2015) The pen shell *Pinna nobilis*: a review of populations status and recommended research priorities in the Mediterranean Sea. *Adv. Mar. Biol.* 71: 109-160. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2015.06.002>
- Carella F, Antuofermo E, Farina S, Salati F, Mandas D, Prado P, Panarese R, Marino F, Flocchi E, Pretto T, Vico GD (2020) In the wake of the ongoing mass mortality events: Co-occurrence of *Mycobacterium*, *Haplosporidium* and other pathogens in *Pinna nobilis* collected in Italy and Spain (Mediterranean Sea). *Front. Mar. Sci.*, vol. 7, 48. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00048>
- Carella F, Prado P, Vico GD, Palić D, Villari G, Garcia-March JR et al. (2023) "A widespread picornavirus affects the hemocytes of the noble pen shell (*Pinna nobilis*), leading to its immunosuppression. *Front. Vet. Sci.*, vol. 10, 1273521. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1273521>
- Catanese G, Grau A, Valencia JM, Garcia-March JR, Vazquez-Luis M, Alvarez E, Deudero S, Darriba S, Carballal MJ, Villalba A (2018) *Haplosporidium pinnae* sp. nov., a haplosporidan parasite associated with mass mortalities of the fan mussel, *Pinna nobilis*, in the Western Mediterranean Sea. *J. Invertebr. Pathol.*, 157: 9-24. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.07.006>
- Catanese G, Vazquez-Luis M, Giacobbe S, Garcia-March JM, Zotou M, Prado P, Papadakis O, Tena-



- Medialdea J, Katsanevakis S, Grau A (2024) Internal transcribed spacer as effective molecular marker for the detection of natural hybridization between the bivalves *Pinna nobilis* and *Pinna rudis*. *Ecol. Evol.* 14: e70227. <https://doi.org/10.1002/ece3.70227>
- Cortes-Melendreras E, Alonso-Sarria F, Gimenez Martin FJ, Murcia J, Canales-Caceres R, Ramos Espla AA, Barbera C, Gimenez-Casaldueiro F (2022) The relict population of *Pinna nobilis* in the Mar Menor is facing an uncertain future. *Mar. Poll. Bull.* 185: 114376. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114376>
- Ferranti MP, Azzena I, Batistini E, Caracciolo D, Casu M, Chiantore M, Ciriaco S, Firpo V, Intini L, Locci C, Montefalcone M, Oprandi A, Sanna D, Scarpa F, Segarich M (2024) Handling of the bivalve *Pinna nobilis*, endangered and pathogen-affected species, for controlled reproduction: precautions taken. *Ecol. Evol.* 14: e70565. <https://doi.org/10.1002/ece3.70565>
- Gvozdenovic S, Macic V, Pesic V, Nikolic M, Peras I, Mandic M (2019) Review on *Pinna rudis* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pinnidae) presence in the Mediterranean. *J. Agric. For.* 65: 115-126. <https://doi.org/10.17707/agricultforest.65.4.10>
- Iannucci S, Auriemma R, Davanzo A, Ciriaco S, Segarich M, Del Negro P (2023) Can the empty shells of *Pinna nobilis* maintain the ecological role of the species? A structural and functional analysis of the associated mollusc fauna. *Diversity* 15: 956. <https://doi.org/10.3390/d15090956>
- Karadurmuş U, Berli T, Sari M (2024) Discovering new living *Pinna nobilis* populations in the Sea of Marmara. *Mar. Biol.* 171: 90. <https://doi.org/10.1007/s00227-024-04416-3>
- Katsanevakis S, Carella F, Cinar ME, Çizmek H, Jimenez C, Kersting DK, Moreno D, Rabaoui L, Vicente N (2022) The fan mussel *Pinna nobilis* on the brink of extinction in the Mediterranean. In: Della Sala, D.A., Goldstein, M.I. (Eds), *Imperilled: The Encyclopaedia of Conservation*, vol. 2, pp. 700-709. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821139-7.00070-2>
- Kersting DK, Ballesteros E (2021) Is the local extinction of *Pinna nobilis* facilitating *Pinna rudis* recruitment? *Mediterr. Mar. Sci.* 22: 623-626. <https://doi.org/10.12681/mms.27809>
- Kersting D, Benabdi M, Çizmek H, Grau A, Jimenez C, Katsanevakis S, Ozturk B, Tuncer S, Tunesi L, Vazquez-Luis M, Vicente N, Otero Villanueva M (2019) *Pinna nobilis*. The IUCN Red List of Threatened Species. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20193.RLTS.T160075998A160081499.en>
- Nebot-Colomer E, Peyran C, Deudero S, Boissin E, Vázquez-Luis M, Planes S (2025) The mass mortality of *Pinna nobilis* throughout the Mediterranean Sea has not yet affected the genetic diversity of the species in one of the last genetic reservoirs. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 317: 109202. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2025.109202>
- Panarese R, Tedesco P, Chimienti G, Latrofa MS, Quaglio F, Passantino G, Buonavoglia C, Gustinelli A, Tursi A, Otranto D (2019) *Haplosporidium pinnae* associated with mass mortality in endangered *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) fan mussels. *J. Invertebr. Pathol.* 164: 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.04.005>
- Pensa D, Fianchini A, Grosso L, Ventura D, Cataudella S, Scardi M, Rakaj A (2022) Population status, distribution and trophic implications of *Pinna nobilis* along the South-eastern Italian coast. *npj Biodiversity* 1: 3. <https://doi.org/10.1038/s44185-022-00002-2>
- Rubino F, Cecere E, Petrocelli A, Casale A, Casale V, Passarelli S (2015) Recent observations of *Pinna nobilis* (Mollusca. Bivalvia) in the Mar Piccolo basin (Gulf of Taranto, Mediterranean Sea). *Biol. Mar. Medit.* 22: 107-108.
- Rubino F, Fanelli G, Denti G (2024) The Queen is dead, long live the queen: The vanishing of *Pinna nobilis* and the onset of the congeneric *P. rudis* (Mollusca: Bivalvia). *Diversity* 16: 341. <https://doi.org/10.3390/d16060341>
- Scarpa F, Sanna D, Azzena I, Mugetti D, Cerruti F, Hosseini S et al. (2020) Multiple non-species-specific pathogens possibly triggered the mass mortality in *Pinna nobilis*. *Life* 10(10): 238. <https://doi.org/10.3390/life10100238>
- Tiscar PG, Rubino F, Paoletti B, Francesco CED., Mosca F, Salda L.D, Hattab J, Smoglica C, Morelli S, Fanelli G (2022) New insights about *Haplosporidium pinnae* and the pen shell *Pinna nobilis* mass mortality events. *J. Invertebr. Pathol.* 90: 107735. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107735>
- Zotou M, Papadakis O, Catanese G, Stranga Y, Ragkousis M, Kapouris TE, Naasan Aga-Spyridoulou R, Papadimitriou E, Koutsoubas D, Katsanevakis S (2023) New kid in town: *Pinna rudis* spreads in the eastern Mediterranean. *Mar. Med. Sci.* 24(3): 709-721. <https://doi.org/10.12681/mms.35343>

# Estrazione di proteine da acque reflue e fanghi attivi, e determinazione dei pattern proteici tramite elettroforesi bidimensionale (2D PAGE) per la caratterizzazione tassonomica e funzionale della biomassa

a cura di

Carlo Salerno (\*), CNR, Istituto di Ricerca sulle Acque, Sede di Bari

## RIASSUNTO

Negli impianti di trattamento delle acque di scarico (*wastewater treatment plants*, WWTPs) è essenziale avere adeguate portate di trattamento ed elevate efficienze di abbattimento dei carichi inquinanti. In questi impianti sono ormai convenzionalmente impiegati i cosiddetti “fanghi attivi”, dotati di alta capacità di biodegradazione e di adattamento alle sostanze inquinanti. Essi sono costituiti soprattutto da complessi consorzi microbici eterogenei con specifiche capacità metaboliche - a seconda del trattamento applicato e delle sostanze da trattare - legate all'attività enzimatica che coinvolge principalmente proteine.

In tale contesto, il presente lavoro propone un protocollo per l'estrazione delle proteine da campioni di acque reflue e fanghi attivi di WWTPs, e la loro separazione tramite gel-elettroforesi bidimensionali (2D-PAGE) sulla base dei diversi punti isoelettrici e pesi molecolari, rappresentando pattern proteici tipici di determinate situazioni. Inoltre, la separazione delle proteine ottenuta con i 2D-gel ben si presta a possibili ulteriori passaggi, come l'escissione delle proteine dai gel e l'analisi di spettrometria di massa per la loro identificazione, arrivando a una completa ed effettiva caratterizzazione funzionale dei batteri dei campioni in esame.

## SUMMARY

In wastewater treatment plants (WWTPs) adequate treatment flow-rates and high efficiencies for the reduction of the pollutant loads are essential. The so-called “activated sludge” is now conventionally used in WWTPs, with a high capacity for biodegradation and adaptation to pollutants. They consist mainly of complex heterogeneous microbial consortia with specific metabolic capabilities - depending on the applied treatment and the substances to be treated - linked to enzymatic activity involving mainly proteins.

In this context, the present work proposes a protocol for the extraction of proteins from samples of wastewater and activated sludge of WWTPs, and their separation via two-dimensional gel-electrophoresis (2D-PAGE) on the basis of the different isoelectric points and molecular weights, representing protein patterns typical of certain situations. Furthermore, the separation of proteins obtained with 2D-gels is well suited for to possible further steps, such as excision of proteins from gels and mass spectrometry analysis for their identification, arriving at a complete and effective functional characterization of the samples under examination.

## 1. INTRODUZIONE

Nel corso dell'ultimo secolo, in concomitanza con l'incremento della popolazione mondiale, lo sviluppo industriale e tecnologico, e l'aumento della domanda di risorse naturali, si è verificato un incremento nell'utilizzo delle risorse stesse. Per quanto riguarda le risorse idriche, una delle conseguenze del maggiore consumo di acqua è l'aumento delle acque reflue prodotte. In generale, le acque reflue urbane e industriali non possono essere scaricate direttamente nei bacini naturali a causa dell'elevato carico inquinante e del rischio di contaminazione da agenti patogeni (Preisner, 2020). Inoltre, la composizione delle acque reflue urbane ha subito significativi cambiamenti rispetto al passato, con una diminuzione del contenuto organico, a favore di componenti di natura non organica. Questo processo è attribuibile a fattori quali la diffusione mondiale dell'industria manifatturiera, l'uso domestico di farmaci, la costruzione di ospedali e

l'utilizzo di detersivi (Samal et al., 2022). Per questo motivo, un corretto trattamento delle acque reflue prima del loro rilascio in natura è fondamentale per l'eliminazione o la forte riduzione degli inquinanti. Gli impianti di trattamento delle acque reflue (WWTP) sono stati sviluppati all'inizio del XX secolo per la sicurezza igienica delle grandi aree urbane. Lo scopo generale di un WWTP è la riproduzione intensiva dei processi di degradazione biologica naturale attraverso diverse fasi, con l'obiettivo di raggiungere condizioni di efficienza ottimizzate, riducendo così tempi e spazi rispetto ai percorsi naturali (De Celis et al., 2022).

I principali processi di degradazione degli inquinanti avvengono nel fango attivo della vasca biologica, dove diverse specie microbiche si selezionano e crescono sinergicamente, formando comunità microbiche in grado di ossidare/ridurre gli inquinanti rilevanti. In questo contesto, la conoscenza delle dinamiche delle

---

\* [carlo.salerno@cnr.it](mailto:carlo.salerno@cnr.it)



specie microbiche selezionate in base alle caratteristiche specifiche delle acque reflue e/o alle condizioni operative e ambientali può fornire contributi significativi rilevanti per il miglioramento del funzionamento e della gestione dell'WWTP. In particolare, la comprensione dei comportamenti metabolici delle consorzi microbici nei fanghi attivi può contribuire all'ottimizzazione dell'efficienza degli impianti di depurazione (Bassin et al., 2021).

La struttura del fango attivo trae origine da una complessa organizzazione di componenti eterogenei: microrganismi (principalmente batteri, ma anche funghi, protozoi e piccoli metazoi), particelle inorganiche, biopolimeri esocellulari, cationi bivalenti e materiali inerti provenienti dallo scarico. A seconda dell'interazione tra tutte queste componenti e della conseguente organizzazione microbiologica, il fango attivo può assumere caratteristiche fisiche diverse, quali viscosità, sedimentabilità, concentrazione di solidi sospesi o filtrabilità. Tuttavia, negli ultimi decenni, è emersa l'esigenza di caratterizzare tale biomassa per comprenderne i principali aspetti metabolici, soprattutto grazie al continuo sviluppo di tecniche biomolecolari altamente specifiche basate su omologia di sequenze nucleotidiche. In particolare, si stanno affermando i cosiddetti approcci "omici", discipline della biologia molecolare sviluppatesi come applicazioni di principi statistici e bioinformatici per la comprensione dei sistemi biologici complessi, come il fango attivo (Lederberg and McCray, 2001). L'obiettivo di tali discipline è l'identificazione e la quantificazione di tutte le biomolecole di una data classe nella comunità microbica oggetto di studio attraverso l'elevato grado di similarità di sequenza con database già presenti in letteratura. La prima a svilupparsi è stata la genomica, la quale si occupa dello studio del genoma degli organismi viventi. In seguito si sono sviluppate le altre discipline "omiche", con identico approccio, ma con target diverso: la trascrittomica (mRNA), la proteomica (proteine), la lipidomica (lipidi), la glicomica (carboidrati) e la metabolomica (metaboliti). Le proteine rappresentano il prodotto finale della trascrizione dei geni, con la relativa traduzione in sequenze amminoacidiche, e la proteomica ha come oggetto di studio il "proteoma", ovvero l'intero set proteico di una cellula, rappresentandone di fatto la reale capacità funzionale in un determinato momento o condizione. In particolare, grandi potenzialità sembrano emergere dall'approccio innovativo della metaproteomica, proteomica ambientale o delle comunità microbiche che si pone l'obiettivo di studiare il proteoma di un'intera comunità microbica, come i fanghi attivi (Rodriguez-Valera 2004; Wilmes et al., 2015). L'effettiva caratterizzazione funzionale della biomassa può così aiutare a identificare le dinamiche metaboliche del fango attivo in definiti contesti (Salerno et al., 2019).

In questo articolo, viene illustrato un protocollo per l'estrazione di proteine dalle specie microbiche di acque reflue e fanghi attivi basato sull'uso di fenolo sulla base di quello proposto da Kuhn e colleghi (2011). Successivamente, viene suggerita l'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) per uno screening preliminare delle miscele proteiche estratte. In seguito, viene descritta la separazione delle miscele proteiche dei campioni

scelti tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide bidimensionale (2D-PAGE), con una doppia separazione prima per punti isoelettrici (pI), e poi ortogonalmente per pesi molecolari (MW) (O'Farrell, 1975). Alla fine i gel 2D rappresentano dei veri e propri pattern proteici confrontabili sia qualitativamente che quantitativamente attraverso un'analisi delle immagini utilizzando software dedicati che permettono anche accurate analisi statistiche (Jimenez et al., 2013).

## 2. APPARECHIATURE

- 2.1 Centrifuga termostata L'intervallo di temperatura deve essere almeno 0-25 °C;
- 2.2 Rotore ad angolo fisso per 6 provette da 50 mL, compatibile con la centrifuga termostata. Il rotore richiesto deve essere adatto a raggiungere RCF fino a 5000 x g;
- 2.3 Rotore ad angolo fisso per 24 microprovette da 2,0 mL, compatibile con la centrifuga termostata. Il rotore richiesto deve essere adatto a raggiungere RCF fino a 20000 x g;
- 2.4 Vortex da banco;
- 2.5 Agitatore termostato da banco ("thermomixer") per 24 microprovette da 2,0 mL. L'intervallo di temperatura deve essere almeno 4-80 °C;
- 2.6 Congelatore per conservare i campioni a -18 °C;
- 2.7 Strisce di gradiente di pH immobilizzante (IPG strip) per isoelettrofocalizzazione (IEF);
- 2.8 Multirack per IPG strip per la contemporanea incubazione del necessario numero di strisce;
- 2.9 Apparecchiatura per IEF;
- 2.10 Apparati per elettroforesi in gel di poliacrilammide (PAGE);
- 2.11 Agitatore orbitale da laboratorio 0-200 rpm;
- 2.12 Scanner e software per acquisizioni di gel di poliacrilammide;
- 2.13 Congelatore per conservare i campioni a -80 °C.

## 3. REAGENTI E MATERIALI

- 3.1 Ammonio acetato 0,1 N: pesare la quantità necessaria per ottenere 0,1 N in base al numero di campioni, scioglierla in metanolo puro e conservare a -20 °C;
- 3.2 Sodio dodecil solfato (SDS) al 10%: pesare la quantità necessaria per raggiungere il 10%, scioglierla in acqua ultrapura e conservare a temperatura ambiente;
- 3.3 Soluzione di fenolo (si può preparare anche qualche giorno prima): sempre sotto cappa chimica, pesare 10,0 g di fenolo puro, posizionare la quantità pesata in una bottiglia di vetro in borosilicato con tappo a vite, aggiungere 1,0 mL di acqua ultrapura, chiudere il tappo e agitare gentilmente con vortex fino a completo scioglimento;
- 3.4 Etanolo al 70%: diluire una soluzione più concentrata con acqua ultrapura per ottenere una concentrazione finale del 70% e conservare a -

- 18 °C;
- 3.5 Acetone all'80%: diluire una soluzione più concentrata con acqua ultrapura per ottenere una concentrazione finale dell'80% e conservare a -20 °C;
- 3.6 *Coomassie-based protein staining solution 1*: sciogliere 50,0 g di Coomassie Blue Brilliant G-250 in 1 L di acqua ultrapura;
- 3.7 *Coomassie-based protein staining solution 2*: sciogliere 50,0 g di ammonio solfato in 300 mL di acqua ultrapura; sotto cappa, aggiungere delicatamente 6,0 mL di acido fosforico all'85%; portare il volume fino a circa 485 mL con acqua ultrapura; infine aggiungere 10,0 mL di *Coomassie-based protein staining solution 1* lasciando agitare per almeno 30 minuti; infine portare definitivamente a 500 mL con acqua ultrapura;
- 3.8 *Coomassie-based protein staining solution 3*, da preparare appena prima dell'uso: mescolare 2 parti di *Coomassie-based protein staining solution 2* con 1 parte di metanolo al 99,8%;
- 3.9 *Running buffer 10 x*: tris(idrossimetil)amminometano (Tris) 30,0 g; glicina 144,0 g; SDS 10,0 g; 1,0 L di acqua ultrapura;
- 3.10 *Sample buffer*: 12,5 mL di Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8); 10,0 mL di glicerolo all'87%; 20,0 mL di SDS al 10%; 5,0 mL di  $\beta$ -mercaptoetanolo; 1,0 mL di blu di bromofenolo allo 0,5%; 50,0 mL di acqua ultrapura;
- 3.11 *Fixing solution*: acido acetico glaciale al 10%; etanolo al 40%; acqua ultrapura al 50%;
- 3.12 Soluzione "madre" *equilibration buffer*: Tris-HCl 50 mM (pH 8,8), urea 6 M, glicerolo al 30%, SDS al 2% con tracce di blu di bromofenolo;
- 3.13 *Rehydration solution*: utilizzare la soluzione consigliata dal produttore per reidratare le IPG-strip subito prima dell'uso e per eliminare efficacemente qualsiasi ossidazione non specifica dei gruppi tiolici, al fine di evitare eventuali effetti di "striatura" durante l'IEF;
- 3.14 *Equilibration buffer 1*: da preparare appena prima dell'uso, il volume finale dipende dal numero di strisce IPG da analizzare: aggiungere ditio-DL-treitolo (DTT) fino a raggiungere una concentrazione di 65 mM all'aliquota con volume calcolato al bisogno di soluzione "madre" *equilibration buffer*;
- 3.15 *Equilibration buffer 2*: da preparare appena prima dell'uso, il volume finale dipende dal numero di strisce IPG da analizzare: aggiungere iodoacetamide (IAA) fino a raggiungere una concentrazione di 100 mM all'aliquota con volume calcolato al bisogno di soluzione "madre" *equilibration buffer*;

### 3. PROCEDURA DI ESTRAZIONE DELLE PROTEINE

1. Le soluzioni di:
- ammonio acetato 0,1 N in metanolo,
  - 80% acetone,
  - 70% etanolo

- vanno preparate almeno il giorno prima e mantenute a -18 °C fino all'uso.
2. Inserire il rotore per provette da 50 mL nella centrifuga termostata e impostarla a 4 °C aspettando che raggiunga tale temperatura.
3. Fanghi attivi: trasferire 25 mL in una provetta da centrifuga da 50 mL per almeno tre repliche. Acque reflue urbane: distribuire un campione di 100 mL in provette da centrifuga da 50 mL aliquidando 25 mL in ciascuna provetta; la distribuzione deve essere fatta per almeno tre repliche. Se il campione ha una concentrazione inferiore a 1g L<sup>-1</sup>, il volume di partenza può essere aumentato.
4. Centrifugare per 10 minuti / 4000 x g / 4 °C.
5. Scartare il surnatante. Solo se non è possibile continuare nella stessa giornata, congelare i pellet a -80 °C.
6. Se precedentemente congelato, scongelare delicatamente il campione a temperatura ambiente.
7. Solo per ogni replica di fanghi attivi: aggiungere NaCl (0,9 N) fino a raggiungere un volume finale di 10 mL per ogni provetta da 50 mL, quindi mescolare delicatamente per sospendere bene il pellet. Solo per le aliquote di ogni replica di acque reflue urbane: aggiungere 2,5 mL di NaCl (0,9 N) per ciascuna aliquota, risospendere il pellet, quindi riunificare tutte le aliquote della stessa replica ottenendo sempre un volume finale di 10 mL per ogni singola replica di campione.
8. Il resto del protocollo si riferisce a una sola replica. Da ora in poi, **operare sempre sotto cappa chimica** per tutta la procedura di questo paragrafo.
9. Preparare e segnare 20 microprovette da centrifuga da 1,5 mL per ogni replica.
10. Distribuire i 10 mL di ogni campione risospeso in aliquote di 0,5 mL in ogni microprovetta da 1,5 mL.
11. Aggiungere 0,5 mL della soluzione di fenolo in ogni microprovetta.
12. Miscelare bene per 5 secondi tramite vortex, e incubare in thermomixer per 1h / 1400 rpm / 20 °C.
13. Nel frattempo, inserire nella centrifuga termostata il rotore per microprovette, impostarla a 20 minuti / 12000 x g / 20 °C, e attendere che raggiunga la temperatura.
14. Avviare la centrifugazione per separare la fase acquosa da quella fenolica.
15. Preparare altre 20 microprovette da 1,5 mL per ogni campione.
16. Al termine della centrifugazione, trasferire tutta la fase fenolica di ciascuna provetta (circa 0,4 mL) in una delle nuove provette da 1,5 mL, evitando scrupolosamente di aspirare la fase acquosa o la zona interfase.
17. Aggiungere 0,4 mL di acqua ultrapura in ciascuna provetta, agitare su vortex per 5 secondi, e incubare nel thermomixer per 30 minuti / 1400 rpm / 20 °C.

18. Centrifugare tutte le microprovette per 20 minuti / 12000 x g / 20°C per separare nuovamente la fase acquosa da quella fenolica. Durante la centrifugazione, preparare 20 microprovette da 2,0 mL per ogni campione.
19. Al termine della centrifugazione, trasferire tutta la fase fenolica di ciascuna provetta (circa 0,4 mL) in una delle nuove provette da 2,0 mL, evitando nuovamente di aspirare la fase acquosa o la zona interfase.
20. Aggiungere 1,6 mL di ammonio acetato 0,1 N in metanolo puro conservato a -20°C in ciascuna microprovetta e agitare su vortex per 5 secondi per far precipitare le proteine.
21. Incubare per 1 h a -18°C, e impostare subito la centrifuga a 4°C.
22. Centrifugare per 20 minuti a 12000 x g a 4°C.
23. Scartare il surnatante mantenendo il pellet, e aggiungere 1,0 mL di altro ammonio acetato 0,1 N in metanolo puro conservato a -20°C in ogni microprovetta.
24. Incubare per altri 15 minuti a -20°C.
25. Centrifugare per 5 minuti / 12000 x g / 4°C.
26. Scartare il surnatante mantenendo il pellet, e aggiungere 1,5 mL di 80% acetone conservato a -20°C a ogni microprovetta.
27. Incubare per 15 minuti a -20°C.
28. Centrifugare per 5 minuti / 12000 x g / 4°C.
29. Ripetere gli step 26, 27 e 28.
30. Scartare il surnatante mantenendo il pellet, e aggiungere 1,5 mL di 70% etanolo conservato a -20°C.
31. Incubare per 15 minuti a -20°C.
32. Centrifugare per 5 minuti / 12000 x g / 4°C.
33. Scartare il surnatante prestando attenzione a mantenere 100–150 µL di 70% etanolo per coprire il pellet proteico in condizioni di umidità.
34. Conservare le microprovette a -20°C.

#### 4. SDS PAGE

1. Considerare una corsia elettroforetica per ogni campione/replica per poi calcolare il numero di *gel da preparare*.
2. Pulire i vetri con una soluzione di etanolo da lavaggio al 70% e preparare l'apparato per la polimerizzazione dei gel seguendo le istruzioni del produttore.
3. *Resolution gel* di poliacrilammide al 12% con base da 8 cm: in ordine, sotto cappa aggiungere in un beaker con agitatore magnetico 2,5 mL di Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 0,1 mL di 10% SDS, 4,0 mL di soluzione acrilammide/bisacrilammide al 30% (rapporto 37,5:1), 3,3 mL di acqua ultrapura; infine, quasi contemporaneamente, aggiungere 75,0 µL di 10% ammonio persolfato (APS) al 10% e 7,5 µL di N,N,N',N'-tetrametiletildiammina (TEMED). Miscelare tutti i volumi indicati solo al momento della preparazione del gel. Tutte le soluzioni

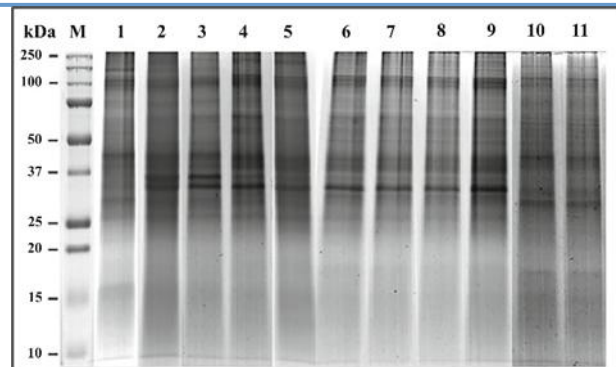
possono essere preparate nei giorni precedenti e conservati in frigorifero, tranne 10% SDS che va conservata a temperatura ambiente, e 10% APS che può essere ripartita in aliquote e subito congelata a -20°C (scongela solo al momento della preparazione del gel e nella quantità necessaria).

4. Subito dopo l'aggiunta di APS e TEMED, prelevare con una pipetta da 10 mL monouso la miscela polimerizzante e depositarla con attenzione nello spazio da 0,1 cm tra i due vetri in verticale dell'apparato di polimerizzazione di gel impiegandoci non più di 6-7 secondi onde evitare una polimerizzazione disomogenea o con un limite superiore del gel non lineare.
5. Caricare rapidamente, ma delicatamente, una linea sottile di etanolo al 70% sul limite superiore del resolution gel appena caricato tra i vetri per favorire la linearizzazione del suo limite superiore.
6. Dopo almeno 30 minuti, verificare se il gel residuo nel beaker è polimerizzato risultando non più liquido. Se il controllo è positivo, rimuovere l'etanolo lavando cinque o sei volte con acqua ultrapura, quindi rimuovere l'acqua ultrapura assorbendola con carta bibula.
7. *Stacking gel* di poliacrilammide al 6% con base da 8 cm: aggiungere in un beaker con agitatore magnetico nell'ordine: 2,5 mL di Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8); 0,1 mL di SDS al 10%; 1,3 mL di soluzione acrilammide/bisacrilammide al 30% (rapporto 37,5:1); 3,0 mL di acqua ultrapura; infine, quasi contemporaneamente, aggiungere 75,0 µL di APS al 10% e 15,0 µL di TEMED. Come al punto precedente, miscelare tutti i volumi indicati solo al momento della preparazione del gel, e rispettare le accortezze nella conservazione delle singole soluzioni.
8. Anche qui, subito dopo l'aggiunta di APS e TEMED, prelevare con una pipetta monouso da 10 mL la miscela polimerizzante e depositarla con attenzione nello spazio da 0,1 cm tra i due vetri in verticale dell'apparato di polimerizzazione del gel impiegandoci non più di 6-7 secondi onde evitare una polimerizzazione disomogenea.
9. Infine, inserire l'apposito comb per la creazione dei pozzetti di caricamento dei campioni facendo attenzione a evitare di creare bolle d'aria nel gel. In questa operazione, parte dello stacking gel potrebbe fuoriuscire; *potrà essere rimosso* solo dopo la polimerizzazione, se necessario.
10. Anche qui, lasciare polimerizzare fino a che il residuo nel beaker non appare più liquido.
11. Tutte le quantità e i volumi indicati si riferiscono a un gel di circa 10 (altezza) x 8 (larghezza) x 0,1 cm (spessore). Per esigenze diverse, calcolare le quantità proporzionalmente ai volumi dei *resolution* e *stacking* gel.
12. Quando il gel è polimerizzato, rimuovere il *comb* di plastica, lavare i pozzetti due o tre volte con *running buffer 1x*. Infine, riempire i pozzetti con lo stesso *running buffer 1x*. Se necessario, il gel può essere conservato in frigorifero ed essere



pronto per l'uso anche dopo 1 giorno.

13. Risospendere il più possibile il pellet delle microprovette da analizzare nei restanti 100-150  $\mu$ L di etanolo al 70%.
14. Trasferire 5  $\mu$ L del pellet sospeso da ciascuna microprovetta in una nuova microprovetta.
15. Incubare le nuove provette nel thermomixer per 2 minuti / 1400 rpm / 60 °C, lasciando i tappi aperti per far evaporare l'etanolo.
16. Rimuovere le microprovette dal thermomixer e lasciarle a temperatura ambiente per circa 10-15 minuti, quindi aggiungere 10  $\mu$ L di SDS al 10% a ciascuna provetta per solubilizzare il pellet essiccato e denaturare le proteine.
17. Incubare in thermomixer per 20 minuti / 1400 rpm / 20°C.
18. Aggiungere 10  $\mu$ L di *sample buffer* a ciascuna provetta.
19. Incubare per 3 minuti / 1400 rpm / 60°C.
20. Centrifugare per 5 minuti / 16000 x g / 20°C.
21. Trasferire 10  $\mu$ L di surnatante contenente proteine denaturate da ciascuna provetta selezionata in un pozzetto dell'SDS PAGE.
22. Caricare 2  $\mu$ L di soluzione standard di marker nel pozzetto dedicato per la stima dei pesi molecolari.
23. Delicatamente, riempire i pozzetti uno a uno con *running buffer* fino all'orlo facendo attenzione che i campioni, visualizzabili col blu di bromofenolo, rimangano quanto più sul fondo e che assolutamente non fuoriescano dai pozzetti.
24. In base alle indicazioni del produttore dell'apparato elettroforetico, aggiungere un volume adeguato di *running buffer* alla camera elettroforetica.
25. Collegare l'apparecchio per elettroforesi all'alimentatore e avviare la corsa, sempre rispettando le indicazioni del produttore, assicurandosi che i buffer, i gel e, in generale, le camere non si surriscaldino. In tal caso, utilizzare un circuito di raffreddamento della camera.
26. Quando la linea del fronte del blu di bromofenolo del *sample buffer* è prossima al fondo dei gel, preparare la *Coomassie-based protein staining solution 3*.
27. Quando la linea del fronte del blu di bromofenolo raggiunge il fondo dei gel, interrompere la corsa e smontare l'apparecchio.
28. Appoggiare i vetri con il gel su un piano pulito, e aprirli delicatamente facendo in modo che il gel rimanga attaccato solo su uno. Mantenendo umido con *running buffer*, staccare il gel con delicatezza anche dal secondo vetro e, tenendolo con attenzione dai due lati in modo che non si rompa, riporlo in una vaschetta.
29. Riempire ogni vaschetta di *fixing solution*, utile a bloccare le proteine nella posizione acquisita dopo la corsa, in una quantità sufficiente a mantenere il gel ben immerso.



**Figura 1.** SDS PAGE dove nella prima "lane" (M) è rappresentata la corsa di una soluzione marker con MW noti per riferimento, mentre le altre "lane" mostrano le corse contemporanee di 11 campioni dello stesso fango attivo campionato in momenti e condizioni diversi.

30. Chiudere le vaschette con i rispettivi coperchi, e posizionarle su un agitatore orbitale per 30 minuti.
31. Rimuovere i gel dalla *fixing solution*, quindi lavarli immergendoli completamente in altre vaschette chiuse con acqua ultrapura e posizionandole nuovamente sull'agitatore orbitale per altri 30 minuti.
32. Ripetere l'operazione di rimozione dalle vaschette e lavare nuovamente con altra acqua ultrapura.
33. Infine, rimuovere i gel dall'acqua di lavaggio e immergerli nella *Coomassie-based protein staining solution 3* per tutta la notte.
34. Il giorno successivo, rimuovere i gel dalla soluzione di Coomassie, lavarli tre volte consecutive per 5 minuti con acqua ultrapura, e acquisire digitalmente le immagini dei gel tramite uno scanner dedicato alle stesse condizioni (luce, contrasto, colori ed eventuali altri parametri).
35. Successivamente, i gel possono essere conservati sottovuoto per alcune settimane per scopi diversi.

La Figura 1 mostra un esempio di SDS PAGE eseguita su miscele proteiche estratte dallo stesso fango attivo in tempi e condizioni diversi.

## 5. DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE PROTEINE TOTALI

In un'analisi 2D PAGE, per una corretta valutazione dei cambiamenti di espressione proteica in diversi contesti, è fondamentale caricare sulle IPG strip la stessa quantità di proteine totali per i diversi campioni. Per questo è necessario determinare le concentrazioni di proteine totali nei campioni di estratti proteici.

Esempi di metodi convenzionalmente usati per il dosaggio delle proteine totali sono:

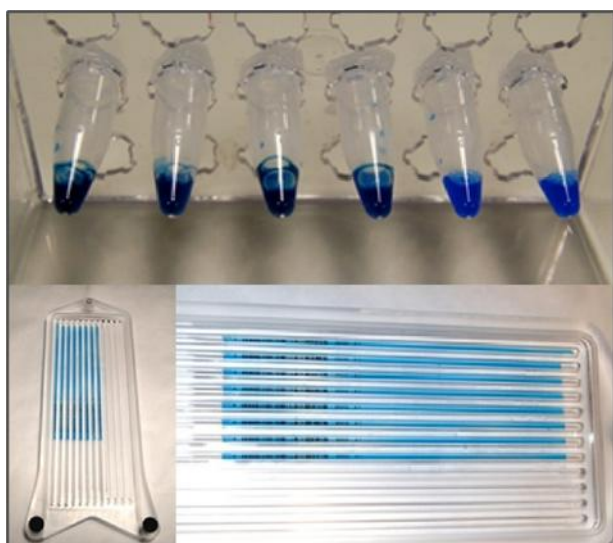
- Saggio di Lowry (Lowry et al., 1951);
- Saggio dell'amido nero (Dieckmann-Schuppert and Schnittler, 1997);
- Saggio dell'acido bicinconinico (BCA) (Walker, 2009);

- Saggio di Bradford (Bradford, 1976).

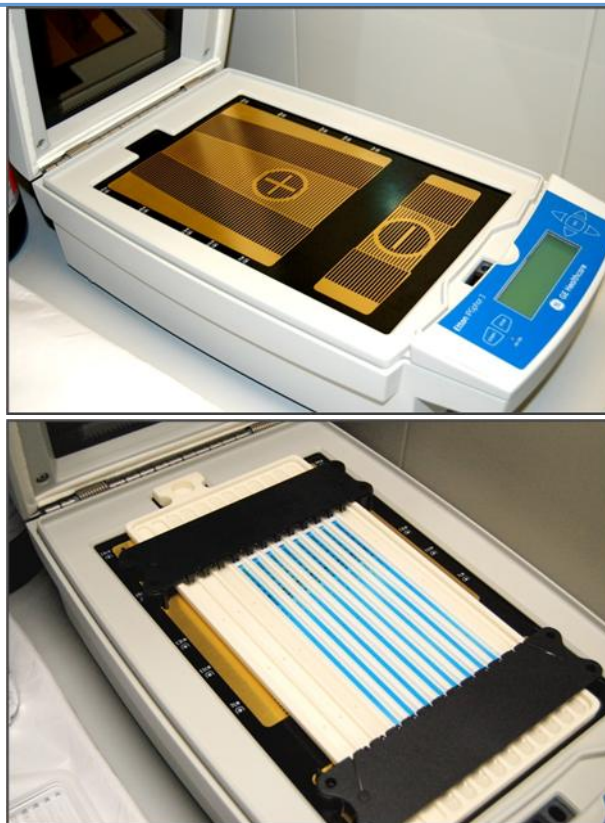
Si suggerisce di effettuare preliminarmente delle prove con i diversi saggi. In questo modo, a seconda delle caratteristiche dei propri campioni e incrociando le rese, verrà individuato il saggio più efficiente che potrà quindi essere adottato per la quantificazione definitiva dei campioni.

## 6. 2D PAGE

1. Anche il giorno prima, per ogni campione che verrà caricato su una IPG strip, preparare un *resolution gel* di poliacrilamide al 12% come descritto nella sezione SDS PAGE, ma senza *stacking gel*. Le dimensioni del gel dovranno essere tali che l'IPG strip possa essere completamente inclusa nella lunghezza orizzontale del gel.
2. Trasferire in una nuova microprovetta il volume di campione calcolato per avere la stessa quantità in ogni IPG strip (paragrafo 5), e incubare in *thermomixer* a 60°C per 2 minuti a 1400 rpm per far evaporare l'etanolo.
3. Aggiungere immediatamente la quantità di *rehydration solution* così come consigliato dal produttore in base al tipo della IPG strip e incubare sempre in *thermomixer* a 20°C per 20 minuti a 1400 rpm.
4. Centrifugare le provette a 16000 x g per 5 minuti a temperatura ambiente, nel frattempo disporre ogni IPG strip su una corsia della *multirack* con il lato con il gel verso l'alto.
5. Al termine della centrifugazione, caricare il surnatante di ogni provetta sulla corrispondente IPG strip precedentemente posizionata nella *multirack*, inserendo anche un campione con marker con pesi molecolari e punti isoelettrici noti.
6. Ricoprire tutte le corsie con le IPG strip con olio minerale per IEF, e lasciare reidratare per 12-18 ore (Figura 2).
7. Con una pinzetta pulita, prelevare dalle estremità una IPG strip alla volta per posizionalle con



**Figura 2.** Solubilizzazione del campione, e reidratazione delle IPG strip con incubazione parallela in *multirack* per 12-18 ore.

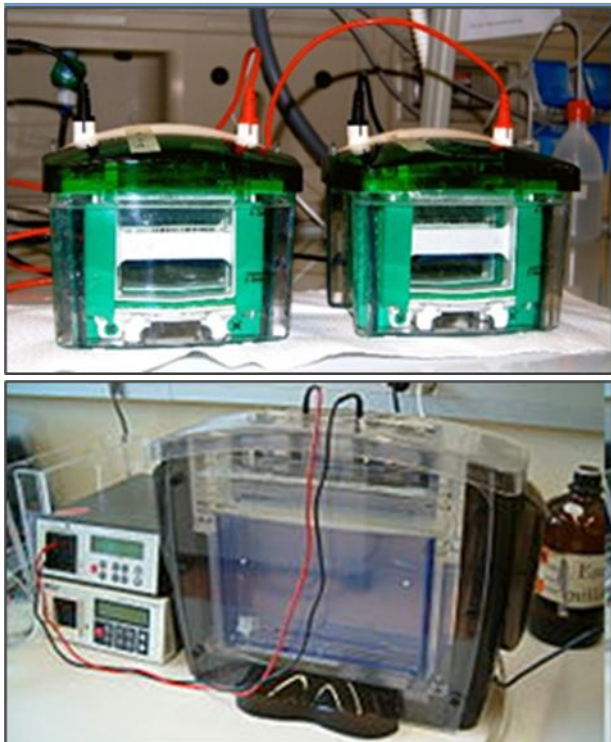


**Figura 3** Apparato per isoelettrofocalizzazione (IEF) (sopra) e allestimento con *manifold* in ceramica, IPG strip e ponti per gli elettrodi (sotto).

cura nel *manifold* in ceramica dell'apparato IEF (figura 3).

8. Seguendo accuratamente le istruzioni del produttore, montare il resto dell'apparato per la corsa IEF rispettando le polarità (figura 3).
9. Eseguire una IEF tramite *ramping* di voltaggio per distribuire la miscela proteica sul gradiente di pH di ogni IPG strip in base ai pI delle varie proteine, sempre seguendo le istruzioni del produttore delle strip.
10. Successivamente, mantenere ogni IPG strip nella rispettiva corsia e con attenzione inclinare il *manifold* di circa 45° lavando ogni corsia con acqua ultrapura per rimuovere fisicamente la maggior parte dell'olio e il liquido residuo dei campioni, prestando molta attenzione a non far scivolare via le IPG strip.
11. Rimuovere l'acqua residua dai lati delle IPG strip che non espongono il gel tamponando con carta bibula, evitando accuratamente di toccare il lato scoperto col gel.
12. Per stabilizzare le proteine separate in base al loro pI, trasferire ogni IPG strip in una corsia di una seconda *multirack*.
13. Incubare ogni IPG strip nell'*equilibration buffer* 1 per 10 minuti per ridurre i ponti disolfuro delle proteine.
14. Lavare con acqua ultrapura le strip, assorbire nuovamente l'acqua residua tamponando con carta bibula dai lati che non espongono il gel, e incubare ogni IPG strip nell'*equilibration buffer* 2 per altri 10 minuti per la loro alchilazione e





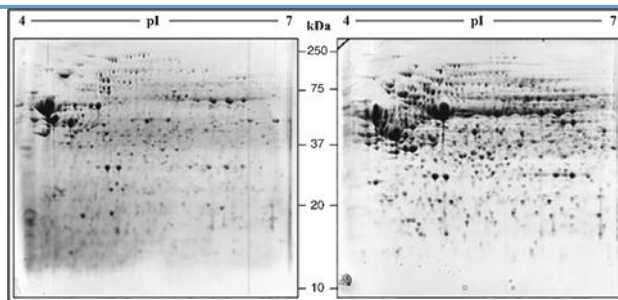
**Figura 4.** Apparati per PAGE: *mini chambers* per IPG strip da 7 cm (sopra), e *big chambers* per IPG strip da 24 cm (sotto).

stabilizzazione.

15. Lavare ogni IPG strip con acqua ultrapura e posizionarla sul *resolution gel* di poliacrilammide al 12% (preparato senza lo *stacking gel*) in modo che il gel della IPG strip da un lato entri ben a contatto con la parte superiore del *resolution gel*.
16. Riscaldare una soluzione di agarosio allo 0,5% per liquefarla e versarla a monte della strip, lasciarla raffreddare per bloccare definitivamente l'IPG strip a contatto col gel di poliacrilammide. Eseguire tutte le elettroforesi su gel in parallelo, quindi rimuovere l'apparato, fissare e colorare le proteine, come già descritto nella seconda parte del paragrafo 4. La figura 4 mostra due apparati per elettroforesi verticali allestiti rispettivamente per due diverse dimensioni di IPG strip.
17. Acquisire le immagini dei gel prodotti con uno scanner collegato a una workstation dedicata,



**Figura 5.** Scanner e workstation dedicati per l'acquisizione dei gel per la successiva analisi statistica delle immagini.



**Figura 6.** Pattern proteici da 2D PAGE relativi allo stesso fango attivo prelevato in due momenti diversi. Entrambi i 2D gel presentano una distribuzione di proteine nel range di pH 4-7 sull'asse x, e nel range di MW 250-10 kDa sull'asse y.

che permette anche di effettuare l'analisi delle immagini per valutazioni statistiche della distribuzione ed espressione degli spot proteici (figura 5).

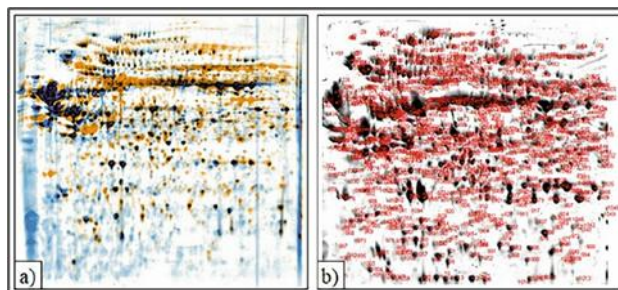
La figura 6 mostra due gel 2D di due diverse condizioni dello stesso fango attivo. Ogni spot è associato a una proteina con i corrispondenti valori di pl e MW.

## 7. ANALISI DELLE IMMAGINI

Esistono diversi software per l'analisi delle immagini idonea ai gel 2D con diverse strategie di elaborazione, sia commerciali che open source (Holstein and Muth, 2024). Di seguito viene descritta una semplice strategia per il confronto di due campioni di una stessa origine prelevati in due momenti o condizioni differenti.

1. Confrontare i gel 2D di repliche di uno stesso campione per verificare la generale corrispondenza degli stessi spot nei diversi gel e per valutare eventuali discrepanze di natura tecnica (figura 7a).
2. Assegnare un ID a ogni spot di tutti i gel 2D sottoposti alla stessa analisi (figura 7b).
3. Confrontare i gel di condizioni o momenti diversi per rilevare e quantificare le eventuali differenze nell'espressione degli spot identificati (costanza o variazione dell'espressione proteica).
4. Eseguire analisi statistiche per definire e convalidare la dinamica dell'espressione proteica.

Un esempio di una strategia semplificata di analisi delle immagini è mostrato in figura 7: due gel corri-



**Figura 7.** Sovrapposizione di due gel colorati in blu e arancio, dove gli spot in comune appaiono neri (a); gel virtuale "di fusione" tra due condizioni diverse dove viene assegnato un ID a ogni spot, poi mantenuto a ritroso nei due singoli gel (b).



spondenti a due condizioni diverse da confrontare sono stati colorati differentemente dal software (nell'esempio arancione e blu) e sono stati sovrapposti. Tale sovrapposizione rivela gli spot comuni in nero, mentre gli spot presenti in un solo gel mantengono i rispettivi colori arancione o blu. In questo modo, si rendono subito evidenti le principali variazioni di espressione tra le due condizioni (spot rimasti arancione o blu), oppure la costanza di espressione (spot neri), su cui approfondire gli step statistici successivi

## 9. CONCLUSIONI

La biodiversità delle comunità microbiche si riflette anche nella complessità dei co-metabolismi che le caratterizzano. L'esigenza di una profonda comprensione dei meccanismi biochimici alla base delle biodegradazioni rende indispensabile avere una corretta idea delle dinamiche delle proteine e degli enzimi del consorzio microbico. Tuttavia, grazie al turnover delle proteine, l'espressione delle proteine può variare facilmente a seconda delle condizioni a cui sono esposti i consorzi microbici. Per questo è importante individuare i momenti e le condizioni di interesse, per poi confrontare i relativi pattern proteici grazie alla metodica *gel based* per l'estrazione e separazione delle proteine qui descritta. La risoluzione della miscela proteica in spot tramite gel 2D può anche permettere l'excisione (taglio) degli spot più interessanti risultati dall'analisi delle immagini. Negli approcci *gel-based* di proteomica, tali spot possono essere trattati per recuperare le proteine corrispondenti dal gel, per poi essere analizzate con tecniche di spettrometria di massa (MS) in modo da determinarne le sequenze amminoacidiche. Una volta ottenute le sequenze, esistono diversi strumenti bioinformatici con cui si cercano, in dedicati database come Uniprot o NCBI, le sequenze a più alta similarità provando ad identificare finalmente la proteina di ogni spot con un alto grado di confidenza.

## BIBLIOGRAFIA

Bassin JP, Castro FD, Valério RR et al. (2021) The impact of wastewater treatment plants on global climate change. In: Thokchom B, Qiu P, Singh P, Iyer PK (Eds.) *Water Conservation in the era of global climate change*, pp. 367-410. Elsevier, Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820200-5.00001-4>

De Celis M, Duque J, Marquina D et al (2022) Niche differentiation drives microbial community assembly and succession in full-scale activated sludge bioreactors. *NPJ Biofilms Microbiomes* 8: 23. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00291-2>

Dieckmann-Schuppert A, Schnittler HJ (1997) A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell. Tissue Res.* 288: 119-126. <https://doi.org/10.1007/s004410050799>

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein

utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Holstein T, Muth T (2024) Bioinformatic workflows for metaproteomics. In: Salerno, C. (Ed.) *Metaproteomics. Methods in Molecular Biology*, vol 2820. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3910-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3910-8_16)

Jimenez J, Vedrenne F, Denis C et al. (2013) A statistical comparison of protein and carbohydrate characterisation methodology applied on sewage sludge samples. *Water Res* 47(5): 1751-1762. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.052>

Kuhn R, Benndorf D, Rapp E, Reichl U, Palese LL, Pollice A (2011) Metaproteome analysis of sewage sludge from membrane bioreactors. *Proteomics* 11: 2738-2744. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000590>

Lederberg J, McCray AT (2001) 'Ome sweet 'omics - a genealogical treasury of words. *The Scientist* 15(7): 8. <https://www.the-scientist.com/ome-sweet-omics--a-genealogical-treasury-of-words-54889>

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)

Preisner M (2020) Surface water pollution by untreated municipal wastewater discharge due to a sewer failure. *Environ. Process* 7: 767-780. <https://doi.org/10.1007/s40710-020-00452-5>

Rodriguez-Valera F (2004) Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiol. Lett.* 231(2): 153-8. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00006-0)

Salerno C, Berardi G, Laera G, Pollice A (2019) Functional Response of MBR Microbial Consortia to Substrate Stress as Revealed by Metaproteomics. *Microb. Ecol.* 78(4): 873-884. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01360-4>

Samal K, Mahapatra S, Ali MH (2022) Pharmaceutical wastewater as Emerging Contaminants (EC): treatment technologies, impact on environment and human health. *Energy Nexus* 6: 100076. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100076>

Walker JM (2009) The Bicinchoninic Acid (BCA) assay for protein quantitation. In: Walker JM (Eds.) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press. pp. 11-15. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_3)

Wilmes P, Heintz-Buschart A, Bond PL (2015) A decade of metaproteomics: where we stand and what the future holds. *Proteomics* 15: 3409-3417. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500183>

# Analisi della presenza di azitromicina e del rischio ambientale in acque superficiali mediante monitoraggio e modelli

a cura di

*Anna Maria De Girolamo (\*), CNR, Istituto di Ricerca sulle Acque, Sede di Bari*

*Giovanni Francesco Ricci, Giuseppe Parete, Francesco Gentile, Università Degli Studi di Bari Aldo Moro, Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Bari*

*Olga Gómez-Navarro, Sandra Pérez, ONHEALTH, IDAEA-CSIC, Department of Environmental Chemistry, Jordi Girona, Barcellona (Spagna)*

## RIASSUNTO

Questo studio propone una metodologia per valutare il destino ambientale dei farmaci provenienti da scarichi urbani e stimare il rischio ecotossicologico associato alla loro presenza nelle acque superficiali, integrando monitoraggio e modellistica. Il modello idrologico “Soil and Water Assessment Tool” (SWAT) ed il modello di qualità delle acque “Geography-referenced Regional Exposure Assessment Tool for European Rivers” (GREAT-ER) sono stati implementati a cascata. Le misure di portata fluviale e di concentrazioni di azitromicina (AZ) hanno supportato la calibrazione dei modelli. La concentrazione ambientale predetta (PEC) di AZ e il rischio ecotossicologico sono stati valutati alla scala di segmento fluviale nel Canale D'Aiedda (Puglia). I risultati indicano una marcata stagionalità nella presenza di AZ negli effluenti degli impianti di trattamento e nelle acque superficiali, con PEC registrati in agosto inferiori di un ordine di grandezza rispetto a marzo. La stima del rischio ecotossicologico ha evidenziato una diffusa presenza di AZ con valori di PEC superiori alla “Concentrazione Predetta Senza Effetto” (PNEC) nei segmenti fluviali a valle dei punti di immissione. L'integrazione dei due modelli si è rivelata efficace nel rappresentare le complesse interazioni tra idrologia e qualità delle acque in corsi d'acqua intermittenti, costituendo uno strumento utile per la mappatura e la gestione del rischio associato ad inquinanti emergenti.

## SUMMARY

The aim of this work is to define a modelling approach for assessing the fate of pharmaceuticals and the ecotoxicological risk in surface waters in intermittent rivers. A hydrological model (Soil and Water Assessment Tool) and a water quality model (Geography-referenced Regional Exposure Assessment Tool for European Rivers) were used in a modelling cascade application in the Canale D'Aiedda basin (S-E, Italy). Measurements of streamflow and azithromycin (AZ) concentrations were used for calibrating the models. Predicted Environmental Concentrations (PEC) of AZ in surface waters and the ecotoxicological risk were assessed. The highest AZ concentrations in the effluent of wastewater treatment plants (2553 ng L<sup>-1</sup>) and in surface waters were recorded in March 2021. The monitoring and modelling indicated seasonal changes in AZ concentrations in surface waters: in August, the PEC was one order of magnitude lower than in March. The results of the ecotoxicological risk assessment showed that in March most of the river network presented a PEC of AZ higher than the Predicted No-Effect Concentration (PNEC). Coupling the two models has proven to be an effective approach to address the complex interaction between hydrology and water quality in intermittent rivers, suitable for identifying the occurrence and environmental risk of emerging pollutants, fundamental steps for their management.

## 1. INTRODUZIONE

Gli antibiotici sono considerati tra i principali inquinanti emergenti (US-EPA, 2009). La presenza di azitromicina (AZ) nelle acque superficiali è stata associata a potenziali effetti tossici (Almeida et al., 2021; Grabicova et al., 2014; OECD, 2019). La loro persistenza nelle acque superficiali e nei sedimenti fluviali può alterare le comunità microbiche, influenzando i cicli biogeochimici naturali e contribuendo allo sviluppo di resistenza antimicrobica (Barra Caracciolo et al., 2015; Di Cesare et al., 2015; Gómez-Navarro et al., 2024; Shaheen et al., 2022; Wilkinson, et al., 2022). L'azitromicina è ampiamente utilizzata in medicina umana e veterinaria (WHO, 2012). Essa è general-

mente rimossa in modo inefficace dagli impianti di trattamento delle acque reflue (WWTP) convenzionali (Grandclément et al., 2017; Verlicchi et al., 2012). Una volta rilasciata nell'ambiente fluviale, è soggetta a processi di diluizione e attenuazione – come biotrasformazione, adsorbimento, volatilizzazione e fotolisi – che dipendono sia dal tempo di permanenza nel corpo idrico sia dalle caratteristiche fisico-chimiche del sedimento (Patel et al., 2019).

I modelli idrologici e di qualità delle acque costituiscono strumenti efficaci per valutare il destino ambientale dei farmaci e il relativo rischio ecotossicologico in quanto consentono di simulare le concentrazioni ambientali degli inquinanti, integrando dati fisici, idrologici e chimici, e di formalizzare i processi di decadimen-

\* [annamaria.degirolamo@cnr.it](mailto:annamaria.degirolamo@cnr.it)

to che avvengono lungo la rete fluviale (Keller, 2006; van Leeuwen e Vermeire, 2007).

L'obiettivo di questo studio è sviluppare e testare un approccio modellistico per valutare il destino ambientale dell'AZ proveniente da scarichi urbani e di stimare il rischio ecotossicologico associato alla presenza di AZ in corsi d'acqua a carattere intermittente. A tal fine, il modello idrologico *Soil and Water Assessment Tool* (SWAT; Arnold et al., 1998) ed il modello *Geography-referenced Regional Exposure Assessment Tool for European Rivers* (GREAT-ER; Feijtel et al., 1997; Kehrein et al., 2015) sono stati implementati a cascata e la metodologia è stata testata nel Canale D'Aiedda (Taranto), un fiume che, scorre sul fondo di una piccola gravina e sfocia poi nel Mar Piccolo in prossimità dell'Oasi Palude la Vela (WWF).

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Area di Studio: Bacino del Canale d'Aiedda

Il bacino idrografico del Canale d'Aiedda (360 km<sup>2</sup>) è caratterizzato da deflussi intermittenti e dal clima tipicamente mediterraneo, con precipitazioni medie annue pari a 855,9 mm nelle aree montane e 576,2 mm in pianura (dati 1920–2012; Centanni et al., 2024). Il corso d'acqua alimenta la zona umida protetta "Palude la Vela", collegata al Mar Piccolo e riconosciuta come Sito di Importanza Comunitaria (SIC – IT9130004). Tre impianti di trattamento delle acque reflue (WWTP) scaricano i reflui urbani trattati nel reticolo fluviale (Figura 1):

- WWTP1 – Montemesola: 7000 abitanti equivalenti (AE); popolazione media residente 3.608;
- WWTP2 – Monteiasi-Grottaglie: 49.566 (AE); popolazione media residente 36.246;

- WWTP3 – San Giorgio Ionico: 32.164 (AE); popolazione media residente 14.355.

### 2.2 Area di Studio: Bacino del Canale d'Aiedda

La portata giornaliera è stata misurata in due stazioni (A e B; Figura 1) e utilizzata per calibrare il modello idrologico (si rimanda a D'Ambrosio et al., 2019 per i dettagli strumentali). Per la qualità, due campagne di campionamenti sono state condotte in marzo e agosto 2021. In entrambe le date non sono state registrate precipitazioni nel giorno del campionamento e in quello precedente ed è stato verificato che non vi fossero fenomeni di *overflow* dai WWTPs. Nei punti a monte del depuratore di San Giorgio (WWTP3), il flusso risultava assente in entrambi i campionamenti. Durante ciascuna campagna, sono stati raccolti campioni: a monte del punto di scarico del WWTP3 (punto Em, Figura 2), in quattro sezioni a valle (punti EV, EV1, EV2, EV3) e nell'effluente del WWTP3.

I campioni sono stati trasportati in contenitori refrigerati e conservati a -20 °C fino all'estrazione. I tratti fluviali selezionati erano idraulicamente omogenei e privi di influenze esterne (es. affluenti, derivazioni, precipitazioni). Le velocità del deflusso sono state misurate tramite il modulo portatile ISCO 750 *Area-Velocity Flow* e integrate per ottenere la velocità media di sezione. Le profondità dell'acqua sono state rilevate negli stessi punti. Sono stati prelevati 500 mL di acqua, filtrati attraverso filtri in microfibra di vetro GF/F da 0,7 µm (*Whatman*, Regno Unito) e successivamente processati con cartucce SPE multistrato/multi-adsorbente. Gli estratti sono stati analizzati tramite cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione (*Q-Exactive Orbitrap*, *Thermo-Fisher Scientific*, Germania), utilizzando un metodo analitico sviluppato da Gómez-Navarro et al. (2023) per acque superficiali.

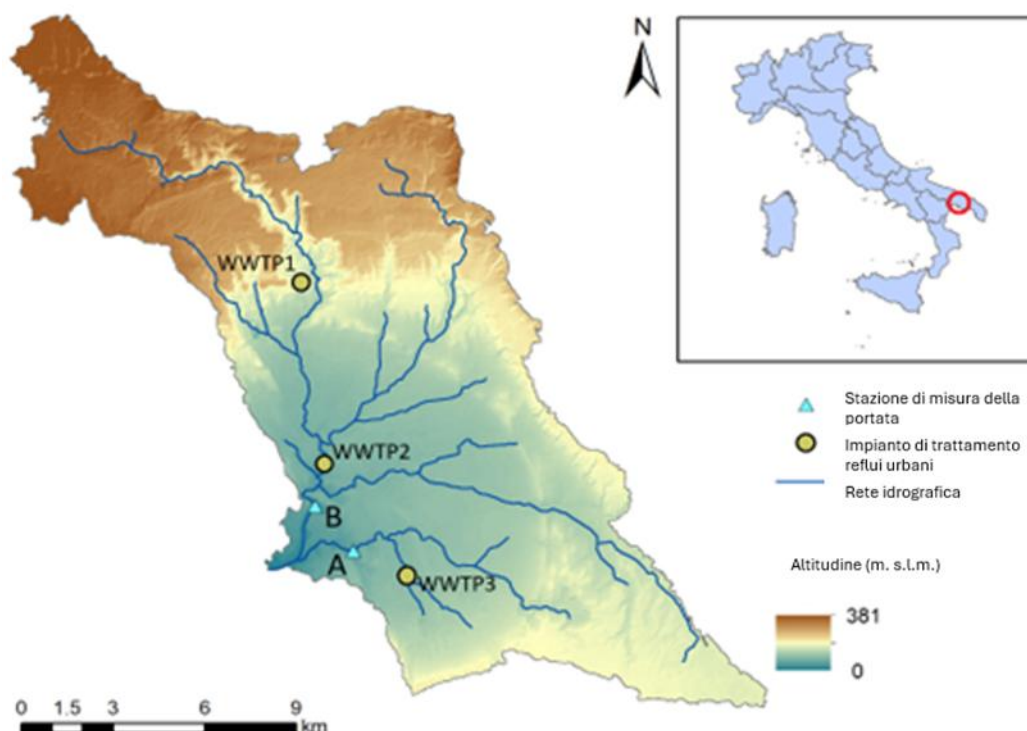
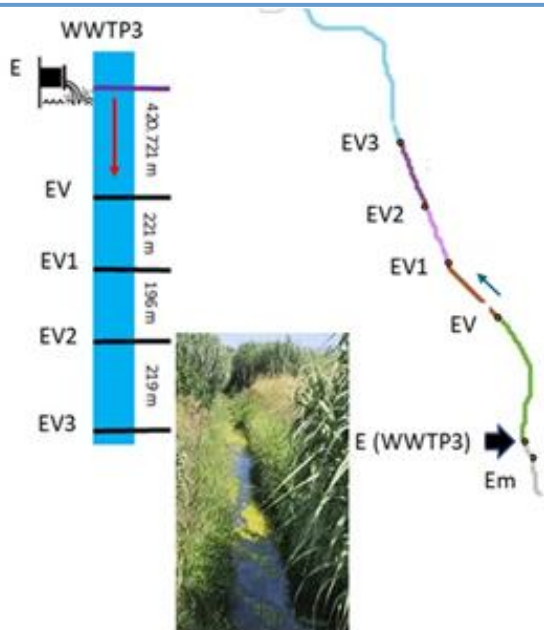


Figura 1. Area di studio: Canale D'Aiedda.





**Figura 2.** Sezioni fluviali relative ai campionamenti. WWTP3 indica l'impianto di depurazione dei reflui urbani del comune di San Giorgio Ionico.

### 2.3 Modello concettuale

L'approccio definito in questo studio combina misure idrauliche e di concentrazione di AZ e due modelli, idrologico e di qualità delle acque, usati a cascata. In particolare, i risultati prodotti dal modello SWAT (portate fluviali) (Arnold et al., 1998) sono stati utilizzati come input nella versione deterministica del modello GREAT-ER (versione 4.1; Kehrein et al., 2015; Feijtel et al., 1997) per simulare il destino dell'AZ nelle acque superficiali.

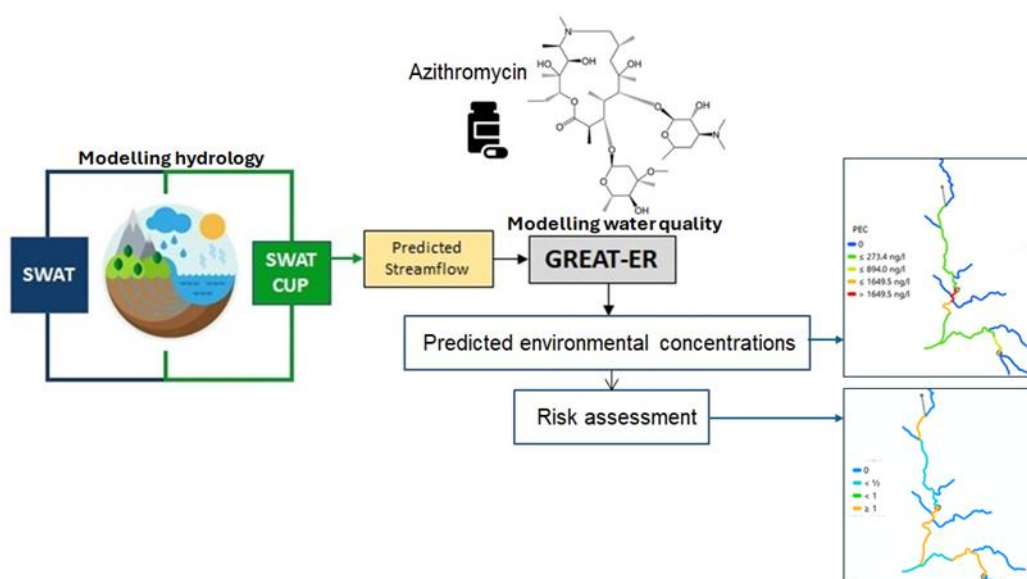
Il modello SWAT è ampiamente utilizzato per simulare i processi idrologici (Leone et al., 2024), erosione, trasporto di sedimenti e nutrienti (Ricci et al., 2022a).

Il modello GREAT-ER consente di predire le concentrazioni ambientali (PEC) di sostanze chimiche in ogni tratto fluviale precedentemente definito (Lämmchen et al., 2021). Simula il rilascio, la degradazione ed il trasporto delle sostanze lungo la rete idrografica, e valuta il rischio ecotossicologico mediante confronto del valore di PEC con il valore soglia di riferimento (Aldekoa et al., 2013).

In questo studio, seguendo l'approccio conservativo proposto da Negrão Carvalho et al. (2016) nel report "Monitoring-based Exercise: Second Review of the Priority Substances List under the Water Framework Directive", si è considerato l'effetto tossico a lungo termine come criterio principale per la valutazione del rischio. La "Concentrazione Predetta Senza Effetto" (PNEC), definita come la concentrazione al di sotto della quale non si prevedono effetti avversi sugli ecosistemi, è stata assunta pari a  $0,019 \mu\text{gL}^{-1}$  (Loos et al., 2018). Il rischio ecotossicologico è ritenuto accettabile se  $\text{PEC}/\text{PNEC} < 1$ . Nel presente lavoro sono state elaborate le mappe del rischio che evidenziano i tratti fluviali in cui la concentrazione di AZ supera la soglia di riferimento. Le simulazioni sono state eseguite per entrambe le campagne di campionamento (marzo e agosto 2021).

### 2.4 Implementazione e Calibrazione del Modello SWAT

L'analisi di sensitività e la calibrazione del modello SWAT sono state effettuate tramite SWAT-CUP, utilizzando l'Efficienza di Nash-Sutcliffe (NSE) come funzione obiettivo (valori accettabili:  $\text{NSE} \geq 0,5$ ; D'Ambrosio et al., 2020b). La calibrazione è stata eseguita confrontando i dati simulati e osservati della portata giornaliera presso due stazioni (A e B, Figura 1), nel periodo agosto 2017 – dicembre 2019. Le prestazioni del modello sono state valutate tramite tre indicatori: coefficiente di determinazione ( $R^2$ ), NSE e percentuale di bias (PBIAS).



**Figura 3.** Schema della metodologia applicata.

## 2.5 Configurazione e Calibrazione del Modello GREAT-ER

Il modello GREAT-ER valuta i carichi (EL) delle sostanze chimiche immesse nel fiume da un WWTP sulla base del consumo domestico (CD) del farmaco, popolazione residente (P), tasso di escrezione (TE) e il tasso di rimozione (TR). Il TE dell'AZ è generalmente assunto pari al 63% del consumo (National Center for Biotechnology Information, 2023). Il TR varia in base alla tecnologia dell'impianto di trattamento: per impianti a fanghi attivi, come quelli presenti nell'area di studio, la letteratura riporta valori nei range 49–81% (Tran et al., 2016) e 50–85% (Pan & Yau, 2021). Il CD è stimato tramite la Dose Giornaliera Definita (DDD), secondo i criteri WHO (2025) (<https://www.who.int/tools/atc-ddd-toolkit/about-ddd>). Tutti i suddetti fattori sono affetti da incertezza, pertanto, nel caso in esame, è stata adottato il metodo Monte Carlo (5000 iterazioni), in cui i fattori nell'equazione EL (Eq. 1) sono variati entro i seguenti intervalli prestabiliti (per maggiori dettagli si rimanda a De Girolamo et al., 2025):

- P:  $\pm 10\%$
- TR: 40–85%
- CD: 0,6–33 DDD/1000 abitanti/giorno (Gagliotti et al., 2024)
- TE: costante al 63%

$$EL = P \times CD \times TE \times (1 - TR) \quad \text{Eq. 1}$$

La calibrazione dei fattori chiave dell'EL è stata effettuata utilizzando le concentrazioni misurate di AZ all'effluente del depuratore WWTP3 (De Girolamo et al., 2025). I valori di CD, TR, e TE così definiti sono stati assunti anche per gli altri due WWTP presenti nel bacino idrografico.

Per la simulazione del destino in alveo, GREAT-ER richiede dati idrologici (portate) ed idraulici (velocità del deflusso), mentre la degradazione dell'AZ è descritta da un modello cinetico del primo ordine, secondo l'equazione:

$$R = 1 - e^{-(HRT \cdot K)} \quad \text{Eq. 2}$$

Dove:

- HRT è il tempo di transito della sostanza (h), funzione della lunghezza del tratto (m) e della velocità del flusso ( $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ );
- K è la costante di degradazione dell'AZ ( $\text{h}^{-1}$ ),

calibrata utilizzando le concentrazioni misurate nelle campagne di monitoraggio (De Girolamo et al. (2025).

## 3. RISULTATI

### 3.1 Misure sul campo

Nella sezione fluviale a monte dell'immissione (Em, Figura 2), non è stata rilevata la presenza di AZ a marzo e si è attestata sotto il limite di quantificazione ad agosto. Nell'effluente del WWTP3, le concentrazioni misurate sono risultate pari a  $2553,0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$  a marzo e  $282,5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$  ad agosto (De Girolamo et al., 2025).

### 3.2 Risultati della Calibrazione del Modello SWAT

Le prestazioni della calibrazione idrologica giornaliera sono risultate “soddisfacenti” per la stazione A ( $\text{NSE}=0.47$ ;  $\text{R}^2=0.48$ ) e “buone” per la stazione B ( $\text{NSE}=0.71$ ;  $\text{R}^2=0.72$ ), secondo i criteri di Moriasi et al. (2007). L'analisi giornaliera ha mostrato una sovrastima della portata alla stazione A ( $\text{PBIAS} = -4,21\%$ ) e una sottostima alla stazione B ( $\text{PBIAS} = +5,05\%$ ) (Figure 4). Per l'analisi di sensibilità e i parametri calibrati si rimanda a Centanni et al. (2024).

### 3.3 Concentrazioni Ambientali Predette e Valutazione del Rischio

Dopo la calibrazione dei parametri chiave legati all'EL (CD, TR, P; vedi De Girolamo et al., 2025), le concentrazioni predette di AZ nell'effluente hanno mostrato un'ottima concordanza con quelle misurate:

- Marzo: misurata =  $2553 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ; predetta =  $2590 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$
- Agosto: misurata =  $282,5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ; predetta =  $283 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$

Per la calibrazione del parametro K (degradazione) (Eq. 2), il confronto tra concentrazioni simulate e quelle osservate ha fornito risultati soddisfacenti:  $\text{R}^2 = 0,91$  (marzo),  $\text{R}^2 = 0,82$  (agosto) ed  $\text{SRS} = 0,27$  (marzo),  $0,26$  (agosto). I valori calibrati di K sono risultati pari a  $1,8 \text{ h}^{-1}$  (marzo) e  $0,8 \text{ h}^{-1}$  (agosto).

I valori di PEC risultati dalle simulazioni sono stati mappati per l'intera rete idrografica (Figura 5). A monte delle immissioni, i valori di PEC sono risultati pari a zero sia a marzo sia ad agosto mentre a valle del

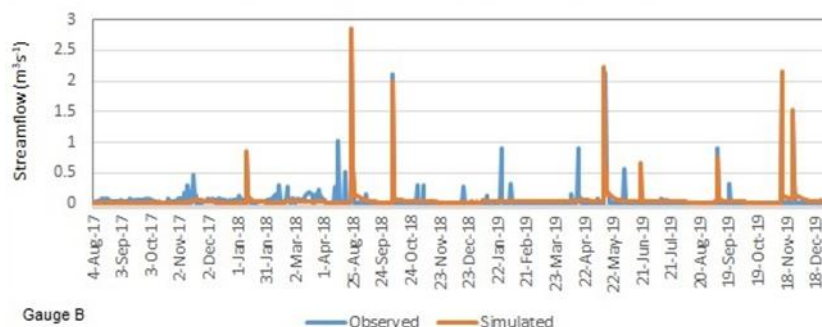
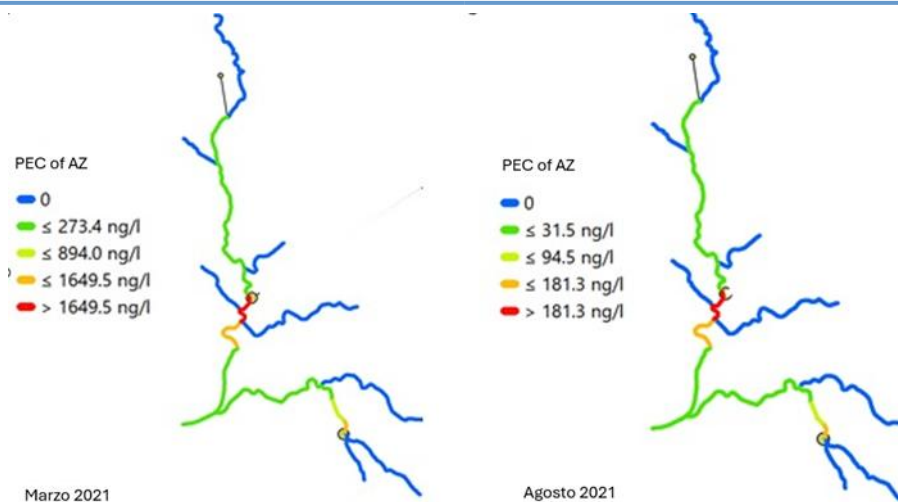


Figura 4. Portate giornaliere misurate e simulate nella stazione di misura A.



**Figura 5.** Mappe della concentrazione ambientale predetta (PEC) di azitromicina nella rete idrografica del Canale D'aiedda a Marzo 2021 e ad Agosto 2021.

WWTP2, l'impianto di maggior dimensione, sono stati simulati i valori massimi. Lungo il corso d'acqua, a valle dei punti di scarico, si è osservata una riduzione progressiva dei valori di concentrazione di AZ. I valori di PEC in marzo sono risultati superiori ai valori registrati in agosto (Figura 4).

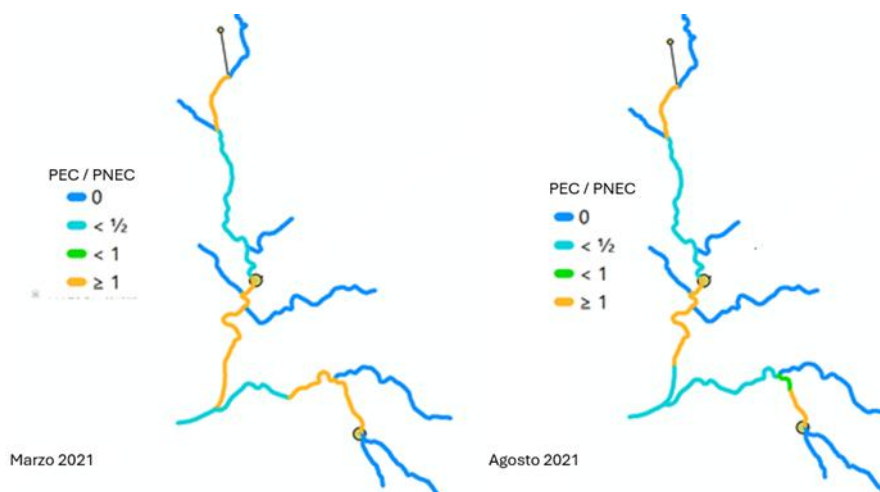
Sulla base dei risultati del modello GREAT-ER è stata realizzata la mappa del rischio ecotossicologico (Figura 6) che ha evidenziato un rischio ecotossicologico elevato nei tratti fluviali a valle degli scarichi, in particolare a marzo, quando buona parte dei segmenti fluviali presentava PEC superiori ai valori predefiniti di PNEC. I tratti a monte delle immissioni, come previsto, risultavano esenti da rischio.

#### 4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le attività di monitoraggio e le determinazioni analitiche di inquinanti emergenti sono costose e pertanto difficilmente posso essere condotte ad elevate risoluzioni spaziali e temporali. L'approccio proposto in questo studio, integrando monitoraggio e modellizzazione, consente di scalare l'analisi locale a livello di bacino idrografico, riducendo i costi.

In questo studio, il modello GREAT-ER è stato implementato in modo deterministico. In generale, la limitata disponibilità di dati relativi alle variabili idrologiche e idrauliche rappresenta la principale limitazione nelle applicazioni di modelli deterministici (Aldekoa et al., 2013). L'impiego preliminare del modello SWAT ha consentito di superare tale limite, fornendo dati idrologici a scala di segmento fluviale. Va comunque sottolineato che diverse fonti di incertezza possono influenzare i risultati del modello GREAT-ER. In particolare, l'EL rappresenta una delle variabili più critiche, per l'elevata incertezza associata al CD di AZ.

I risultati di questo studio evidenziano la necessità di un piano di monitoraggio efficace che dovrebbe tener conto non solo delle condizioni idrologiche (i.e. portate di magra, di morbida e di piena), ma anche della variabilità del consumo del farmaco. Sebbene il modello GREAT-ER consenta di stimare CD e EL senza ricorrere a misurazioni dirette dell'effluente, i risultati indicano che il CD locale di AZ può differire sensibilmente dai valori medi nazionali ed è soggetto a forti oscillazioni stagionali, correlate, ad esempio, alla diffusione dell'influenza (Osservatorio Nazionale sull'impiego dei Medicinali, 2023). Diversi studi (es. Shaheen et al., 2022) confermano variazioni stagio-



**Figura 6.** Mappe del rischio (PEC/PNEC) relative alla presenza di azitromicina nelle acque superficiali.



nali nella concentrazione di antibiotici negli effluenti dei WWTP, in particolare in quelli usati per trattare infezioni batteriche come le patologie respiratorie.

Altre fonti di incertezza che dovrebbero essere considerate sono: l'eventuale presenza di antibiotici nel letame zootecnico, che potrebbe raggiungere i corsi d'acqua mediante ruscellamento, eventuali overflow fognari durante eventi piovosi, e, la risospensione dei sedimenti accumulati nell'alveo. Sebbene queste limitazioni esistano, l'approccio modellistico ha mostrato un buon potenziale applicativo alla scala di bacino idrografico. La sua efficacia può essere ulteriormente migliorata attraverso un piano di monitoraggio mirato, basato sui risultati ottenuti. È evidente, inoltre, che per una valutazione robusta del rischio da antibiotici, l'EL andrebbe stimato attraverso misurazioni dirette dell'effluente, considerando sia la concentrazione che la portata. I risultati indicano che diversi tratti fluviali a valle degli impianti di depurazione presentano un elevato rischio ecotossicologico legato alla presenza di AZ nelle acque superficiali. Sebbene si registri una attenuazione delle concentrazioni lungo il corso d'acqua, la riduzione non è sufficiente a garantire il rispetto degli standard di qualità ambientale. È fondamentale, pertanto, intervenire sia sulla gestione del consumo di AZ, sia sull'implementazione di tecnologie innovative per il trattamento delle acque reflue, al fine di contenere la diffusione di antibiotici nell'ambiente.

Questo studio fornisce alle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente un approccio metodologico che rappresenta un primo passo verso la valutazione e gestione della contaminazione da antibiotici nei bacini idrografici.

### Ringraziamenti

Questo Lavoro è stato sviluppato nell'ambito del Progetto "Quality and management of intermittent river and groundwater in the Mediterranean basins" (INWAT) Project, supportato dal Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica, Programma "Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area" (PRIMA 2018).

### BIBLIOGRAFIA

Aldekoa, J., Medici, C., Osorio, V., Pérez, S., Marcé, R., Barceló, D., Francés, F. (2013) Modelling the emerging pollutant diclofenac with the GREAT-ER model: application to the Llobregat River basin. *J. Hazard. Mater.* 263: 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.057>

Almeida A.C., Gomes T., Antonio Baz Lomba J., Lillcrap A. (2021) Specific toxicity of azithromycin to the freshwater microalga *Raphidocelis subcapitata*. *Eco-toxicol. Environ. Saf.* 222: 112553 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112553>.

Archundia D., Boithias L., Duwig C., Morel M.-C., Flores Aviles G., Martins J.M.F. (2018) Environmental fate and ecotoxicological risk of the antibiotic sulfamethoxazole across the Katari catchment (Bolivian

Altiplano): Application of the GREAT-ER model. *Sci. Total Environ.* 622–623: 1046–1055. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.026>

Arnold, J.G., Srinivasan, R., Muttiah, R.S., Williams, J.R. (1998) Large area hydrologic modelling and assessment—part 1: model development. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 34 (1): 73–89. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.1998.tb05961.x>

Barra Caracciolo A., Topp E., Grenni P. (2015) Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 106: 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.040>

Centanni M, Ricci GF, De Girolamo AM, Gentile F. (2024) Modeling pesticides and ecotoxicological risk assessment in an intermittent river using SWAT. *Sci. Rep.* 14(1):6389. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56991-6>

D'Ambrosio, E., De Girolamo, A.M., Spanò, M., Corbelli, V., Capasso, G., Morea, M., Velardo, R., Abdelwahab O.M.M., Lonigro, A., Milillo, F., Ricci, G.F., Romano, G., Calabrese, A., Casale, B., Mauro, R., Pappagallo, G., Gentile, F. (2019) A spatial analysis to define data requirements for hydrological and water quality models in data-limited regions. *Water* 11 (2): 267. <https://doi.org/10.3390/w11020267>

D'Ambrosio, E., Ricci, G.F., Gentile, F., De Girolamo, A.M. (2020a) Using water footprint concepts for water security assessment of a basin under anthropogenic pressures. *Sci Total Environ.* 748: 141356. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141356>

D'Ambrosio, E., Gentile, F., De Girolamo, A.M. 2020b. Assessing the sustainability in water use at the basin scale through water footprint indicators. *J Cleaner Prod.* 244: 118847. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118847>

De Girolamo A.M., Ricci GF, Parete G, Gómez-Navarro O, Pérez S, Gentile F. (2025) Modelling occurrence and environmental risk of azithromycin in an intermittent river: Applying hydrological and water quality models. *J Contam. Hydrol.* 272: 104552. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2025.104552>

Di Cesare, A., Eckert, E.M., Teruggi, A., Fontaneto, D., Bertoni, R., Callieri, C., Corno, G. (2015) Constitutive presence of antibiotic resistance genes within the bacterial community of a large subalpine lake. *Mol. Ecol.* 24(15): 3888–900 <https://doi.org/10.1111/mec.13293>

Feijtel, T., Boeije, G., Matthies, M., Young, A., Morris, G., Gandolfi, C., Hansen, B., Fox, K., Holt, M., Koch, V., et al. (1997) Development of a geography-referenced regional exposure assessment tool for European rivers-GREAT-ER contribution to GREAT-ER#1. *Chemosphere* 34 (11): 2351–237. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00048-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00048-9)

Gómez-Navarro, O., De Girolamo, A.M. Lorenz, A.W., Debieche, T.-H., Khadhar, S., Gentile, F., Chiron, S., Pérez S. (2024) Characterization of anthropogenic impacts in Mediterranean intermittent rivers with chemical, ecological and hydrological indicators. *J. Haz.*

Mat. 480: 135951 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135951>

Gómez-Navarro, O., Labad F., Manjarrés-López, D.P., Pérez, S., Montemurro, N. (2023) HRMS-Targeted-DIA methodology for quantification of wastewater-borne pollutants in surface water, *MethodsX*, 10: 102093. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102093>.

Grabicova, K., Grabic, R., Blaha, M., Kumar, V., Cervený, D., Fedorova G., Randak, T. (2014) Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. *Water Res.* 72: 145-153. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.018>

Grandclément, C., Seyssiecq, I., Piram, A., Wong-Wah-Chung, P., Vanot, G., Tiliacos, T., Roche, N., Doumenq, P. (2017) From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review. *Water Res.* 111: 297–317. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.005>

Kehrein, N., Berlekamp, J., Klasmeier, J. (2015) Modelling the fate of down-the-drain chemicals in whole watersheds: new version of the GREAT-ER software. *Environ. Model. Softw.* 64: 1–8 <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2014.10.018>

Keller, V. (2006) Risk assessment of “down-the-drain” chemicals: search for a suitable model. *Sci. Total Environ.* 360: 305–318. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.08.042>

Lämmchen, V., Niebaum, G., Berlekamp, J., Klasmeier, J. (2021) Georeferenced simulation of pharmaceuticals in whole watersheds: application of GREAT-ER 4.1 in Germany. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 28: 21926. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12189-7>

Leone M, Gentile F, Lo Porto A, Ricci GF, Schürz C, Strauch M, Volk M, De Girolamo A.M. (2024) Setting an environmental flow regime under climate change in a data-limited Mediterranean basin with temporary river. *Journal of Hydrology: Regional Studies* 52, 101698

Loos, R., Marinov, D., Sanseverino, I., Napierska, D., Lettieri, T., 2018. Review of the 1st Watch List under the Water Framework Directive and recommendations for the 2nd Watch List, EUR 29173 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018, ISBN 978-92-79-81839-4, doi:10.2760/614367, JRC111198.

Moriasi, D.N., Arnold, J.G., Van Liew, M.W., Bingner, R.L., Harmel, R.D., Veith, T.L., 2007. Model evaluation guidelines for systematic quantification of accuracy in watershed simulations. *Trans. ASABE* 50, 885–900.

Negrão Carvalho, R., Marinov, D., Loos, R., Napierska, D., Chirico, N., Lettieri, T., 2016. Monitoring-based exercise: second review of the priority substance list under the Water Framework Directive (final draft version). European Commission, DG Joint Research Centre Institute for Environment and Sustainability, Ispra, Italy. [https://circabc.europa.eu/sd/a/7fe29322-946a-4ead-b3b9-e3b156d0c318/Monitoringbased%20Exercise%20Report\\_FINAL%20DRAFT\\_25nov2016.pdf](https://circabc.europa.eu/sd/a/7fe29322-946a-4ead-b3b9-e3b156d0c318/Monitoringbased%20Exercise%20Report_FINAL%20DRAFT_25nov2016.pdf).

20Exercise%20Report\_FINAL%20DRAFT\_25nov2016.pdf.

OECD, 2019. Pharmaceutical Residues in Freshwater: Hazards and Policy Responses, OECD Studies on Water, OECD Publishing, Paris.

Osservatorio Nazionale sull'impiego dei Medicinali (2023) L'uso degli antibiotici in Italia. Rapporto Nazionale 2021. Roma: Agenzia Italiana del Farmaco, 2023. The Medicines Utilisation Monitoring Centre. National Report on antibiotics use in Italy. Year 2021. Rome: Italian Medicines Agency, 2023. ISBN 979-12-80335-28-9.

Pan, M., Yau, P.C. (2021) Fate of Macrolide Antibiotics with Different Wastewater Treatment Technologies. *Water Air Soil Pollut.* 232: 103. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05053-y>

Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Misra, T., Pittman, C.U., Mohan, D. (2019) Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chem. Rev.* 119: 3510–3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>

Ricci, G.F., D'Ambrosio, E., De Girolamo, A.M., Gentile, F. (2022a). Efficiency and feasibility of Best Management Practices to reduce nutrient loads in an agricultural river basin. *Agric. Water Manag.* 259: 107241. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.107241>

Shaheen J.F., Sizerici B., Yildiz I. (2022) Fate, transport, and risk assessment of widely prescribed pharmaceuticals in terrestrial and aquatic systems: A review. *Emerging Contam.* 8: 216-228. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2022.04.001>

US-EPA, 2009. Health Care Industry Unused Pharmaceuticals Detailed Study 2007-2009 Data Collection and Outreach. Public Docket for the Preliminary 2010 Effluent Guidelines Program Plan EPA Docket Number EPA-HQ-OW-2008-0517 ([www.regulations.gov](http://www.regulations.gov)). [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-11/documents/health-care-unused-pharms\\_detailed-study\\_2009.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-11/documents/health-care-unused-pharms_detailed-study_2009.pdf) (access 28/02/2023)

van Leeuwen, C.J., Vermeire T.G. (2007) Risk Assessment of Chemicals: An Introduction, 2 ed. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6102-8>

Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Zambello, M. (2012) Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment - a review. *Sci. Total Environ.* 429: 123–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>

WHO, 2012. Pharmaceuticals in drinking-water. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. World Health Organization Ed. Geneva, Switzerland, <https://www.who.int/publications/i/item/9789241502085>

Wilkinson, et al., 2022. Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *PNAS* 2022 119 (8): e2113947119 <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>

# Gli antibiotici e i geni della resistenza come inquinanti emergenti: un contributo CNR-IRSA alla ricerca sul loro destino ambientale ed effetti sulle comunità microbiche del suolo

a cura di

Paola Grenni (\*), Anna Barra Caracciolo, CNR, Istituto di Ricerca sulle Acque, Sede di Roma-Montelibretti

## RIASSUNTO

La qualità del suolo riveste un ruolo fondamentale per garantire i servizi ecosistemici forniti dagli organismi che lo abitano. Tra essi, le popolazioni microbiche naturali hanno un ruolo chiave nel riciclo dei nutrienti e nella rimozione dei contaminanti. In ambito *One Health*, è fondamentale il mantenimento della qualità e fertilità del suolo, per garantire non solo l'equilibrio degli ecosistemi terrestri, ma anche la sicurezza dei prodotti agro-alimentari. Dopo un lungo iter, il Parlamento Europeo ha approvato ad ottobre 2025 la Direttiva sul monitoraggio e la resilienza del suolo, con l'obiettivo di garantire suoli in buona qualità in tutta Europa entro il 2050. In questo contesto, le comunità microbiche autoctone del suolo sono state riconosciute per il loro ruolo fondamentale nel fornire servizi di regolazione e approvvigionamento per l'ecosistema terrestre e la loro biodiversità è inserita tra gli indicatori di qualità del suolo.

Tra i contaminanti emergenti che possono inficiare la qualità del suolo vi sono gli antibiotici. Alcuni di essi sono particolarmente preoccupanti per i possibili effetti diretti (es. eliminazione o inibizione di specie chiave) o per la selezione, a concentrazioni residuali, di batteri resistenti. In alcuni casi si è anche ipotizzato che i batteri resistenti possano essere assorbiti o adsorbiti nelle piante, con possibile rischio di trasmissione della resistenza tramite il consumo di piante edibili da parte di animali di allevamento e dell'uomo. Attualmente, non esiste una normativa specifica europea che regola il fenomeno dell'antibiotico resistenza nel suolo, ma la normativa vigente si concentra sulla gestione degli antibiotici e sull'impatto dell'antibiotico-resistenza, soprattutto attraverso azioni di prevenzione, suggerendo un uso limitato e prudente degli antibiotici sia umani che veterinari, come indicato dal PNCR (Piano nazionale di contrasto all'antibiotico-resistenza 2022-2025), di cui l'IRSA è parte attiva. Anche a livello internazionale vi sono diverse iniziative con un approccio *One Health*, una delle quali ove l'IRSA è parte attiva è la *Quadripartite* (FAO, UNEP, WHO, WHOAH) *AMR Multi-Stakeholder Partnership Platform*, che dal 2022 funge da strumento di *governance* globale in ambito della resistenza antimicrobica (AMR).

Questo articolo presenta un inquadramento generale del fenomeno dell'antibiotico resistenza nel suolo; vengono inoltre riportate le principali linee di ricerca in questo ambito dei laboratori di Ecologia del suolo e delle acque e quello di Ecotossicologia dell'IRSA di Roma.

## SUMMARY

Soil quality is crucial for ensuring various ecosystem services (e.g. regulation and production) provided by the organisms that inhabit it. Among these, natural microbial populations play a key role in nutrient recycling and contaminant removal. In the "One Health" context, it is important to maintain soil quality and fertility for ensuring not only the terrestrial ecosystem equilibrium, but also the safety of the agri-food products. After a long process, the European Parliament approved in October 2025 the Soil Monitoring and Resilience Directive, with the aim of ensuring good soil quality throughout Europe by 2050. In this context, natural soil microbial communities have been recognised for their fundamental role in providing regulatory and provisioning services for the terrestrial ecosystem, and their biodiversity has been included among the indicators of soil quality.

Antibiotics are emerging contaminants with the potential to affect soil quality. Some of them are of particular concern, due to their direct impact on pivotal bacterial taxa or the selection of resistant bacteria at residual concentrations. Moreover, it has also been hypothesised that resistant bacteria may be absorbed or adsorbed into plants with a possible risk of resistance transmission through the consumption of edible plants by livestock and humans. Currently, no specific European legislation regulates the antibiotic resistance in soil, but there is a focus on the antibiotic management and the impact of antibiotic resistance, primarily through preventive actions, suggesting limited and prudent use of antibiotics. This is in accordance with the PNCR (National Plan to Combat Antibiotic Resistance 2022-2025), of which CNR-IRSA is an active participant. There are also several international initiatives with a One Health approach, including a key global initiative, the quadripartite (FAO, UNEP, WHO, WHOAH) AMR Multi-Stakeholder Partnership Platform, a global governance instrument in the AMR framework since 2022.

This article reports a general overview of the antibiotic resistance phenomenon in soil and presents the main research in this field carried out by the Soil and Water Ecology and Ecotoxicology laboratories of IRSA in Rome.

---

\* [paola.grenni@cnr.it](mailto:paola.grenni@cnr.it)



## 1. INTRODUZIONE

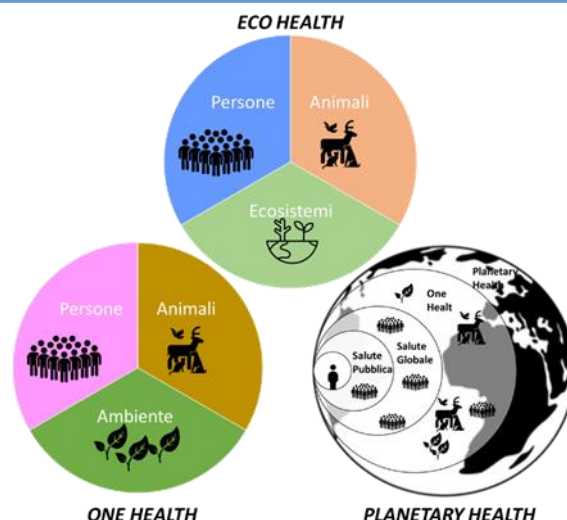
Il concetto di salute, come ampiamente riconosciuto dalla comunità scientifica, deve essere esaminato in una prospettiva olistica, considerando la salute umana in un'ottica di interconnessione con quella animale e ambientale. Vi sono tre principali concetti olistici e interdisciplinari che descrivono l'interazione uomo-animale-ambiente che evidenziano come la salute umana, animale e ambientale siano interdipendenti e debbano essere considerate insieme: *One Health*, *Eco Health* e *Planetary Health* (Figura 1). Sebbene il termine *One Health* sia di recente utilizzo<sup>(1)</sup>, l'interdipendenza reciproca tra salute animale, ambientale e umana ha radici profonde e storiche. L'approccio *One Health*, infatti, si ispira a movimenti di convergenza precedenti, come gli approcci *One Medicine* ed *Eco Health*<sup>(2)</sup> (Figura 1).

Il concetto di *One Health*, che tradotto significa "Una salute", è nato negli anni Quaranta grazie a una stretta collaborazione tra la FAO (Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura), l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) e il WOA (Organizzazione Mondiale della Sanità Animale). Esso fu concepito con l'obiettivo di combattere le malattie zoonotiche, ovvero trasmissibili sia tra gli animali che tra uomo e animali. La collaborazione FAO-OMS- WOA ha avuto un ruolo fondamentale nel migliorare la sorveglianza, la prevenzione e il controllo di tali patologie, promuovendo la salute pubblica a livello globale (Pitt et al., 2024).

La crescente consapevolezza dell'interazione tra uomo e ambiente e del rischio di malattie emergenti è oramai diffusa grazie alle informazioni scientifiche, ad una maggiore attenzione ai cambiamenti climatici e alla comparsa di nuove patologie con una connessione tra salute umana e ambiente. La più attuale definizione di *One Health* è quella di un approccio per affrontare le sfide sanitarie emergenti e garantire la salute pubblica<sup>(3)</sup>.

Dal 2016 si sono sviluppati i piani nazionali nei Paesi UE nell'ottica *One Health* (COM(2017) 339 final) per garantire l'uso corretto degli antibiotici nei settori umano e animale. In Italia, questo si è tradotto nello sviluppo dei Piani Nazionali di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020 e 2022-2025, che integrano azioni per salute umana, animale e ambientale.

In ambito *One Health*, è stata approvata il 23 Ottobre 2025, dopo quasi vent'anni di iter legislativo, la Direttiva sul monitoraggio e la resilienza del suolo (<https://data.consilium.europa.eu/doc/document/ST-9474-2025-REV-1/en/pdf>). Il testo, di oltre 140 pagine, si prefigge di istituire il primo quadro a livello europeo per la valutazione della qualità e il monitoraggio del



**Figura 1.** I tre principali concetti olistici e interdisciplinari: *One Health*, *Eco Health* e *Planetary Health*. **ONE HEALTH:** Approccio scientifico multidisciplinare integrato per bilanciare e ottimizzare la salute di persone, animali ed ecosistemi (interconnessi); promozione collaborazione tra diversi settori e discipline per affrontare sfide sanitarie globali. **ECO HEALTH:** Interazione tra la salute degli esseri umani, degli animali e degli ecosistemi, includendo anche la sostenibilità ambientale e la stabilità socio-economica nel quadro di un'economia di mercato. **PLANETARY HEALTH:** Raggiungimento del più alto standard di salute, benessere ed equità in tutto il mondo attraverso un'attenzione ponderata ai sistemi umani - politici, economici e sociali.

suolo, con l'ambizioso obiettivo di raggiungere "suoli sani" in tutta Europa entro il 2050.

In tale contesto si evidenzia la necessità di preservare la fertilità del suolo e garantire la qualità del cibo prodotto dall'agricoltura, in quanto questi elementi influenzano direttamente e indirettamente la salute umana e animale (Oliver et al., 2015). Tale considerazione trova ulteriore conferma nella vasta gamma di servizi e beni forniti dagli ecosistemi terrestri, tra cui la regolazione di malattie e parassiti, la decontaminazione, la crescita delle piante, la produzione di risorse alimentari, materie prime, combustibili, risorse genetiche e varie sostanze chimiche (Pereira et al., 2018).

È stato riconosciuto dalla Direttiva sul monitoraggio del suolo "l'importanza della raccolta e dell'analisi di informazioni sulla presenza di batteri e funghi nel suolo come anche fare in modo che fungano da base per la potenziale futura espansione del monitoraggio della biodiversità." Ed infatti, un indicatore inserito nella Direttiva, per stabilire la perdita di biodiversità del suolo, è la valutazione della biodiversità funghi e batteri attraverso l'analisi del *metabarcoding* del DNA, ad evidenziare quanto sia importante il ruolo della comunità microbica nel suolo per le sue molte

<sup>(1)</sup> T. P. Robinson et al., "Antibiotic Resistance Is the Quintessential One Health Issue," *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 110, no. 7 (July 2016): 377–80, <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw048>.

<sup>(2)</sup> Henrik Lerner and Charlotte Berg, "A Comparison of Three Holistic Approaches to Health: One Health, EcoHealth, and Planetary Health," *Frontiers in Veterinary Science* 4 (September 29, 2017), <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00163>.

<sup>(3)</sup> Definizione data dal One Health High-Level Expert Panel (OHHLEP), Il Comitato direttivo di One Health per le organizza-

zioni quadripartite: l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO), il Programma delle Nazioni Unite per l'ambiente (UNEP), l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) e l'Organizzazione mondiale per la salute animale (OMS). "One Health is an integrated, unifying approach that aims to sustainably balance and optimise the health of people, animals and ecosystems. It recognizes that the health of humans, domestic and wild animals, plants, and the wider environment (including ecosystems) are closely linked and inter-dependent".

plici attività nel mantenimento della salute del suolo stesso.

Al fine di preservare la fertilità del suolo, è indispensabile prevenire fenomeni di contaminazione. Tra i contaminanti emergenti che possono essere presenti nei suoli, i farmaci, ed in particolare gli antibiotici ed i loro geni di resistenza, destano una crescente preoccupazione.

In linea con il piano d'azione europeo *One Health* contro la resistenza antimicrobica (Raccomandazione Del Consiglio sul potenziamento delle azioni dell'UE per combattere la resistenza antimicrobica con un approccio *One Health*, 2023/C 220/01), gli antibiotici sono tra le sostanze che sono state attenzionate nelle acque. Infatti, nell'ambito della Direttiva Quadro sulle Acque (WFD), tre antibiotici macrolidi (eritromicina, claritromicina, azitromicina) sono stati inseriti già nella prima *Watch List* (WL) del 2015 (Decisione (UE) 2015/495. La WL della WFD comprende quelle sostanze che fanno parte del processo di revisione della Direttiva ed è utile per ottenere dati di monitoraggio di elevata qualità sui potenziali contaminanti delle acque, al fine di determinare il rischio che essi comportano e quindi se sia opportuno fissare standard di qualità ambientale (EQS) a livello dell'UE. La WL è stata aggiornata nel 2018, 2020, 2022 e nuovamente nel 2025 (Tabella 1).

È stato recentemente proposto di includere nell'elenco delle sostanze prioritarie non solo tre antibiotici (azitromicina, claritromicina, eritromicina) ma anche i geni di resistenza agli antimicrobici non appena saranno stati individuati metodi di monitoraggio adeguati (COM/2022/540 definitivo).

Si cita in questo ambito la Direttiva sulle acque in quanto essa è stata alla base per la Direttiva sui suoli. Per la definizione dei descrittori della contaminazione dei suoli viene indicato in Allegato I (Descrittori del suolo, criteri di sanità del suolo) di valutare la "Concentrazione di una serie di contaminanti organici stabilita dagli Stati membri tenendo conto dei limiti di concentrazione vigenti nel diritto dell'Unione, ad esempio per la qualità dell'acqua e le emissioni atmosferiche." Tra i "Descrittori", oltre ad alcuni contaminanti (compresi PFAS, pesticidi e loro

metaboliti) definiti o selezionati dagli Stati membri, vengono citati tra i contaminanti facoltativi "altri contaminanti del suolo emergenti fissati dagli Stati membri a norma dell'articolo 7, paragrafo 4".

## 2. GLI ANTIBIOTICI NELL'AMBIENTE

Gli antibiotici sono molecole complesse che possono avere diversi gruppi funzionali all'interno della loro struttura chimica. Quelli attualmente in uso sono molecole naturali (es. benzilpenicillina e gentamicina), sintetiche (es. sulfamidici e i fluorochinoloni) o semi-sintetiche (es. penicilline semisintetiche, cefalosporine di seconda, terza e quarta generazione, tetracicline semisintetiche), cioè antibiotici naturali modificati chimicamente mediante l'inserimento di nuove catene o gruppi chimici, con lo scopo di migliorare l'efficacia (spettro d'azione, efficacia, o resistenza).

Gli antibiotici possono essere classificati in base al loro meccanismo d'azione quale la sintesi della membrana cellulare, sintesi proteica o degli acidi nucleici (DNA o RNA) o l'interferenza con il metabolismo batterico. Possono anche essere classificati in base al loro spettro d'azione e alla loro capacità di uccidere i batteri (battericidi) o di bloccare la crescita (batteriostatici), (Grenni et al., 2018; Grenni, 2022).

Gli antibiotici vengono solo parzialmente metabolizzati (dal 40 al 90%) dagli organismi trattati (Polianciuc et al., 2020), e una porzione rilevante di essi viene escreta (inalterata o come metaboliti attivi) attraverso l'urina e le feci, raggiungendo gli impianti di trattamento delle acque reflue (Starling et al., 2019). A titolo di esempio, dal 50 al 90% delle dosi di tetraciclina, eritromicina e lincomicina vengono escrete nelle urine e nelle feci (Cycon et al., 2019). Inoltre, essendo solo parzialmente degradate durante il trattamento delle acque reflue (Figura 2), gli antibiotici possono accumularsi in quantità significative nei fanghi di depurazione e raggiungere i corpi idrici riceventi. Sono stati, ad esempio, riscontrate concentrazioni di circa 11800 ng/g di farmaci in un fango di depurazione proveniente da un impianto di trattamento delle acque reflue municipali, e tra i farmaci erano annoverati 15 antibiotici, con concentrazioni nell'ordine di µg/Kg (Ivanová et al., 2018).

I geni della resistenza (ARG) si possono sviluppare anche nella flora microbica intestinale. Infatti, gli animali (incluso l'uomo) a cui vengono somministrati ripetutamente antibiotici, possono sviluppare un microbioma intestinale che funge da riserva di ARG. Tale materiale genetico può essere successivamente trasmesso ai microrganismi del suolo attraverso l'applicazione di letame e liquame utilizzati come ammendanti organici. Dunque, le pratiche agricole, quali l'uso di ammendanti organici (inclusi i biosolidi) nonché le acque di riciclo, possono contribuire in modo significativo alla presenza nel suolo non solo di concentrazioni residuali di antibiotici, ma anche dei relativi geni della resistenza (Ortiz de García et al., 2014; Barra Caracciolo et al., 2020; Polianciuc et al., 2020; Grenni, 2022).

Gli antibiotici che raggiungono il suolo possono persistere e/o essere veicolati nelle acque superficiali e sotterranee (nel caso di composti polari, acidi e più idrosolubili, con basso coefficiente di ripartizione otta-

**Tabella 1.** Antibiotici inclusi nella *Watch List* della Direttiva Quadro sulle Acque. ERI: eritromicina, CLA: claritromicina, AZI: azitromicina; AMO: amoxicillina; CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; OFLO: Ofloxacina; SMX: sulfametoxazolo; TRI: Trimetoprim.

2015	Macrolidi			
	ERI, CLA, AZI			
2018	Macrolidi			
	ERI, CLA, AZI			
2020	β-lattamici	Chinoloni	Sulfonamidi	Diaminopiridine
	AMO	CIP	SMX	TRI
2022	Lincosamidi	Fluorochinoloni	Sulfonamidi	Diaminopiridine
	CLI	OFLO	SMX	TRI
2025	Lincosamidi	Fluorochinoloni		
	CLI	OFLO		

nolo-acqua-Kow), agendo da forza selettiva per lo sviluppo di batteri resistenti (Cycoñ et al., 2019).

A causa della loro azione biocida intrinseca, gli antibiotici possono alterare o inibire le comunità microbiche autoctone del suolo, modificandone la biodiversità e influenzando processi ecosistemici chiave quali la degradazione dei contaminanti e il ciclo dei nutrienti. Questi cambiamenti possono influenzare a loro volta la fertilità del suolo e la produzione primaria (Grenni et al., 2018; Sun et al., 2021). Ad esempio, i cianobatteri, un gruppo eterogeneo di batteri fotoautotrofi, ubiquitario negli ecosistemi terrestri e che svolge importanti funzioni ecologiche (es. produzione primaria, fissazione dell'azoto), sono sensibili a concentrazioni molto basse di antibiotici (1.5-157 µg/L), che corrispondono a concentrazioni di non effetto (NOEC, *No-Observed Effect Concentration*) per i batteri bersaglio. Si sottolinea che tali concentrazioni rientrano nell'intervallo di quelle rilevate ambientalmente (Le Page et al., 2019).

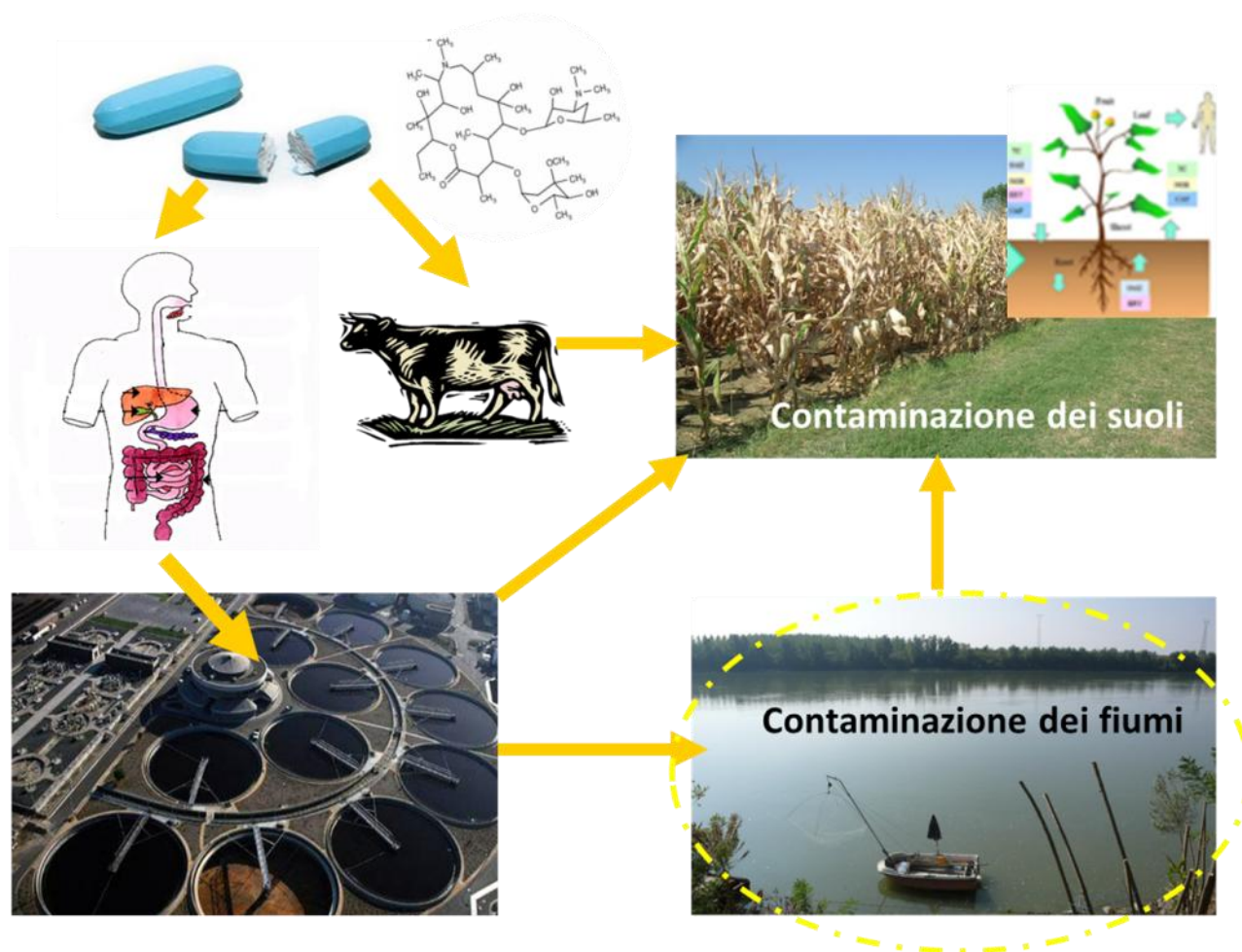
Le tetracicline, i sulfonamidi, i chinoloni, e i macrolidi sono tra gli antibiotici che sono maggiormente utilizzati, sia in medicina umana che veterinaria.

Come sottolineato da alcuni studi, a causa dell'utilizzo di letame bovino come ammendante organico, è stata

rilevata la presenza di concentrazioni residuali significative di antibiotici nel suolo, quali ad esempio le tetracicline (Gworek et al., 2021; Li 2014; Pan et al., 2017; Visca et al. 2022; Zhang et al. 2022). Tra di esse, l'ossitetraciclina è stata rilevata fino a 7 µg/kg mentre la clorotetraciclina è stata rilevata a concentrazioni che variano tra i 44 µg/Kg e i 13 mg/Kg in suoli agricoli ammendati con letame (Manuel Conde-Cid et al., 2020; Zhang et al., 2022; Cycon et al., 2019).

Le tetracicline sono state rilevate anche nel liquame suino, sebbene a concentrazioni più alte (clorotetraciclina: 764 mg/kg, ossitetraciclina: 211 mg/kg; tetraciclina: 300 mg/kg; Manuel Conde-Cid et al., 2020). Queste tre tetracicline presentano un'alta solubilità in acqua (231-630 mg/L) e basso coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (Log Kow compreso tra -1.30 e -0.62), suggerendo una loro natura idrofila.

Il sulfametossazolo (SMX), un antibiotico sulfamidico ad ampio spettro, sebbene sia relativamente poco persistente (Wang & Wang, 2018, Rauseo et al., 2019, Rauseo et al., 2021), viene riscontrato in concentrazioni residuali in acque reflue, acque superficiali e suolo, mostrandosi un composto pseudo-



**Figura 2.** Gli antibiotici vengono solo parzialmente metabolizzati dagli organismi trattati e, attraverso le escrezioni, raggiungono gli impianti di trattamento delle acque reflue. La maggior parte degli impianti di trattamento delle acque reflue non è in grado di rimuoverli in modo efficiente e, attraverso i loro effluenti, raggiungono le acque superficiali. Le pratiche agricole, quali l'uso di fanghi di depurazione (biosolidi) e letame come fertilizzanti per le colture e l'irrigazione con acqua trattata, favoriscono la diffusione degli antibiotici nel suolo agricolo. Inoltre, è stato osservato che i batteri possono trasferire antibiotici o geni di resistenza dai biosolidi o dal letame animale al suolo, e successivamente alle colture destinate al consumo umano.



persistente a causa del suo utilizzo diffuso. Nel suolo è stato riscontrato fino a 1 µg/Kg (Kuppusamy et al. 2018, Kairigo et al. 2020).

Anche i fluorochinoloni ed i chinoloni (es. ciprofloxacina ed enrofloxacin) e i macrolidi (es. l'azitromicina) sono stati identificati nel suolo in seguito all'applicazione di ammendanti organici di derivazione animale (Cycon et al. 2019). Tra i chinoloni, la ciprofloxacina (CIP) ha un'elevata persistenza intrinseca (Barra Caracciolo et al. 2018, Visca et al. 2021a) e può accumularsi nei terreni ammendati con letame fino a concentrazioni dell'ordine di mg/kg (fino a quasi 6 mg/kg secondo Liu et al., 2018).

La CIP è anche il principale metabolita di un altro antibiotico, l'enrofloxacin, ampiamente utilizzata negli allevamenti di bestiame. Troughon & Lefebvre (2016) riportano concentrazioni nel letame comprese tra 0.5 e 46 mg/kg, valori che variano in funzione della specie animale e dell'area di applicazione.

Se un antibiotico è ionizzabile si può ritrovare nell'acqua interstiziale del suolo e diventare biodisponibile per l'assorbimento da parte delle piante (Li et al., 2019). Pan et al. (2017) hanno identificato tre antibiotici ionizzabili quali quelli con concentrazioni più elevate riscontrate nei tessuti vegetali (trimetoprim: 270 ng/g; clorotetraciclina 532 ng/g; ossitettraciclina 330 ng/g).

Una volta all'interno delle piante, gli antibiotici possono avere un effetto fitotossico sulla crescita delle piante (Narciso et al., 2023). Gli effetti fitotossici sono stati riscontrati in condizioni di laboratorio per una vasta gamma di piante esposte a concentrazioni che vanno da µg/L a g/L dei singoli composti. È stato osservato, ad esempio, che i chinoloni possono essere assorbiti dalle piante attraverso l'apparato radicale, accumularsi e causare fitotossicità, manifestata con diversi sintomi quali la riduzione della fotosintesi, l'arresto della crescita e la diminuzione del contenuto di clorofilla (Ren et al., 2024). Il metabolismo delle piante, tuttavia, può anche consentire la detossificazione, l'inattivazione o l'escrezione di tali sostanze (Baquero et al., 2022).

### 3. ESEMPI DI ANTIBIOTICI COMUNEMENTE UTILIZZATI E DEL FENOMENO DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA

La presenza di antibiotici nell'ambiente, causata dal loro uso crescente e massiccio, rappresenta una preoccupazione per la salute umana e animale. Questo fenomeno è particolarmente preoccupante poiché può contribuire alla crescita e alla diffusione di batteri resistenti (Grenni et al., 2018). La selezione e la trasmissione dei geni della resistenza (ARG, *antibiotic resistance genes*) conferiscono ai batteri resistenti (ARB, *antibiotic resistant bacteria*) la capacità di resistere agli effetti biocidi degli stessi antibiotici. Questo problema è ampiamente documentato in ambito ospedaliero, dove la resistenza antimicrobica da parte dei patogeni può portare alla persistenza di agenti infettivi e al conseguente sviluppo di infezioni resistenti ai trattamenti (WHO, 2017). Solo recentemente, la comunità scientifica ha riconosciuto la complessità del fenomeno della proliferazione di ARB e ARG, che non riguarda solo l'ambiente nosocomiale ma

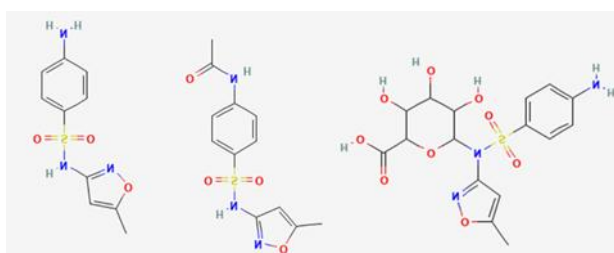
anche gli ecosistemi naturali, dove gli antibiotici, insieme agli ARB e ARG si riscontrano e vengono riconosciuti come microinquinanti.

Il fenomeno della resistenza agli antibiotici è un meccanismo di difesa naturale dei batteri, coinvolto nelle interazioni competitive (ad esempio per lo spazio o i nutrienti) con altri batteri e funghi (Martinez, 2008; Bahram et al., 2018; Bengtsson-Palme et al., 2018), nella difesa contro i predatori (ad esempio i protisti; Cruz-Loya et al., 2019; Jousset et al., 2010; Song et al., 2015) e nella protezione contro altri fattori di stress ambientale (Swiecio, 2016; Dragosits et al., 2013). Sebbene non tutti i ceppi batterici possano produrre antibiotici, tutti i batteri (produttori di antibiotici e non) possono sviluppare resistenza (Nguyen et al., 2020). Quest'ultima può avvenire attraverso un trasferimento genico verticale (*Vertical Gene Transfer*, VGT) all'interno della stessa specie batterica e/o un trasferimento genico orizzontale (*Horizontal Gene Transfer*, HGT) tra specie diverse. L'HGT tra microrganismi e/o patogeni è possibile grazie a elementi genetici mobili (*Mobile Genetic Elements*, MGE), come plasmidi, integroni e trasposoni (Tao et al., 2022). L'HGT è un processo chiave che rende possibile un'ampia distribuzione di ARG nell'ambiente ed è promosso dalla presenza diffusa di antibiotici nell'ambiente (Tao et al., 2022).

I batteri utilizzano complessi meccanismi di regolazione che stimolano in modo selettivo l'espressione dei geni di resistenza agli antibiotici, e questo avviene esclusivamente durante l'esposizione agli stessi, eludendo così la necessità della selezione naturale e favorendo il mantenimento a lungo termine di tali geni nel genoma. Inoltre, alcuni ARG possono esercitare un effetto negativo sulle cellule batteriche. Ad esempio, quelli che codificano la metilazione di specifici residui di antibiotici nell'RNA ribosomiale 23S, sebbene possano proteggere i batteri dagli antibiotici macrolidi, possono causare un'interruzione della sintesi proteica a livello cellulare, con conseguenti alterazioni della capacità funzionale dell'organismo (Dar et al., 2017).

#### 3.1 Gli antibiotici sulfamidici

I sulfamidici (o sulfonamidici) sono tra i primi antibiotici utilizzati in medicina. Gerhard Domagk, premio Nobel nel 1939, fu il primo a scoprirne le caratteristiche antibatteriche, osservando che il prontosil, un colorante sulfonamidico, tratteneva selettivamente le cellule batteriche patogene. Il prontosil è un pro-



**Figura 3.** Il sulfametossazolo (a destra) e i suoi due metaboliti principali della metabolizzazione da parte dell'organismo, il N4-acetil-sulfametossazolo (al centro) e il sulfametossazolo N1-glucuronide (immagini da PubChem, Kim et al. 2025).

farmaco che il corpo umano converte in sulfanilamide, un principio attivo antibatterico. Sono stati prodotti vari composti antibatterici derivati da questo gruppo chimico, con lo stesso nucleo primario, ma con bioattività diverse (Cycoñ et al., 2019).

I sulfamidici sono una classe di antibiotici sintetici con azione batteriostatica, ovvero che bloccano la moltiplicazione batterica, e sono efficaci contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi. Hanno una struttura estremamente simile a quella dell'acido para-amino benzoico ed agiscono inibendo la sintesi dell'acido folico nei batteri, un processo essenziale per la loro sopravvivenza, mentre l'organismo umano non viene inficiato in quanto l'acido folico viene assunto con la dieta (Arivazhahan, 2021). I sulfamidici sono spesso usati in combinazione con il trimetoprim, un antibiotico di sintesi appartenente alla categoria delle diaminopirimidine.

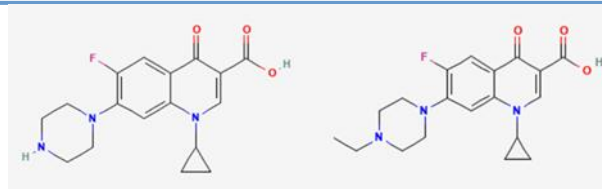
La resistenza ai sulfamidici è dovuta a mutazioni batteriche che alterano l'enzima diidropteroato sintetasi (DHPS), riducendone l'affinità per il sulfamidico o aumentandone la produzione, o dalla produzione di enzimi DHPS resistenti da parte dei batteri, rendendo il farmaco inefficace. Questa resistenza può essere causata da mutazioni cromosomiche o dalla trasmissione di geni di resistenza tramite plasmidi (Grenni et al., 2024).

Il **sulfametossazolo** (SMX, Figura 3), una sulfonamide con un gruppo anilिनico e uno isossazolico, è uno degli antibiotici più prescritti e utilizzati in medicina umana e veterinaria; può essere usato per trattare le infezioni respiratorie e la mastite nei bovini in combinazione con l'antibiotico trimetoprim.

L'SMX ha un effetto batteriostatico, bloccando la sintesi batterica dell'acido folico a partire dall'acido para-aminobenzoico, necessario per la sintesi dei nucleotidi.

Negli organismi trattati, circa il 43% dell'SMX viene metabolizzato a N<sub>4</sub>-acetil-sulfametossazolo e il 9-15% a sulfametossazolo N<sub>1</sub>-glucuronide, mentre il 15-25% viene escreto inalterato. Gli enzimi plasmidici di resistenza per l'SMX sono codificati principalmente da tre geni, *sul1*, *sul2* e *sul3* (Sánchez-Osuna et al. 2019). Il gene *sul1* si trova spesso su trasposomi di tipo Tn21, un elemento genetico mobile (un "gene saltatore") presente nei batteri che può spostarsi tra diverse posizioni del DNA e che svolge un ruolo importante nella diffusione della resistenza agli antibiotici e al mercurio. Contiene un integrone di classe 1, che agisce come sistema per l'acquisizione e l'accumulo di più geni di resistenza agli antibiotici. I geni *sul2* e *sul3* possono essere presenti anche sui plasmidi, talvolta in combinazione con *sul1* o su integroni diversi (Karczmarczyk et al., 2011).

È stato inoltre evidenziato che la resistenza al SMX può essere dovuta anche a geni che codificano pompe di efflusso, come l'*smeDEF* (Sánchez et al. 2015). Esse sono complesse proteine presenti nelle membrane cellulari, specialmente nei batteri, ed espellono attivamente sostanze nocive dalla cellula, compresi gli antibiotici. Nei batteri, queste pompe sono una delle principali cause della resistenza agli antibiotici, poiché rimuovono tali molecole prima che possano esercitare il loro effetto.



**Figura 4.** La ciprofloxacina (a sinistra) ed enrofloxacina (a destra). Immagini da PubChem (Kim et al. 2025)

### 3.2 I chinoloni e fluorochinoloni

I chinoloni sono un gruppo di antibiotici battericidi sintetici ad ampio spettro tra i più prescritti al mondo, utilizzati per trattare diverse infezioni batteriche nell'uomo e negli animali (Pham et al., 2019). I chinoloni agiscono inibendo gli enzimi batterici DNA girasi e topoisomerasi IV, bloccando così la replicazione del DNA batterico e causandone la morte (Fàbrega et al., 2009). Questi antibiotici causano cambiamenti conformazionali nel complesso DNA legato all'enzima (cioè la DNA girasi con il DNA batterico o la topoisomerasi IV con il DNA batterico) che limitano la normale funzione dell'enzima. Di conseguenza, il complesso farmaco-enzima-DNA blocca l'avanzamento della forcella di replicazione, impedendo la normale sintesi del DNA batterico e portando infine alla morte della cellula batterica.

La norfloxacina è il primo chinolone ad ampio spettro che è stato approvato per il trattamento delle infezioni del tratto urinario e delle malattie a trasmissione sessuale. Dagli anni '90, il numero di ceppi batterici resistenti ai chinoloni è progressivamente aumentato a causa dell'uso diffuso di questi antibiotici (Emmerson 2003), minacciando la loro efficacia.

Esistono diversi meccanismi di resistenza ai chinoloni (Georgina Solano-Gálvez et al., 2021), tra cui quelli che coinvolgono mutazioni cromosomiche nei geni che codificano la topoisomerasi IV o la girasi IV (coinvolti nella replicazione del DNA), o la riduzione dell'accumulo di antibiotico. Quest'ultima può verificarsi grazie alla sovraespressione di pompe di efflusso batteriche (che spingono il farmaco all'esterno della cellula) o alla *down-regulation* di proteine poriniche (proteine di membrana), impedendo la diffusione passiva dell'antibiotico all'interno delle cellule.

La resistenza ai chinoloni, come anche per altri antibiotici, può essere mediata dai plasmidi, trasferendo geni che codificano per enzimi che neutralizzano l'antibiotico. Questa resistenza può essere acquisita da altri batteri attraverso il trasferimento genico orizzontale (es. coniugazione). Il gene *qnr*, che codifica un pentapeptide in grado di legare il DNA cromosomico e di proteggerlo dall'azione dell'antibiotico, è stato il primo meccanismo di resistenza identificato, mediato da plasmidi (Jacoby et al., 2014).

I fluorochinoloni, comunemente utilizzati in zootecnia, sono un'evoluzione dei chinoloni, più potenti e attivi contro un numero maggiore di batteri. Essi derivano dai chinoloni mediante all'aggiunta di fluorina alla molecola. Sono antibiotici sintetici e ad ampio spettro, usati per trattare infezioni respiratorie, urinarie e genitali. I fluorochinoloni hanno lo stesso metodo d'azione dei chinoloni, inibendo due enzimi batterici essenziali, la DNA girasi e la topoisomerasi IV, necessari per la replicazione del DNA; l'aggiunta del fluoro nella

molecola ne migliora l'efficacia e la penetrazione nei tessuti.

L'enrofloxacin (ENR, Figura 4) è un antibiotico ad ampio spettro appartenente alla famiglia dei fluorochinoloni (Trouchon e Lefebvre, 2016).

È stata ampiamente utilizzata in molti Paesi per trattare diverse infezioni del settore avicolo, principalmente quelle causate da *Escherichia coli* e *Pasteurella multocida*, nonché la micoplasmosi aviaria.

La ciprofloxacina (CIP, Figura 4) è un fluorochinolone di seconda generazione utilizzato per combattere diverse infezioni dei tratti urinario, respiratorio e gastrointestinale, delle setticemie ecc. (Sharma et al., 2010). La CIP è utilizzata per trattare diversi batteri Gram-negativi e, in misura minore, infezioni Gram-positive. Il successo terapeutico della CIP ha portato allo sviluppo di chinoloni più efficaci contro i batteri Gram-positivi (i fluorochinoloni di quarta generazione quali la gemifloxacina e moxifloxacina), con un maggior spettro di attività per combattere un più ampio spettro di infezioni.

È stato riportato dal *Global Antibiotic resistance surveillance report 2025* del WHO (2025) che la percentuale di resistenza alla CIP nelle infezioni nel 2023 è pari al 18% a livello globale ed è più elevata in Europa (36%). Tali percentuali sono in forte aumento (tasso annuo tra il 9 e 14), indicando una forte preoccupazione per l'efficacia di questo antibiotico così largamente utilizzato.

### 3.1 Possibile via di trasferimento della resistenza all'uomo attraverso la presenza di antibiotici e geni della resistenza nel suolo

Il possibile assorbimento degli antibiotici attraverso l'apparato radicale e la loro presenza nei tessuti vegetali rappresentano aspetti di notevole rilevanza. Le piante, infatti, rappresentano il collegamento tra il suolo e gli organismi terrestri, fungendo da tramite per il trasferimento di molecole o geni di resistenza attraverso la catena alimentare, fino a raggiungere l'uomo. È stato osservato che vegetali che durante il loro ciclo di crescita sono stati fertilizzati con letame o irrigati con acque reflue provenienti dal processo di riciclo, possono contenere geni della resistenza (Barra Caracciolo et al., 2020).

In uno studio dove *Lactuca sativa* è stata fertilizzata con letame suino o biosolidi da fanghi di depurazione (Margenat et al., 2020) sono state riscontrate concentrazioni significative di antibiotici nelle foglie di lattuga (lincomicina: 0.67 ng/g e ciprofloxacina: 14.2 ng/g). Sebbene il coefficiente di pericolosità per gli antibiotici calcolato è <1, suggerendo che non vi sia un rischio per la salute umana, tuttavia non sono stati valutati gli effetti combinati potenzialmente dannosi della co-presenza di tali concentrazioni residue.

## 4. BIODEGRADAZIONE DEGLI ANTIBIOTICI

Gli antibiotici hanno tassi di degradazione estremamente variabili nel suolo. Cycoñ et al. (2019) riportano emivite che vanno da 0,43 a 3466 giorni, sebbene nella maggior parte dei casi non superano i 100 giorni. E' da evidenziare che il processo di degradazione

può produrre metaboliti che possono avere una maggiore persistenza e/o un'azione tossica maggiore rispetto all'antibiotico originario.

Nonostante la degradazione degli antibiotici possa avvenire attraverso diversi meccanismi abiotici, la biodegradazione è il principale meccanismo di rimozione degli antibiotici nel suolo. Infatti, la fotodegradazione (comune processo di degradazione per i chinoloni) non avviene negli strati profondi del terreno.

La biodegradazione dipende dalla presenza di popolazioni microbiche diversificate, abbondanti ed attive ed un ecosistema in un buono stato di qualità.

Vi sono diversi fattori abiotici che possono rallentare o inibire la biodegradazione nel suolo. Ad esempio la presenza di sostanza organica può aumentarne l'adsorbimento, diminuendone la tossicità, ma riducendo anche la biodisponibilità delle molecole, diminuendo i tassi di biodegradazione. Oltre all'adsorbimento, anche il possibile trasporto (lisciviazione) degli antibiotici verso gli strati più profondi (e verso le falde acquifere) può influire la biodisponibilità degli antibiotici nel suolo. Crane et al. (2010) propongono di classificare gli antibiotici con un Koc >4.000 L/kg come molecole a bassa mobilità ed alta persistenza nel suolo (DT<sub>50</sub> > 60 giorni), mentre quelli con valori di Koc <15 L/kg come altamente mobili e facilmente degradabili (DT<sub>50</sub> < 5 giorni).

Altri fattori chiave per la biodegradazione degli antibiotici sono le concentrazioni e il trattamento ripetuto nel tempo (che seleziona ceppi microbici adattati), ad esempio tramite l'ammendamento ripetuto del terreno con letame o biosolidi.

È implicito che i batteri in grado di sviluppare strategie per degradare gli antibiotici siano prima di tutto in grado di resistere agli stessi. I microrganismi possono dunque rispondere alla presenza di antibiotici non solo diventando resistenti (meccanismo di difesa passivo), ma anche rimuovendoli (azione attiva che il microrganismo compie per sopravvivere), mostrando una forma di resilienza.

La biodegradazione degli antibiotici può avvenire attraverso il metabolismo o il co-metabolismo (von Wintersdorff et al., 2016). I microrganismi possono degradare metabolicamente gli antibiotici, utilizzandoli come fonti di carbonio, azoto ed energia (Woappi et al., 2016). D'altra parte, i microrganismi possono trasformare involontariamente (co-metabolismo) un inquinante utilizzando enzimi o cofattori prodotti per il metabolismo microbico di altre molecole.

La degradazione degli antibiotici, considerata una resistenza indiretta, può ridurre la pressione selettiva causata da alte concentrazioni di questi farmaci, minimizzando la necessità per le popolazioni batteriche di evolvere geni di resistenza.

La biodegradazione può portare semplicemente a una modifica dell'antibiotico (biotrasformazione) oppure, nella condizione più favorevole, alla sua completa riduzione a molecole inorganiche, processo noto come mineralizzazione.

I sulfamidici possono raggiungere concentrazioni nel suolo fino a mg/kg e mostrano tempi di dimezzamento (DT<sub>50</sub>) che variano da 7 a 59 giorni (Cycoñ et al., 2019). Hanno un debole adsorbimento nel suolo e



un'elevata mobilità, in linea con i loro bassi valori log Koc (Cycoñ et al., 2019).

La biodegradazione degli antibiotici sulfonamidici è dovuta principalmente ai batteri e può essere favorita dalla disponibilità di azoto. Ad esempio, alcuni autori riportano che, in presenza di fonti aggiuntive di azoto, il sulfametossazolo è stato completamente degradato a 3-amino-5-metilisossazolo, senza alcuna attività antibiotica. Diversi ceppi batterici del suolo, come *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (Firmicutes), *Aquamicrobium defluvium* (Alphaproteobacteria), *Pseudomonas putida* (Gammaproteobacteria), *Alcaligenes* sp. (Betaproteobacteria), *Microbacterium* sp. C448, *Microbacterium lacus* SDZm4 e *Terrabacter* sp. 2APm3 (Actinobacteria), sono riconosciuti essere in grado di degradare i sulfonamidi. Hirth et al. (2016) riportano un aumento della mineralizzazione della sulfametazina nel suolo grazie alla *bioaugmentation* con una comunità microbica autoctona del suolo, tra cui il ceppo *Microbacterium* sp. C448.

I chinoloni e i fluorochinoloni hanno una emivita elevata nel suolo. La ciprofloxacina viene spesso riscontrata nel suolo a causa del suo elevato adsorbimento sulla sostanza organica. Cycoñ et al., (2019) riporta concentrazioni fino a 7 mg/kg. I fluorochinoloni possono essere trasformati per fotolisi, ma questa degradazione abiotica avviene in minima parte nel suolo. Alcuni autori hanno riportato che i fluorochinoloni sono recalcitranti alla degradazione in suoli caratterizzati da comunità microbiche non acclimatate. Tuttavia, la trasformazione microbica può verificarsi e la N-acetilazione è considerata la via di trasformazione più comune per i fluorochinoloni. Questa reazione può essere catalizzata da numerosi ceppi batterici e funghi.

È interessante notare che una variante dell'enzima inizialmente collegato alla resistenza agli aminoglicosidi (aminoglicoside acetiltransferasi (AAC(6')-Ib) ha recentemente dimostrato di essere in grado di N-acetilare la ciprofloxacina. Diversi ceppi fungini possono trasformare la ciprofloxacina, ma solo due funghi (*Curvularialunata*, Ascomycetes; *Gloeophyllum striatum*, Basidiomycetes) sono stati in grado di degradare alcuni antibiotici (danofloxacina, enrofloxacin e la ciprofloxacina).

Recentemente è stato scoperto che due cultivar di *Brassica parachinensis* L. sono risultate in grado di promuovere la degradazione della ciprofloxacina nel suolo e il genere batterico *Spirochaeta* (*Spirochaetes*) e un genere fugale (*Trichosporon*, *Basidiomycota*) sono stati associati a questa degradazione dell'antibiotico nella rizosfera della pianta (Wang et al., 2025).

## 5. CONCENTRAZIONI AMBIENTALI DI ANTIBIOTICI CHE FAVORISCONO LA DIFFUSIONE DEGLI ARG

Una buona parte delle molecole antibiotiche utilizzate a scopi terapeutici hanno una struttura simile a quella di sostanze prodotte naturalmente dai batteri del suolo (Schneider, 2021). Ed infatti lo sviluppo relativamente rapido della resistenza ad alcuni antibiotici sembra essere strettamente legato alla loro origine microbica e alla loro funzione negli ambienti naturali.

Conseguentemente, l'identificazione del ruolo ecologico degli antibiotici negli ecosistemi del suolo è un tema importante per la comprensione della resistenza agli antibiotici stessi. I batteri del suolo possono produrre antibiotici non solo per le interazioni competitive e difensive, ma anche a concentrazioni sub-inibitorie per la comunicazione inter- e intra-dominio. Comunque, la determinazione dei livelli naturali di ARG e delle concentrazioni di antibiotici che non promuovono la resistenza risulta complessa, in quanto i valori naturali presentano ampie variazioni e stabilire una soglia di sicurezza è complesso. Tale complessità è attribuibile a diversi fattori: la presenza di numerosi ARG anche in ambienti non contaminati, l'impossibilità di determinare una concentrazione di antibiotico universalmente sicura che non induca resistenza in nessun microrganismo, e la complessità della dinamica tra antibiotici e batteri.

Diversi studi sperimentali dimostrano che geni per la resistenza vengono selezionati in comunità microbiche complesse a concentrazioni molto basse, definite concentrazioni minime selettive (MSC), nettamente inferiori a quelle che impediscono la crescita dei batteri sensibili (concentrazione minima inibitoria: MIC). Questo implica che anche a concentrazioni non letali, gli antibiotici possono esercitare una pressione selettiva, favorendo i batteri già resistenti (Khan et al., 2017).

La maggior parte degli studi sulle MSC sono stati condotti su singole specie batteriche e su singole sostanze. Tali studi evidenziano che le cellule resistenti possono proteggere le cellule sensibili degradando gli antibiotici sia a livello intracellulare che extracellulare, aumentando la *fitness* dei ceppi sensibili e quindi alla MSC. I metaboliti escreti, invece, possono aumentare o ridurre l'efficacia degli antibiotici, con conseguente diminuzione o aumento delle MSC (Perry et al., 2022).

L'impatto degli antibiotici come contaminanti ambientali sulle comunità batteriche miste è un argomento di ricerca che sta suscitando un crescente interesse, sebbene molti aspetti rimangano ancora complessi e dipendenti da diverse condizioni. L'effetto varia in base alla concentrazione, alla durata dell'esposizione, al tipo di antibiotico e alle caratteristiche specifiche dell'ambiente e della comunità microbica.

Un recente studio (Rauseo et al., 2021) condotto su una comunità microbica naturale (selezionata da un impianto di digestione anaerobica alimentato con letame bovino), ha evidenziato che le concentrazioni di SMX che hanno esercitato un effetto sulla crescita microbica erano superiori (>4,75 mg/L) a quelle normalmente riscontrate in ambienti naturali. Le concentrazioni di SMX testate (0,07-76 mg/L) non hanno determinato né il mantenimento né la diffusione degli ARG tra le popolazioni microbiche. Questo fenomeno potrebbe essere attribuibile a un precedente adattamento all'antibiotico. Infatti, la comunità microbica non solo non è stata inibita, ma è stata anche in grado di degradare rapidamente (24 ore) l'SMX in coltura liquida. I dati complessivi dello studio evidenziano la complessità della tematica e come gli effetti degli antibiotici sulle comunità microbiche naturali possano variare in funzione delle diverse combinazioni di fattori biotici e abiotici (Rauseo et al., 2021).



**Figura 5.** Digestore anaerobico di un'azienda agricola del Lazio.

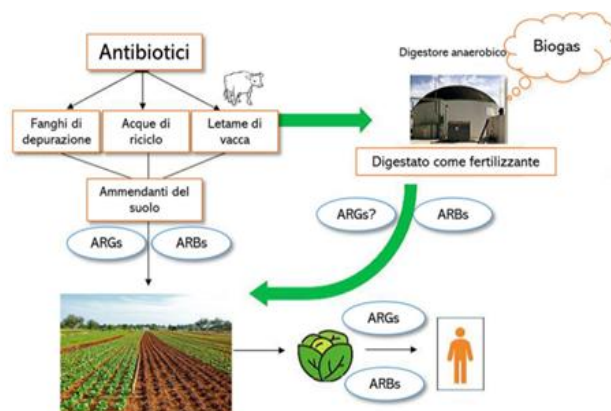
La comunità scientifica e le società farmaceutiche produttrici stanno identificando le concentrazioni di antibiotici che, sulla base delle attuali conoscenze empiriche, dovrebbero fornire limiti di sicurezza per proteggere la salute umana dai rischi di selezione della resistenza antimicrobica (Bengtsson-Palme et al., 2016). Due studi hanno proposto le PNEC (*Predicted No Effect Concentrations*) quali concentrazioni che possono prevenire la selezione AMR. Bengtsson-Palme et al. (2016) hanno proposto di stabilire limiti di emissione sicuri per gli antibiotici (PNEC) specifici per ogni composto, derivati dalle MIC per batteri clinicamente rilevanti. Le Page et al. (2017) hanno proposto un limite per le acque di scarico per concentrazioni di singole sostanze di 100 ng/L; tale valore è basato sulle MIC per i batteri clinicamente rilevanti. Bengtsson-Palme et al. (2016) hanno confrontato le concentrazioni di antibiotici misurate negli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue municipali con le PNEC per valutare se queste ultime fossero rilevanti dal punto di vista ecologico. Gli autori hanno riscontrato che le concentrazioni degli effluenti superavano le PNEC nel 28% dei casi. Questi risultati suggeriscono che potrebbe essere necessario un trattamento più avanzato per ridurre la selezione di AMR negli impianti di trattamento. Tuttavia, i meccanismi di destino e trasporto ambientale successivi allo scarico, come la diluizione e la degradazione, potrebbero influenzare la concentrazione di antibiotici negli effluenti dei corpi idrici riceventi a scala di bacino. Tuttavia, per le PNEC proposte non sono state valutate né le PEC (*Predicted Environmental concentrations*) né le concentrazioni ambientali misurate (MEC, *Measured Environmental Concentrations*) degli antibiotici nelle acque superficiali.

Altri studi hanno evidenziato che la presenza di residui di antibiotici nell'acqua potabile o in alimenti contaminati può interagire con il microbioma umano. Attraverso il consumo di acqua o alimenti, concentrazioni residuali di antibiotici possono entrare in contatto con l'apparato gastrointestinale umano, che conta circa 800-1000 specie batteriche distinte e oltre 7000 ceppi diversi (Rinnella et al. 2019). Circa il 95% dei microrganismi è costituito da batteri benefici, mentre il resto è costituito da batteri che possono portare infezioni pericolose e opportunistiche. I *Bacteroidetes* e i *Firmicutes* dominano l'equilibrio microecologico tra questi batteri e il corpo umano nel corso del tempo, mentre *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* rappresentano la minoranza, senza considerare altri phyla batterici che non sono ancora stati scoperti o caratterizzati. L'esposizione agli antibiotici è strettamente correlata ai cambiamenti nella composizione del microbioma intestinale, come osservato da alcuni studi clinici ed epidemiologici, poiché gli antibiotici hanno un effetto ad ampio spettro sulla comunità microbica associata all'ospite piuttosto che su una singola specie bersaglio. La terapia antibiotica può alterare la composizione del microbiota intestinale, determinando un aumento dei *Firmicutes* e una diminuzione dei *Bacteroidetes*, nonché la formazione di batteri resistenti agli antibiotici che vi possono rimanere per anni (Patangia et al., 2022).

Infine, l'effetto degli antibiotici può associarsi a quello di altri inquinanti, inclusi metalli pesanti e le microplastiche, portando a conseguenze complesse e non ancora completamente spiegate (Mazumder et al., 2023).

## 6. I DIGESTORI ANAEROBICI: UNA TECNOLOGIA CHE AIUTA A SMALTIRE I RESIDUI ORGANICI DELLE AZIENDE AGRICOLE

La digestione anaerobica (DA) è una tecnologia consolidata e in continuo sviluppo, che svolge un ruolo chiave nel concetto di economia circolare (Kougiass e Angelidaki, 2018) contribuendo a diversi aspetti della sostenibilità agricola. Il processo di DA, grazie alle comunità microbiche presenti, degrada e stabilizza anaerobicamente i residui organici, come il letame, riducendo le emissioni di gas serra. Il biogas prodotto è una bioenergia sostenibile che può sostituire i com-



**Figura 6.** Le pratiche agricole e il loro potenziale percorso nella diffusione dei batteri resistenti agli antibiotici e dei geni dell'antibiotico resistenza (mod. da Barra Caracciolo et al., 2020).

bustibili fossili nella produzione di elettricità, calore e come carburante (Kougias e Angelidaki, 2018).

Il digestato, prodotto secondario del processo di DA, ha un alto contenuto di nutrienti essenziali per le piante e di carbonio organico e pertanto può essere utilizzato in sostituzione dei fertilizzanti chimici (Scarlat et al., 2018).

Considerando i benefici derivanti dalla digestione anaerobica, è stato investigato se tale processo potesse essere influenzato dalla presenza di concentrazioni residuali di antibiotici che si trovano nel letame, quest'ultimo utilizzato come filler nei digestori (Figura 5).

## 7. STUDI SPERIMENTALI CNR-IRSA

I laboratori di Ecologia del suolo e delle acque e di Ecotossicologia dell'IRSA di Roma stanno conducendo diverse ricerche sulla diffusione dell'antibiotico-resistenza nell'ambiente (acqua e suolo) e sugli effetti di tali molecole sulle comunità microbiche naturali, considerando diversi aspetti, tra cui l'individuazione di singole dosi di effetto, di miscele e la valutazione del fenomeno in acque fluviali utilizzate a scopo irriguo e potabile (Barra Caracciolo et al., 2019; Visca et al., 2021b). Le ricerche in microcosmo e in campo, nonché la ricerca di soluzioni per ridurre tale fenomeno, sono parte integrante dei progetti di ricerca.

La possibilità che concentrazioni residuali di antibiotici e i relativi geni della resistenza siano presenti nel digestato ottenuto dalla digestione anaerobica nei digestori di aziende agricole, e l'impatto di tali antibiotici sulle comunità microbiche responsabili del processo di digestione anaerobica, costituiscono argomenti di ricerca attuali e ancora poco investigati (Figura 6) che sono oggetto di studio del gruppo di ricerca.

Sono state condotte diverse sperimentazioni (in collaborazione con il Laboratorio Processi Biotecnologici per l'Energia e l'Industria dell'ENEA Casaccia), in ambienti controllati di laboratorio quali microcosmi e batch. I risultati sono stati successivamente validati mediante studi a scala reale in digestori anaerobici di aziende zootecniche del Lazio, che impiegano principalmente letame bovino come substrato principale.

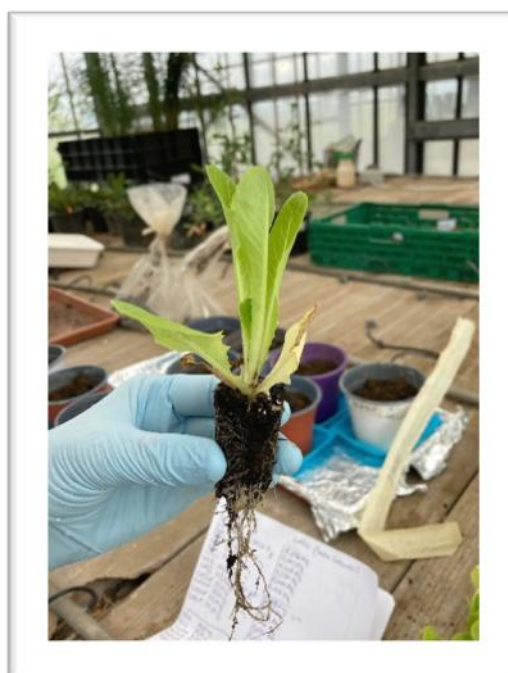
Tali studi sono stati svolti nell'ambito del Progetto "Valutazione della presenza di antibiotici nei rifiuti zootecnici e nel digestato degli impianti di biogas: studio delle strategie per la loro rimozione - AZeRO antibiotici" finanziato dalla Regione Lazio (Lazio Innova; <http://www.azeroantibiotici.eu>). L'obiettivo principale della ricerca era valutare come la presenza di specifici antibiotici (sulfametossazolo, ciprofloxacina ed enrofloxacin) ampiamente utilizzati in zootecnia, potesse influenzare il processo di digestione anaerobica, in termini di produzione di biogas. Inoltre sono state investigate quali condizioni potessero favorire la degradazione degli antibiotici durante la digestione anaerobica di letame bovino. È stato inoltre condotto uno studio approfondito sui geni della resistenza (Massini et al., 2021).

Un primo esperimento ha utilizzato il letame bovino raccolto da una vasca di alimentazione di un impianto di digestione anaerobica: Questo è stato utilizzato in esperimenti in batch di digestione anaerobica in cui

alcuni campioni sono stati addizionati con 5 mg/L di sulfametossazolo (Mazzurco Miritana et al., 2020). L'aggiunta dell'antibiotico ha influenzato la dinamica della comunità microbica; in particolare, grazie ad una migliore efficienza delle fasi acidogenica e acetogenica del processo, è stata prodotta una quantità di biogas ( $\text{CH}_4$  e  $\text{H}_2$ ) superiore rispetto al controllo. Inoltre, l'antibiotico SMX è stato degradato e, alla fine dell'esperimento (circa 70 giorni), è stato rilevato solo il 20% della sua concentrazione iniziale. L'abbondanza relativa (ARG/16S) dei geni di resistenza *sul1*, *sul2* e del proxy *intl1*, inizialmente rilevati nell'ingestato, è diminuita durante la digestione anaerobica sia nei campioni addizionati con SMX che in quelli di controllo. Questo importante risultato suggerisce che questo processo è in grado di ridurre i geni della resistenza e, nel caso in cui il digestato venga utilizzato come fertilizzante del suolo, viene ridotta la probabilità di diffusione dei geni di resistenza agli antibiotici nei terreni agrari.

Un altro studio effettuato in batch (Mazzurco Miritana et al., 2022) della durata di 90 giorni, utilizzando come filler il letame bovino, ha valutato gli effetti dell'aggiunta di CIP, da sola (5 mg/L) e in combinazione con l'SMX (2,5-5-10 mg/L), sull'efficienza della digestione anaerobica e sulla struttura della comunità microbica. Un risultato importante è stato che l'aggiunta degli antibiotici ha favorito la produzione di  $\text{CH}_4$  e  $\text{H}_2$  rispetto ai controlli non trattati, sebbene la produzione di  $\text{CH}_4$  è diminuita con le concentrazioni più elevate di CIP. I risultati nel loro insieme mostrano che la degradazione degli antibiotici è dovuta a batteri acidogenici e il  $\text{CH}_4$  è stato prodotto principalmente attraverso il percorso idrogenotrofico da parte di archeobatteri metanogenici. Questo studio ha dimostrato la presenza nel digestore di popolazioni microbiche pre-adattate agli antibiotici, che sono state favorite in questa sperimentazione.

Un terzo studio in batch (Mazzurco Miritana et al.,



**Figura 7.** Piantina di *Lactuca sativa*, pianta edibile utilizzata negli studi sperimentali.



2025) ha valutato gli effetti di una miscela di tre antibiotici (enrofloxacin, ciprofloxacina e sulfametossazolo) sulla produzione di CH<sub>4</sub>, sulle dinamiche della comunità microbica (funghi, batteri e archeobatteri) e sulla presenza di ARG. L'esperimento ha utilizzato un rapporto letame bovino/digestato di 1:35, tipico dei digestori reali, con due concentrazioni di antibiotici (2,5 e 7,5 mg/kg ciascuno). Tra i risultati principali, è stato evidenziato che la comunità microbica ha mantenuto una produzione efficiente di CH<sub>4</sub> e solo le concentrazioni più alte della miscela di antibiotici ha influenzato la produzione cumulativa di metano (compresa tra 5939 e 6464 mL). Dopo 51 giorni, l'SMX è stato rilevato a concentrazioni residuali, mentre l'ENR e la CIP sono state degradate solo parzialmente (<50%), sebbene gli ARG siano stati significativamente ridotti. I risultati nel loro insieme confermano che la digestione anaerobica è un processo efficace per la produzione di energia e di un buon fertilizzante organico, riducendo anche il contenuto di antibiotici e ARG e mitigando le emissioni di CH<sub>4</sub> nell'atmosfera (Mazzurco Miritana et al., 2025).

I risultati degli studi di laboratorio sono stati confermati da quelli su scala reale sugli impianti di digestione. Sono state infatti analizzate stagionalmente cam-



**Figura 8.** Sperimentazioni in serra utilizzando *Lactuca sativa* per valutare il possibile trasferimento della resistenza dal suolo ad una pianta edibile.

pioni in ingresso e in uscita da diversi impianti di digestione anaerobica in aziende agricole reali. I risultati hanno messo in evidenza che l'SMX, la CIP e l'ENR si degradano durante il processo di digestione anaerobica, anche se con percentuali diverse (84-100%), a seconda della stagione considerata e del tipo di antibiotico. In linea con la diminuzione degli antibiotici, tutti gli ARG rilevati (*sul1*, *sul2*, *qnrS*, *qepA*, *aac*-(6')-Ib-cr) sono diminuiti significativamente (fino all'80%) nei campioni in uscita di digestato (Visca et al., 2021a). Questo risultato ha confermato, anche su scala reale, che il processo di digestione anaerobica può agire come un efficace strumento di riduzione dei residui di antibiotici e ARG nel letame e, di conseguenza, del rischio di introduzione di antibiotici e ARG nel suolo utilizzando il digestato come fertilizzante organico.

A queste sperimentazioni si sono affiancati altri studi di laboratorio condotti utilizzando il digestato e il letame come ammendanti organici, valutando così anche il possibile trasferimento della resistenza dal suolo ad una pianta edibile (*Lactuca sativa*, Figura 7). In un primo studio, la crescita della lattuga è stata esaminata in presenza di letame o digestato, su un suolo nel quale sono stati aggiunti anche tre antibiotici (SMX, CIP e ENR, Figura 8). Il risultato principale ha messo in luce la capacità della comunità microbica del suolo di degradare gli antibiotici (Barra Caracciolo et al., 2022). Inoltre, è stato evidenziato che *Lactuca sativa* assorbiva parzialmente CIP e ENR dal terreno (fattori di bioaccumulo > 1). Questi due antibiotici si sono anche confermati essere più persistenti e più bioaccumulati in presenza di letame rispetto a quanto osservato in presenza di digestato. Inoltre, il gene della resistenza ai fluorochinoloni (*aac*-(6')-Ib-cr) è stato rilevato nelle foglie di lattuga, sempre con valori maggiori in presenza di letame. Sebbene l'antibiotico SMX fosse stato completamente rimosso, il gene *sul2* viene ritrovato nella rizosfera, mostrando come i geni della resistenza possano avere una maggiore persistenza ambientale rispetto ai loro corrispondenti antibiotici.

Un ulteriore studio (Narciso et al., 2024) ha voluto verificare se la co-presenza di un antibiotico e di un altro contaminante, in particolare un metallo pesante, potesse influenzare il fenomeno della diffusione dell'antibiotico resistenza. A tal fine un suolo è stato addizionato con SMX e in alcuni casi anche con rame e ammendato con letame o digestato. È stato osservato un immediato aumento dei geni della resistenza *sul1* e *sul2*. La resistenza indotta, tuttavia tende a diminuire nel tempo e la comunità microbica naturale risulta in grado di rimuovere il 99% dell'antibiotico in 36 giorni. Differentemente, nelle condizioni sperimentali dove è presente anche il rame si osserva una persistenza del gene *sul2* per probabili fenomeni di "cross-resistance". Anche in questo studio si conferma che l'SMX non viene bioaccumulato nelle foglie di lattuga e che la pianta si sviluppa più rigorosa in presenza di digestato. La presenza di quest'ultimo attenua, inoltre, gli effetti negativi della co-presenza del rame e di SMX sulla biomassa della pianta e sull'attività microbica.

Inoltre, è stato rilevato che il digestato stimola una maggiore biodiversità microbica del suolo, introducendo e promuovendo un maggior numero di batteri lega-



**Figura 9.** Foto dell'impianto in Danimarca dove è stato condotto lo studio

ti alla degradazione degli antibiotici (Barra Caracciolo et al., 2022).

Gli effetti combinati diretti ed indiretti di miscele in cui sono presenti antibiotici rappresentano una frontiera di studio importante poiché i contaminanti si trovano in questa forma nell'ambiente e tale approccio è quello più realistico per effettuare valutazioni del rischio. Tuttavia i dati ad oggi si sono concentrati su singole sostanze. Uno strumento di indagine molto utile per valutare gli effetti additivi, sinergici o antagonisti di più sostanze è quello ecotossicologico. I laboratori di Ecologia del suolo e delle acque e di Ecotossicologia dell'IRSA di Roma hanno anche approfondito studi sull'ecotossicità di miscele di antibiotici e rame utilizzando test ecotossicologici con diversi organismi. Per esempio, è stato utilizzato il batterio bioluminescente *Alivibrio fischeri* per valutare gli effetti di SMX, CIP e tetraciclina in soluzioni singole, binarie, ternarie e in presenza di rame (Narciso et al. 2023). I risultati relativi alla tossicità sono stati riportati sia in termini di concentrazioni efficaci, che hanno inibito il 50% della bioluminescenza dei batteri (EC 50 %), sia in unità tossiche (TU). Le TU sono state confrontate con i valori previsti ottenuti utilizzando il modello di aggiunta di concentrazioni (*Concentration Addition*: CA). Infine, è stata valutata anche la tossicità degli estratti acquosi di un terreno contaminato dai tre antibiotici (7 mg/Kg ciascuno) in presenza/assenza di rame (30 mg/Kg). Il rame è risultato la sostanza chimica più tossica (EC<sub>50</sub>: 0,78 mg/L), seguito dal CTC (EC<sub>50</sub>: 3,64 mg/L), CIP (96 mg/L) e SMX (196 mg/L). Confrontando i valori TU e CA delle miscele, sono stati

generalmente riscontrati effetti additivi. Tuttavia, è stata registrata un'azione sinergica nel caso della co-presenza di CIP + Cu e sono stati identificati effetti antagonisti nel caso di CTC + Cu e della miscela ternaria (contenente ciascun antibiotico a 0,7 mg/L). Gli estratti di acqua dal suolo non hanno mostrato alcuna tossicità, dimostrando la capacità tampone del suolo di immobilizzare queste sostanze chimiche.

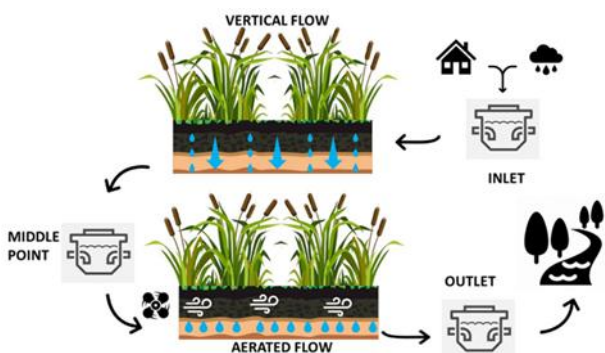
Sebbene alcuni autori abbiano stimato un rischio per l'uomo limitato a seguito dell'esposizione a singole sostanze attraverso il consumo di prodotti vegetali (Boxall et al., 2006, Prosser et al., 2015), non si può escludere un rischio di esposizione a lungo termine a miscele di prodotti farmaceutici o ai loro metaboliti attivi (Barra Caracciolo et al., 2022).

Grazie ad una collaborazione recente con il Dipartimento di Scienze Ambientali dell'Università di Aarhus, (Roskilde, Danimarca) è stato condotto uno studio per valutare la capacità di una "treatment wetland" (TW) reale (operante da circa 10 anni in un villaggio della campagna danese) di rimuovere un gran numero di microinquinanti organici (inclusi gli antibiotici) e di contrastare la resistenza agli antibiotici (Kisieliuset al., 2025). Una TW si basa sull'azione combinata di microorganismi naturali e piante per depurare le acque reflue. Nel caso studiato la specie vegetale era *Phragmites australis* e l'impianto era costituito da due vasche combinate: un letto a flusso verticale seguito da un letto aerato (Figure 9 e 10).

Le analisi, condotte su campioni rappresentativi per un periodo di 18 mesi (con cadenza trimestrale), hanno incluso l'analisi del carbonio organico, dell'azoto e di alcuni contaminanti organici (ad esempio farmaci, inclusi gli antibiotici).

Inoltre, sono state analizzate, in quattro campionamenti stagionali, la struttura della comunità microbica (abbondanza e biodiversità) e la possibile presenza di geni di ARG nelle acque reflue e nella rizosfera delle canne in diversi punti del TW. I risultati hanno dimostrato una consistente abbattimento dei nutrienti e dei contaminanti organici, con minori prestazioni in inverno, a causa della dormienza delle piante e delle temperature più basse.

La TW serve una popolazione di piccole dimensioni e gli antibiotici sono entrati nel sistema sporadicamente, ma a concentrazioni comunque elevate; tuttavia i geni *sul1*, *sul2* (associati alla resistenza ai sulfonamidi) e il gene *int1* (indicatore di resistenza) sono stati rilevati in tutti i campionamenti microbiologici, anche in assenza dei corrispondenti antibiotici. Questo risultato suggerisce che i geni della resistenza possono avere una maggiore persistenza rispetto a quella degli antibiotici. Nel complesso questo studio conferma l'efficacia di una TW nel rimuovere i contaminanti sia normati che emergenti. Il letto a flusso verticale è risultato particolarmente efficace nel ridurre i contaminanti organici considerati (compresi gli antibiotici) e gli ARG grazie all'azione sinergica di rimozione instaurata nel sistema canneto-microbioma rizosferico. Una TW ben disegnata può pertanto fungere da biofiltro per contaminanti emergenti specifici, limitandone il trasferimento nel comparto acquatico ricevente. La ricerca e l'applicazione tecnologica deve ora guardare verso applicazioni di TW su larga scala per raggiunge-



**Figura 10.** Schema di funzionamento dell'impianto in Danimarca oggetto di studio (Kisieliuset al., 2025)



re elevate efficienze di rimozione sia per gli antibiotici che per gli ARG dalle acque reflue.

## CONCLUSIONI

Residui di antibiotici, insieme ai loro metaboliti e geni di resistenza, sono stati rilevati in tutti i comparti ambientali, compreso il suolo e pertanto si possono definire contaminanti emergenti ubiquitari. Poiché gli antibiotici sono molecole che possono avere effetti a basse concentrazioni, per la loro natura intrinseca di sostanze bioattive, rappresentano un rischio per la salute degli ecosistemi e dell'uomo.

La presenza di antibiotici nel suolo, in funzione della loro concentrazione, può avere effetti diretti: eliminazione o inibizione di popolazioni batteriche coinvolte in servizi ecosistemici chiave; effetti indiretti: promozione di meccanismi di resistenza batterica (ad esempio, ARGs), che possono essere trasferiti dai batteri del suolo alle piante, e selezione di popolazioni batteriche in grado di degradarli. Il legame tra la degradazione degli antibiotici e la resistenza deve ancora essere compreso appieno, tuttavia più un antibiotico viene prontamente degradato, minore è il rischio di diffusione della sua resistenza. Attualmente non sono state determinate le concentrazioni in grado di mantenere e selezionare la resistenza o la degradazione degli antibiotici nelle popolazioni microbiche naturali miste. Inoltre, pochi studi si concentrano su metaboliti, prodotti di trasformazione o miscele di antibiotici e altri inquinanti che possono coesistere nel suolo (es. metalli pesanti, microplastiche). Infine, i loro effetti a lungo termine devono ancora essere studiati e rappresentano un punto chiave per la ricerca futura su questo tema molto complesso.

L'IRSA è coinvolta in diversi progetti sull'antibiotico-resistenza nell'ambiente in un approccio *One Health*. Grazie all'esperienza maturata in tale ambito, l'IRSA fa parte del Gruppo di Lavoro del Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR) 2022-2025 e della piattaforma internazionale AMR Multi-Stakeholder Partnership Platform (<https://www.qjsamr.org/multistakeholder-partnership-platform/about>). Quest'ultima, gestita dalla FAO, UNEP, OMS e WOA, funge da meccanismo di governance globale sull'AMR, riunendo a livello globale oltre 250 membri per promuovere il dialogo sulle possibili soluzioni in tutti i settori *One Health* per affrontare l'AMR che siano pertinenti, scalabili e radicate nelle sfide del mondo reale.

## BIBLIOGRAFIA

Arivazhahan A (2021) Sulfonamides, quinolones, and agents for urinary tract infections. In: Paul A, Anandabaskar N, Mathaiyan J, Raj GM (Eds.) Introduction to basics of pharmacology and toxicology. Springer, Singapore, pp 807–819. [https://doi.org/10.1007/978-981-33-6009-9\\_53](https://doi.org/10.1007/978-981-33-6009-9_53)

Bahram M, Hildebrand F, Forslund SK, Anderson JL, Soudzilovskaia NA, Bodegom PM, Bengtsson-Palme J, Anslan S, Coelho LP, Harend H, Huerta-Cepas J,

Medema MH, Maltz MR, Mundra S, Olsson PA, Pent M, Pölme S, Sunagawa S, Ryberg M, Tedersoo L, Bork P (2018) Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature* 560(7717): 233–237. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0386-6>

Baquero F, Coque TM, Martínez JL (2022) Natural detoxification of antibiotics in the environment: A one health perspective. *Front. Microbiol.* 13: 1062399. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1062399>

Barra Caracciolo A., Grenni, P., Rauseo, J., Ademollo, N., Cardoni, M., Rolando, L., Patrolecco, L. (2018) Degradation of a fluoroquinolone antibiotic in an urbanized stretch of the River Tiber. *Microchem. J.* 136: 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.008>

Barra Caracciolo A, Patrolecco L, Grenni P, Di Lenola M, Ademollo N, Rauseo J, Rolando L, Spataro F, Plutzer J, Monostory K, Sperlagh B (2019) Chemical mixtures and natural microbial community in an urbanized stretch of the River Danube. *Microchem J* 14:985-994. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.021>

Barra Caracciolo A, Visca A, Massini G, Patrolecco L, Mazzurco Miritana V, Grenni P (2020) Environmental fate of antibiotics and resistance genes in livestock waste and digestate from biogas plants. *Environ Sci Pollut Res Manag ESPRM*-102. <https://doi.org/10.37722/ESPRAM.20201>

Barra Caracciolo A, Visca A, Rauseo J, Spataro F, Garbini GL, Grenni P, Mariani L, Mazzurco Miritana V, Massini G, Patrolecco L (2022). Bioaccumulation of antibiotics and resistance genes in lettuce following cattle manure and digestate fertilization and their effects on soil and phyllosphere microbial communities. *Environ. Poll.* 315:120413. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120413>

Bengtsson-Palme J, Larsson DGJ (2016) Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: proposed limits for environmental regulation. *Environ. Int.* 86: 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015>

Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ (2018) Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 42(1): fux053. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux053>

Boxall ABA, Johnson P, Smith EJ, Sinclair CJ, Stutt E, Levy LS (2006) Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J. Agric. Food Chem.* 54(6): 2288–2297. <https://doi.org/10.1021/jf053041t>



- Conde-Cid M, Núñez-Delgado A, Fernández-Sanjurjo M J, Álvarez-Rodríguez E, Fernández-Calviño D, Arias-Estévez M (2020) Tetracycline and sulfonamide antibiotics in soils: presence, fate and environmental risks. *Processes* 8(11): 1479. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.217>
- Crane M, Boxall ABA, Barret K (2010) *Veterinary Medicines in the Environment*. Boca Raton, FL: CRC Press <https://doi.org/10.1201/9781420084771>
- Cruz-Loya M, Kang TM, Lozano NA, Watanabe R, Tekin E, Damoiseaux R, Savage VM, Yeh PJ (2019) Stressor interaction networks suggest antibiotic resistance co-opted from stress responses to temperature. *ISME J.* 13(1): 12–23. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0241-7>
- Cycoń M, Mroziak A, Piotrowska-Seget Z (2019) Antibiotics in the soil environment-degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Front. Microbiol.* 10: 338. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338>
- Dar D, Sorek R (2017) Regulation of antibiotic-resistance by non-coding RNAs in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 36: 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.02.005>
- Dragosits M, Mozhayskiy V, Quinones-Soto S, Park J, Tagkopoulos I (2013) Evolutionary potential, cross-stress behavior and the genetic basis of acquired stress resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* 9(1): 643. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.76>
- Emmerson AM (2003) The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (90001): 13–20. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg208>
- Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J (2009) Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb. Biotechnol.* 2(1): 40–61. <https://doi.org/10.1111/j.1751-915.2008.00063.x>
- Fischer M, Thöny B, Leimkühler S (2010) The biosynthesis of folate and pterins and their enzymology. In: Mander L, Lui HW (Eds.) *Comprehensive natural products II chemistry and biology*. Elsevier, Oxford, pp. 599–648. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00150-7>
- Georgina Solano-Gálvez S, Fernanda Valencia-Segrove M, José Ostos Prado M, Berenice López Boucieguez A, Abelardo Álvarez-Hernández D, Vázquez-López R (2021) Mechanisms of resistance to quinolones. In: *Antimicrobial resistance—a one health perspective*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92577>
- Grenni P, Ancona V, Barra Caracciolo A (2018) Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: a review. *Microchem. J.* 136: 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>
- Grenni P (2022) Antimicrobial resistance in rivers: a review of the genes detected and new challenges. *Environ. Toxicol. Chem.* 41 (3): 687–714. <https://doi.org/10.1002/etc.5289>
- Grenni P, Visca A, Barra Caracciolo A (2024). Antibiotics as Emerging Pollutants of Soil Ecosystems. In: Núñez-Delgado A (Ed.) *Frontier Studies in Soil Science*, pp. 21–41. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-50503-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-031-50503-4_2)
- Gworek B, Kijeńska M, Wrzosek J, Graniewska M (2021) Pharmaceuticals in the soil and plant environment: a review. *Water Air Soil Pollut.* 232(4): 145. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04954-8>
- Hinrichs W, Kisker C, Duvel M, Muller A, Tovar K, Hillen W, Saenger W (1994) Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science* 264(5157):418–420. <https://doi.org/10.1126/science.8153629>
- Hirth N, Topp E, Dörfler U, Stupperich E, Munch JC, Schroll, R. (2016). An effective bioremediation approach for enhanced microbial degradation of the veterinary antibiotic sulfamethazine in an agricultural soil. *Chem Biol Technol Agr* 3:29. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0080-6>
- Ingram PR, Rogers BA, Sidjabat HE, Gibson JS, Inglis TJJ (2013) Co-selection may explain high rates of ciprofloxacin non-susceptible *Escherichia coli* from retail poultry reared without prior fluoroquinolone exposure. *J Med Microbiol* 62(11):1743–1746. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.062729-0>
- Ivanová L, Mackulak T, Grabic R, Golovko O, Koba O, Stanová AV, SzabováP, Grencíková A, Bodík I (2018) Pharmaceuticals and illicit drugs—a new threat to the application of sewage sludge in agriculture. *Sci. Total Environ.* 634: 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.001>
- Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC (2014) Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol. Spectrum* 2(5): 10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013
- Jousset A, Bonkowski M (2010) The model predator *Acanthamoeba castellanii* induces the production of 2,4, DAPG by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Q2–87. *Soil Biol. Biochem.* 42(9): 1647–1649. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.018>
- Kairigo P, Ngumba E, Sundberg LR et al. (2020)

Occurrence of antibiotics and risk of antibiotic resistance evolution in selected Kenyan wastewaters, surface waters and sediments. *Sci. Total Environ.* 720: 137580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137580>.

Karczmarczyk M, Abbott Y, Walsh C, Leonard N, Fanning S (2011) Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from animals presenting at a university veterinary hospital. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(20): 7104–7112. <https://doi.org/10.1128/AEM.00599-11>

Khan S, Beattie TK, Knapp CW (2017) The use of minimum selectable concentrations (MSCs) for determining the selection of antimicrobial resistant bacteria. *Ecotoxicology* 26: 283–292. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1762-y>

Kim S, Chen J, Cheng T, et al. (2025) PubChem 2025 update. *Nucleic Acids Res.* 53(D1): D1516–D1525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf1059>

Kisieliu V, Barra Caracciolo A, Mingoli A, Parisi E, Martinez i Quer A, Garbini GL, Grenni P, Carvalho PN (2025) Decentralized Wastewater Management Using Treatment Wetlands: Effective Removal of Antibiotics, Resistance Genes and Organic Micropollutants. *Sci. Total Environ.* 1000: 180406. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.180406>

Kougiass PG, Angelidaki I (2018) Biogas and its opportunities—A review. *Front. Environ. Sci. Eng.* 12(3): 14. <https://doi.org/10.1007/s11783-018-1037-8>

Kuppusamy S, Kakarla D, Venkateswarlu Ket al. (2018) Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: a critical view. *Agric. Ecosyst. Environ.* 257: 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.026>

Leal RMP, Figueira RF, Tornisiello VL, Regitano JB (2012) Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil. *Sci. Total Environ.* 432: 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.002>

Le Page G, Gunnarsson L, Snape J, Tyler CR (2017) Integrating human and environmental health in antibiotic risk assessment: a critical analysis of protection goals, species sensitivity and antimicrobial resistance. *Environ. Int.* 109: 155–169. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.09.013>

Le Page G, Gunnarsson L, Trznadel M, Wedgwood KCA, Baudrot V, Snape J, Tyler CR (2019) Variability in cyanobacteria sensitivity to antibiotics and implications for environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 695: 133804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133804>

[doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133804](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133804)

Li WC (2014) Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ. Pollut.* 187: 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.015>

Li Y, Sallach JB, Zhang W, Boyd SA, Li H (2019) Insight into the distribution of pharmaceuticals in soil-water-plant systems. *Water Res.* 152: 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.039>

Liu L, Mi J, Wang Y, Zou Y, Ma B, Liao X et al. (2018) Different methods of incorporating ciprofloxacin in soil affect microbiome and degradation of ciprofloxacin residue. *Sci. Total Environ.* 619: 1673–1681. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.133>

Margenat A, You R, Cañameras N, Carazo N, Díez S, Bayona JM, Matamoros V (2020) Occurrence and human health risk assessment of antibiotics and trace elements in *Lactuca sativa* amended with different organic fertilizers. *Environ. Res.* 190: 109946. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109946>

Martinez JL (2008) Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 321(5887): 365–367. <https://doi.org/10.1126/science.1159483>

Massini G, Mazzurco Miritana V, Visca A, Grenni P, Barra Caracciolo A (2021) Valutazione della presenza di antibiotici nei reflui zootecnici e nel digestato di impianti di biogas: studio di strategie per la loro rimozione - Il contributo alla ricerca del Progetto AZeRO Antibiotici. A cura di: Barra Caracciolo A, Massini G, 63 pp. Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR). ISBN: 978-88-976-5509-1.

Mazumder P, Dash S, Kumar M, Silori R, Tiwari A, Khwairakpam M, Kalamdhad AS (2023) Association of microplastics with heavy metals and antibiotic resistance bacteria/genes in natural ecosystems-A perspective through science mapping approach. *Groundwater for Sustainable Development*, 22: 100962. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2023.100962>

Mazzurco Miritana V, Massini G, Visca A, Grenni P, Patrolecco L, Spataro F, Rauseo J, Garbini GL, Signorini A, Rosa S, Barra Caracciolo A (2020) Effects of sulfamethoxazole on the microbial community dynamics during the anaerobic digestion process. *Front. Microbiol.* 11: 537783. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.537783>

Mazzurco Miritana V, Patrolecco L, Barra Caracciolo A, Visca A, Piccinini F, Signorini A, Rosa S, Grenni P,

- Garbini GL, Spataro F, Rauseo J, Massini G (2022) Effects of ciprofloxacin alone or in mixture with sulfamethoxazole on the efficiency of anaerobic digestion and its microbial community. *Antibiotics* 11(8): 1111. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081111>
- Mazzurco Miritana V, Barra Caracciolo A, Jasmin Rauseo Spataro F, Scordo G, Patrolecco L, Garbini GL, Visca V, Grenni P, Rolando L, Massini G (2025) Anaerobic Digestion of Cattle Manure Contaminated with an Antibiotic Mixture: A Nature-Based Solution for Environmental Management. *Land* 14(2): 353 <https://doi.org/10.3390/land14020353>
- Monteiro SC, Boxall ABA (2009) Factors affecting the degradation of pharmaceuticals in agricultural soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 28(12): 2546. <https://doi.org/10.1897/08-657.1>
- Narciso A, Barra Caracciolo A, Grenni P, Rauseo J, Patrolecco L, Spataro F, Mariani L (2023) Application of the *Aliivibrio fischeri* bacterium bioassay for assessing single and mixture effects of antibiotics and copper. *FEMS Microbiol. Ecol.* 99(11): fiad125. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiad125>
- Nguyen B-AT, Chen Q-L, He J-Z, Hu H-W (2020) Microbial regulation of natural antibiotic resistance: understanding the protist-bacteria interactions for evolution of soil resistome. *Sci. Total Environ.* 705: 135882. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135882>
- Oliver MA, Gregory PJ (2015) Soil, food security and human health: a review. *Eur. J. Soil Sci.* 66(2): 257–276. <https://doi.org/10.1111/ejss.12216>
- Ortiz de García SA, Pinto Pinto G, García-Encina PA et al. (2014) Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. *Ecotoxicology* 23: 1517–1533. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1293-8>
- Pan M, Wong CKC, Chu LM (2014) Distribution of antibiotics in wastewater-irrigated soils and their accumulation in vegetable crops in the Pearl River Delta, Southern China. *J. Agric. Food Chem.* 62(46): 11062–11069. <https://doi.org/10.1021/jf503850v>
- Pan M, Chu LM (2017) Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. *Sci. Total Environ.* 599–600: 500–512. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.214>
- Patangia DV, Anthony Ryan C, Dempsey E, Paul Ross R, Stanton C (2022) Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *Microbiologyopen*. 11(1): e1260. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1260>
- Pereira P, Bogunovic I, Muñoz-Rojas M, Brevik EC (2018) Soil ecosystem services, sustainability, valuation and management. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 5: 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.12.003>
- Perreten V, Boerlin P (2003) A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(3): 1169–1172. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1169-1172.2003>
- Perry EK, Meirelles LA, Newman DK (2022) From the soil to the clinic: the impact of microbial secondary metabolites on antibiotic tolerance and resistance. *Nat Rev Microbiol.* 20(3): 129–142. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00620-w>
- Pitt SJ and Gunn A (2024) The One Health Concept. *Br. J. Biomed. Sci.* 81: 12366. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2024.12366>
- Pham TDM, Ziora ZM, Blaskovich MAT (2019) Quinolone antibiotics. *Med. Chem. Comm* 10(10): 1739. <https://doi.org/10.1039/C9MD00120D>
- Polianciuc SI, Gurzău AE, Kiss B, Ștefan MG, Loghin F. (2020) Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Med. Pharm. Rep.* 93(3): 231–40. <https://doi.org/10.15386/mpr-1742>
- Prosser RS, Sibley PK (2015) Human health risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in plant tissue due to biosolids and manure amendments, and wastewater irrigation. *Environ Int* 75:223–233. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.020>
- Rauseo J, Barra Caracciolo A, Ademollo N, Cardoni M, Di Lenola M, Gaze W, Stanton I, Grenni P, Pescatore T, Spataro F (2019) Dissipation of the antibiotic sulfamethoxazole in a soil amended with anaerobically digested cattle manure. *J. Haz. Mater.* 378: 120769. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116317>
- Rauseo J, Barra Caracciolo A, Spataro F, Visca A, Ademollo N, Pescatore T, Grenni P, Patrolecco L (2021) Effects of sulfamethoxazole on growth and antibiotic resistance of a natural microbial community. *Water* 13: 1262. <https://doi.org/10.3390/w13091262>
- Ren J, Lu H, Lu S, Huang Z (2024) Impacts of sulfamethoxazole stress on vegetable growth and rhizosphere bacteria and the corresponding mitigation mechanism. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 12:



1303670. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1303670>

Sánchez MB, Martínez JL (2015) The efflux pump SmeDEF contributes to trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(7): 4347-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.00714-15>

Sánchez-Osuna M, Cortés P, Barbé J, Erill I (2019) Origin of the mobile di-hydro-pterolate synthase gene determining sulfonamide resistance in clinical isolates. *Front. Microbiol.* 9: 3332. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03332>

Scarlat N, Fahl F, Dallemand JF, Monforti F, Motola V (2018) A spatial analysis of biogas potential from manure in Europe. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 94: 915-930. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.06.035>

Schneider YK (2021) Bacterial natural product drug discovery for new antibiotics: Strategies for tackling the problem of antibiotic resistance by efficient bio-prospecting. *Antibiotics*, 10: 842. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070842>

Sharma PC, Jain A, Jain S, Pahwa R, Yar MS (2010) Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25(4): 577-589. <https://doi.org/10.3109/14756360903373350>

Song C, Mazzola M, Cheng X, Oetjen J, Alexandrov T, Dorrestein P, Watrous J, van der Voort M, Raaijmakers JM (2015) Molecular and chemical dialogues in bacteria-protista interactions. *Sci. Rep.* 5(1): 12837. <https://doi.org/10.1038/srep12837>

Starling MCVM, Amorim CC, Leão MMD (2019) Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. *J. Haz. Mater.* 372: 17-36. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.043>

Sun Y, Guo Y, Shi M, Qiu T, Gao M, Tian S, Wang X (2021) Effect of antibiotic type and vegetable species on antibiotic accumulation in soil-vegetable system, soil microbiota, and resistance genes. *Chemosphere* 263: 128099. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128099>

Swiecio A (2016) Cross-stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* yeast—new insight into an old phenomenon. *Cell Stress Chaperones* 21(2): 187-200. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0667-7>

Tao S, Chen H, Li N, Wang T, Liang, W (2022). The spread of antibiotic resistance genes in vivo model. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2022(1): 3348695. <https://doi.org/10.1155/2022/3348695>

Trouchon T, Lefebvre S (2016) A review of enrofloxacin for veterinary use. *Open J. Veter. Med.* 6(2): -58. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2016.62006>

Visca A, Barra Caracciolo A, Grenni P, Patrolecco L, Rauseo J, Massini G, Mazzurco Miritana V, Spataro F (2021a). Anaerobic Digestion and Removal of Sulfamethoxazole, Enrofloxacin, Ciprofloxacin and Their Antibiotic Resistance Genes in a Full-Scale Biogas Plant. *Antibiotics* 10(5): 502. <https://doi.org/10.3390/antibiotics1005050>

Visca A, Barra Caracciolo A, Grenni P, Rolando L, Mariani L, Rauseo J, Spataro F, Monostory K, Sperlagh B, Patrolecco L (2021b) Legacy and emerging pollutants in an urban river stretch and effects on the bacterioplankton community. *Water* 13(23): 3402. <https://doi.org/10.3390/w13233402>

Visca A, Rauseo J, Spataro F, Patrolecco L, Grenni P, Massini G, Mazzurco Miritana V, Barra Caracciolo A (2022) Antibiotics and antibiotic resistance genes in anaerobic digesters and predicted concentrations in agroecosystems. *J. Environ. Manag.* 301: 113891. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113891>

Wang J, Wang S (2018) Microbial degradation of sulfamethoxazole in the environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102: 3573-3582. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8845-4>

Wang YZ, Zhao HM, Huang XP et al. (2025) Variety-dependent seed endophytic bacteria enhance stress tolerance to and bioaccumulation of ciprofloxacin in choy sum (*Brassica parachinensis*). *Microbiome* 13: 80. <https://doi.org/10.1186/s40168-025-02073-2>

WHO (2017) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23171en/s23171en.pdf>

WHO (2025) Global antibiotic resistance surveillance report 2025. WHO Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS). Geneva: World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240116337>

Woappi Y, Gabani P, Singh A, Singh OV (2016) Antibiotrophs: the complexity of antibiotic-subsisting and antibiotic-resistant microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 42(1): 17-30. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.875982>

von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PHM, Wolfs PFG (2016) Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.* 7: 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>

Wu X, Ernst F, Conkle JL, Gan J (2013) Comparative uptake and translocation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by common vegetables.

# Newsletter

2/2025

Aggiornamenti, eventi e novità sul  
tema della risorsa idrica a cura di  
**Luigi Campanella**

In un contesto sempre più segnato dagli effetti del cambiamento climatico e dalla necessità di garantire un uso equo, efficiente e sostenibile delle risorse idriche, l'acqua torna al centro dell'agenda politica, scientifica e tecnologica.

Questa edizione della nostra newsletter raccoglie alcune delle novità più rilevanti a livello nazionale ed europeo: iniziative strategiche, nuove norme, momenti di confronto e riflessione che tracciano un quadro dinamico e in evoluzione. Dalla *governance* oceanica internazionale alle politiche di adattamento climatico, dall'innovazione digitale alla preparazione di grandi eventi come il Forum Euromediterraneo del 2026, emerge con forza la consapevolezza che l'acqua non è solo una risorsa, ma una vera e propria infrastruttura di resilienza per il futuro

## Nuove Iniziative Europee per la Sostenibilità Marina

Durante la 33ª riunione del Management Board del JPI Oceans, tenutasi a Bruxelles il 26 e 27 marzo, sono state tracciate le prossime tappe strategiche per la cooperazione scientifica nel settore marino. In particolare, si stanno gettando le basi per il nuovo *Strategy Framework 2026–2030*, che verrà pubblicato entro fine anno.

Tra le decisioni principali figura l'approvazione di una nuova *Joint Call* dedicata al *Blue Carbon*, con un impegno iniziale di oltre 2,15 milioni di euro da parte di Irlanda, Norvegia e Malta. Anche Germania, Portogallo e Canada stanno valutando di aderire all'iniziativa, che punta a valorizzare le soluzioni basate sugli ecosistemi marini per combattere i cambiamenti climatici e aumentare la resilienza delle zone costiere.

Inoltre, è stata lanciata una *Joint Action* sull'*Offshore Freshened Groundwater*, risorsa di acqua dolce poco conosciuta situata sotto i fondali marini. È stata anche approvata la *governance* e la roadmap per la *Rapid Response Action* sull'*A-MOC* (*Atlantic Meridional Overturning Circulation*), sistema cruciale di correnti oceaniche che regola il clima globale.

Proseguono anche progetti già avviati come *Ocean Oxygen Loss*, che entra in una nuova fase con il sostegno di cinque Paesi, e *Ocean Carbon Capacities*, che ha ottenuto il via libera per una nuova struttura operativa.

Infine, il *Board* ha avviato una fase di raccolta proposte per future *Joint Actions*, mirando a un coinvolgimento sempre più attivo di Stati e comunità scientifiche.

<https://www.jpi-oceans.eu/en/decisions-made-priorities-set-jpi-oceans-propelling-forward>

## Cambia la Normativa sui i Criteri Ambientali Minimi e Acqua di Rete

Una recente modifica ha aggiornato i Criteri Ambientali Minimi (CAM) per i servizi di ristoro nelle pubbliche amministrazioni, promuovendo in modo più deciso l'utilizzo di acqua di rete al posto di bottiglie di plastica. Questa revisione normativa va nella direzione di una maggiore sostenibilità ambientale,

JPI  
OCEANS

# Newsletter

2/2025

riducendo la produzione di rifiuti e le emissioni legate alla logistica dell'acqua confezionata.

La nuova disciplina (decreto del Ministero dell'Ambiente e della Sicurezza Energetica del 9 aprile 2025) rappresenta un passo importante verso un modello di consumo più consapevole, incentivando anche il ricorso a soluzioni tecnologiche per la microfiltrazione e la distribuzione dell'acqua potabile negli uffici pubblici.

Maggiori informazioni sul sito Ambiente & Sicurezza: <https://www.ambientesicurezzaweb.it>.

## Acqua Summit 2025: dalla gestione emergenziale alla strategia di sistema

Durante l'Acqua Summit 2025, tenutosi a Milano il 19 giugno 2025 ed organizzato da Il Sole 24 Ore, è emersa con forza l'urgenza di un cambio di paradigma nella gestione delle risorse idriche. Le recenti crisi, tra siccità prolungate e alluvioni sempre più violente, hanno evidenziato i limiti di un approccio reattivo, basato sull'emergenza. Per questo, si è discusso della necessità di passare a una gestione preventiva e strutturata, fondata su pianificazione a lungo termine, investimenti mirati e collaborazione tra tutti i livelli istituzionali.

Al centro del dibattito, anche il potenziamento delle infrastrutture idriche, la riduzione delle perdite lungo le reti di distribuzione e l'adozione di tecnologie digitali per una gestione più efficiente. È stato inoltre sottolineato il grande potenziale ancora poco sfruttato del riutilizzo delle acque reflue, che in Italia è

fermo a livelli molto inferiori rispetto ad altri Paesi europei.

Infine, è stato ribadito che l'acqua non è solo una risorsa da tutelare, ma anche un elemento strategico per la resilienza climatica, la sicurezza energetica e lo sviluppo territoriale. Per affrontare le sfide future, serve una visione sistemica, integrata e condivisa, che metta al centro innovazione, prevenzione e cooperazione.



<https://24oreventi.ilsole24ore.com/acqua-summit-2025/>

## Roma 2026: Il Primo Forum Euromediterraneo dell'Acqua

L'Italia, e in particolare Roma, ospiterà nel mese di ottobre 2026 il primo Forum Euromediterraneo dell'Acqua, evento che per la prima volta coinvolgerà non solo i Paesi del Mediterraneo ma anche quelli dell'intera Europa e dei Balcani.

L'obiettivo del Forum sarà quello di affrontare in modo condiviso le grandi sfide legate alla gestione della risorsa idrica, dalla crisi climatica alla neces-



# Newsletter

2/2025

sità di infrastrutture moderne e soluzioni tecnologiche avanzate. Il Forum rappresenterà una piattaforma di dialogo tra decisori politici, imprese, società civile, esperti e mondo accademico.

A guidare l'iniziativa italiana è stato il Comitato "One Water", presieduto dall'on. Maria Spena, che ha sottolineato l'ampia mobilitazione del "Sistema Italia", dal Governo agli enti locali fino alle *multiutility* come ACEA. Il Comitato è composto anche da ANBI, Utilitalia e la Fondazione

Earth and Water Agenda (EWA).

Il percorso verso l'evento è già iniziato, con incontri e workshop che accompagneranno il cammino fino al Forum, anche attraverso momenti internazionali come la COP29.



**EUROMEDITERRANEAN  
WATER FORUM - 6MWF  
ROMA 2026**

<https://www.anbi.it/art/articoli/8158-nel-2026-il-primo-forum-euromediterraneo-dell-acqua>

## **Presentazione Volume “Siccità, scarsità e crisi idriche – Il contributo della ricerca a supporto della definizione del bilancio idrico**

*a cura di*

*Jessica Amadio, Domenica Mosca Angelucci,  
Emanuele Romano  
CNR-IRSA sede di Roma - Montelibretti*

Negli ultimi decenni, il territorio nazionale ha affrontato numerose crisi idriche che hanno spesso causato conseguenze rilevanti sui diversi settori di utilizzo dell'acqua. La siccità del 2022, che ha colpito in particolar modo il nord Italia, ha lasciato nell'immaginario collettivo un ricordo ancora vivo per l'eccezionalità del fenomeno rispetto ai dati storici e per la portata dei danni economici prodotta dalla crisi idrica che ne è conseguita. A differenza di altre calamità naturali, le crisi idriche in Italia non causano danni alle infrastrutture né mettono a rischio vite umane, ma hanno gravi conseguenze economiche e ambientali.

In questo contesto, è stato scritto il Volume “Siccità, scarsità e crisi idriche – Il contributo della ricerca a supporto della definizione del bilancio idrico”, primo numero della collana ‘Habitat-Signa - Studi e ricerche su sistema terra e ambiente’ del CNR (Immagine 1). Il Volume vuole dare un contributo tecnico-scientifico, partendo dallo ‘stato dell’arte’ e fornendo elementi concreti per migliorare la gestione delle risorse idriche in condizioni ordinarie e in occasione di eventi di siccità, riducendo al contempo gli impatti di natura ecologica e ambientale. L’opera, curata dal Gruppo di lavoro ‘Siccità, scarsità e crisi idriche’ coordinato dal CNR-IRSA, si basa sulle attività scientifiche condotte dagli Istituti CNR afferenti al Dipartimento scienze del sistema terra e tecnologie per l’ambiente dell’Ente (CNR-DSSSTA) e arricchito dai contributi dell’Istituto superiore per la protezione e la ricerca ambientale (ISPRA), della ‘Struttura di missione per il contrasto della scarsità idrica e per il potenziamento delle infrastrutture idriche’ e del Dipartimento della protezione civile (DPC) della Presidenza del Consiglio dei Ministri.

Il lavoro è suddiviso in 13 capitoli tematici (Immagine 2) che analizzano gli aspetti chiave della siccità e delle crisi idriche, dai fattori fisici, idrologici e ambientali agli utilizzi idrici e alla governance della risorsa, sia in condizioni ordinarie che di emergenza. Per ciascun capitolo è stata utilizzata una struttura comune, organizzata in sotto-capitoli: a) monitoraggio; b) regime pregresso e stato attuale; c) impatto del cambiamento climatico; d) strumenti modellistici di analisi e previsionali; e) le domande di ricerca.

Nel 2022, anno con le precipitazioni più basse mai registrate nel periodo



**Immagine 1.** Copertina del volume

# Eventi

2/2025

1951-2024, l'Italia ha visto una disponibilità di risorse idriche ridotte del 52% rispetto alla media di lungo termine, registrando un deficit particolarmente grave nei distretti idrografici del Po, delle Alpi Orientali, dell'Appennino settentrionale e dell'Appennino centrale (capitolo 1). Il cambiamento del regime termo-pluviometrico ha avuto un forte impatto sull'idrologia, riducendo il manto nevoso nelle Alpi facendo arretrare i ghiacciai (capitolo 5) e diminuendo l'umidità del suolo in aree come la Pianura Padana, la Sardegna e la Sicilia occidentale (capitolo 6).

A tali impatti di tipo quantitativo, occorre aggiungere gli impatti sulla qualità delle risorse idriche determinate da una riduzione delle risorse: aumento delle concentrazioni a causa della diminuzione dei volumi disponibili, variazioni dei carichi di nutrienti, mobilitazione di sedimenti e fosforo a seguito di eventi meteorici intensi (capitolo 7), aumento della salinità nelle

**Immagine 2.** Graphical abstract a cura di Matteo Tucci (CNR-IRSA) - <https://www.luminescentia.com>





zone di transizione (capitolo 9) e negli acquiferi costieri (capitolo 8).

La riduzione della disponibilità di acqua, specie in condizioni emergenziali, limita l'approvvigionamento idrico per uso civile, agricolo, industriale e turistico, riduce la produttività, soprattutto in agricoltura, e penalizza la produzione energetica (capitolo 2, 3, 11). A questi effetti si aggiungono le conseguenze, talvolta drammatiche, sugli ecosistemi acquatici e connessi (capitolo 12), oltre all'impatto sulla qualità del suolo, contribuendo al fenomeno della Land degradation (capitolo 13).

A complicare il monitoraggio delle risorse idriche, non solo i cambiamenti climatici che rendono i fenomeni naturali più imprevedibili e talvolta più estremi, ma ha un peso altrettanto importante anche l'attività umana che, tra derivazioni, invasi e prelievi, altera il flusso delle acque superficiali e sotterranee.

La situazione è aggravata dallo stato di obsolescenza (o inefficienza) delle infrastrutture idrauliche (nel settore civile il 25% ha più di 50 anni e il 60% oltre 30 anni), causando ingenti perdite d'acqua: in Italia, gli acquedotti civili disperdono circa il 50% dell'acqua, con punte fino al 60% nel Centro-Sud (capitolo 11). Nei capitoli 2, 4, 10 e 11 sono analizzate le possibili misure di adattamento in condizioni di emergenza e sul medio e lungo periodo: riduzione dei fabbisogni, riduzione dei consumi, riutilizzo per scopi irrigui delle acque reflue trattate, aumento della capacità di invaso superficiale, ricarica controllata degli acquiferi, strategie per la riduzione dei fabbisogni e dei consumi, caratterizzazione e sfruttamento nuovi acquiferi, inclusi quelli off-shore, interconnessioni tra diversi sistemi di approvvigionamento idrico, efficientamento sistemi di captazione e distribuzione.

*“È apparsa subito chiara ai componenti del gruppo di lavoro, la necessità di adottare un approccio olistico per inquadrare correttamente il fenomeno della siccità”, dichiara Emanuele Romano, ricercatore CNR-IRSA e coordinatore del GdL ‘Siccità, scarsità e crisi idriche’ del CNR-DSSTA.*

*“Inoltre, le competenze, le analisi e le proposte emerse, vanno inserite in un quadro più ampio di governance delle risorse idriche, tenendo conto non solo dello stato attuale della ricerca, ma anche dell'applicabilità delle soluzioni proposte in un orizzonte temporale di pochi anni, e non di decenni”.*

Una pianificazione chiara ed efficace degli interventi di adattamento necessita parallelamente un ripensamento dell'attuale assetto di governance dell'acqua. La gestione delle risorse idriche in Italia è infatti allo stato attuale caratterizzata da una significativa frammentazione delle competenze tra i settori civile, agricolo e industriale e da una mancanza di coordinamento tra le amministrazioni coinvolte nella gestione che determina una difficoltà complessiva a individuare soluzioni “di sistema”.

Presentato per la prima volta al pubblico lo scorso dicembre 2024, alla Fiera “Più Libri Più Liberi” a Roma, a due mesi dalla sua uscita, lo scorso febbraio 2025 presso la sede centrale del CNR si è tenuto l'evento di presentazione del Volume (Foto 1,2,3,4). Oltre 200 iscritti appartenenti a diverse istituzioni (MASE, esercito, Regioni e Province), Autorità di Bacino e ARPA, enti di ricerca e università, gestori e associazioni ambientaliste hanno partecipato alla presentazione del Volume e all'alternarsi di tre tavole rotonde sulle tematiche: 1. Impatti della siccità; 2. Caratterizzazione degli eventi siccitosi ai fini della gestione dell'emergenza e della pianificazione; e 3. Governance dell'acqua.

# Eventi

2/2025

**Foto 1.** Direttore del CNR-DSSTTA -  
Francesco Petracchini



**Foto 2.** Coordinatore del GdL  
'Siccità, scarsità e crisi idriche' -  
Emanuele Romano (CNR-IRSA)



**Foto 3.** Vice-coordinatore del GdL  
'Siccità, scarsità e crisi idriche' -  
Ivan Portoghesi (CNR-IRSA)



# Eventi

2/2025

**Link per scaricare online gratuitamente il Volume:**

[https://www.cnr.it/sites/default/files/public/media/attivita/editoria/SiccitaInterattivo\\_ver2.pdf](https://www.cnr.it/sites/default/files/public/media/attivita/editoria/SiccitaInterattivo_ver2.pdf)

**Per maggiori informazioni:**

<https://dta.cnr.it/gruppi-di-lavoro/siccita-e-crisi-idriche>

**Contatti:**

[gdl-siccita@cnr.it](mailto:gdl-siccita@cnr.it)



**Foto 4.** Ricercatrici e ricercatori del CNR-IRSA intervenuti all'evento di presentazione del volume presso la sede centrale del CNR a Roma



## Il Progetto AGRARSENSE – Ricerca e tecnologia per l'agricoltura sostenibile

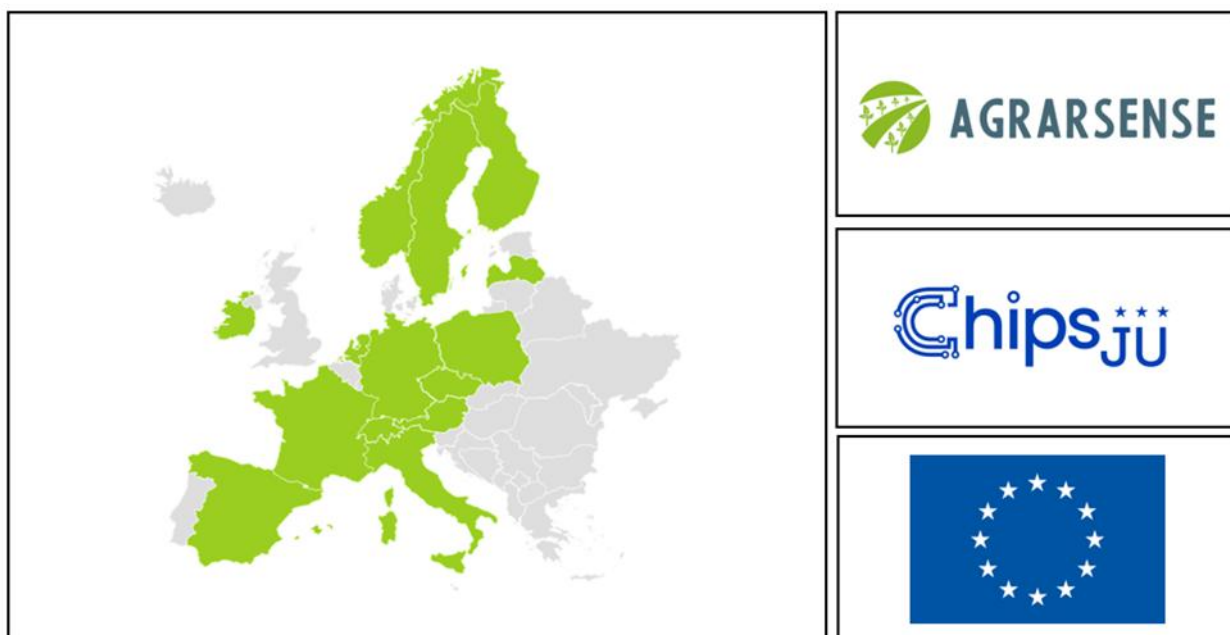
a cura di

*Anna Maria De Girolamo, Alfieri Pollice  
CNR-IRSA sede di Roma - Montelibretti  
Vito Buono, SYSMAN Progetti e Servizi srl, Bari*

Il 7 e 8 ottobre 2025 si è tenuto a Bari il Consortium Meeting del progetto **"AGRARSENSE—SMART, DIGITALIZED COMPONENTS AND SYSTEMS FOR DATA-BASED AGRICULTURE AND FORESTRY"**.

Il progetto è stato finanziato dal Programma di Ricerca e Innovazione Horizon Europe dell'Unione Europea e di Svezia, Repubblica Ceca, Finlandia, Irlanda, Italia, Lettonia, Paesi Bassi, Polonia, Spagna, Norvegia (2023-2025) (*KDT Joint Undertaking Grant Agreement 101095835*) [[info@agrarsense.eu](mailto:info@agrarsense.eu); [www.agrarsense.eu](http://www.agrarsense.eu)].

L'obiettivo principale del progetto AGRARSENSE è sviluppare nuove tecnologie basate su sensori, dispositivi IoT e di sistemi di supporto alle decisioni (DSS) da applicare al settore agricolo. Il progetto si articola in sette casi di studio: GREENHOUSE (UC1), VERTICAL FARMING (UC2), PRECISION VITICULTURE (UC3), AGRI-ROBOTICS (UC4), FORESTRY (UC5), OPTIMAL SOIL AND FERTILIZERS (UC6) e WATER (UC7) nei quali sono state testate le suddette tecnologie per migliorare la qualità e quantità del raccolto, ottimizzare i fattori della produzione attraverso la gestione "intelligente" dell'irrigazione e dei fertilizzanti/pesticidi, ridurre l'impatto sull'ambiente e sull'ecosistema per la salvaguardia delle risorse naturali.



# Progetti

2/2025

Il Consorzio AGRARSENSE, che comprende 57 partner, enti di ricerca (16), grandi aziende (16) e piccole e medie imprese (25), si è riunito a Bari per presentare i risultati delle tecnologie sviluppate nel corso dei tre anni di progetto (sensori e componentistica elettronica, box per racchiudere i componenti, interconnessione dei sistemi hardware, sviluppo software, DSS) e i test delle soluzioni proposte. Gli organizzatori del *meeting* sono stati due partner italiani CNR-IRSA e SYSMAN Progetti e Servizi srl.

Il *meeting* si è concluso con una visita tecnica presso "O.P. Giuliano S.r.l.", una rinomata azienda ortofrutticola dotata di moderne tecnologie per la produzione, controllo, stoccaggio e confezionamento dei prodotti che vengono commercializzati sul mercato nazionale ed internazionale. La visita tecnica è stata finalizzata allo scambio di conoscenze relative alla filiera del settore ortofrutticolo per favorire lo sviluppo di nuove tecnologie in grado di garantire la sicurezza alimentare e di minimizzare l'impatto ambientale.

AGRARSENSE contribuirà al raggiungimento degli obiettivi del Green Deal europeo che, con la strategia "Farm to Fork", mira ad incentivare un sistema di produzione alimentare sostenibile. AGRARSENSE contribuirà, inoltre, al conseguimento degli obiettivi della Politica Agricola Comune (PAC) quali: l'aumento della competitività, il contrasto al cambiamento climatico, la salvaguardia dell'ambiente, la conservazione del paesaggio e della biodiversità, la protezione della qualità del cibo e della salute e la promozione della conoscenza e dell'innovazione. L'aumento della popolazione mondiale e la crescente domanda di cibo richiedono un aumento della produzione agricola e, al contempo, un miglioramento dei sistemi di distribuzione per garantire la sicurezza alimentare.

L'agricoltura intensiva può avere impatti significativi sugli ecosistemi quali il degrado del suolo (i.e. erosione, impoverimento di nutrienti, salinizzazione) e depauperamento delle risorse idriche. La ricerca, la tecnologia e



# Progetti

2/2025

l'innovazione giocano un ruolo fondamentale per ottimizzare la produzione agricola, migliorare la sostenibilità e ridurre l'impatto ambientale. Negli ultimi anni, tecnologie come l'*Internet of Things* (IoT), intelligenza artificiale, robotica e l'accessibilità a tecnologie digitali hanno generato nuove opportunità di business, contribuendo a rendere l'agricoltura intelligente (o digitale) un mercato in rapida espansione.





## ProPla: trasformare la plastica in risorsa - Un progetto sostenuto da Fondazione Cariplo – Bando Economia Circolare 2021

a cura di

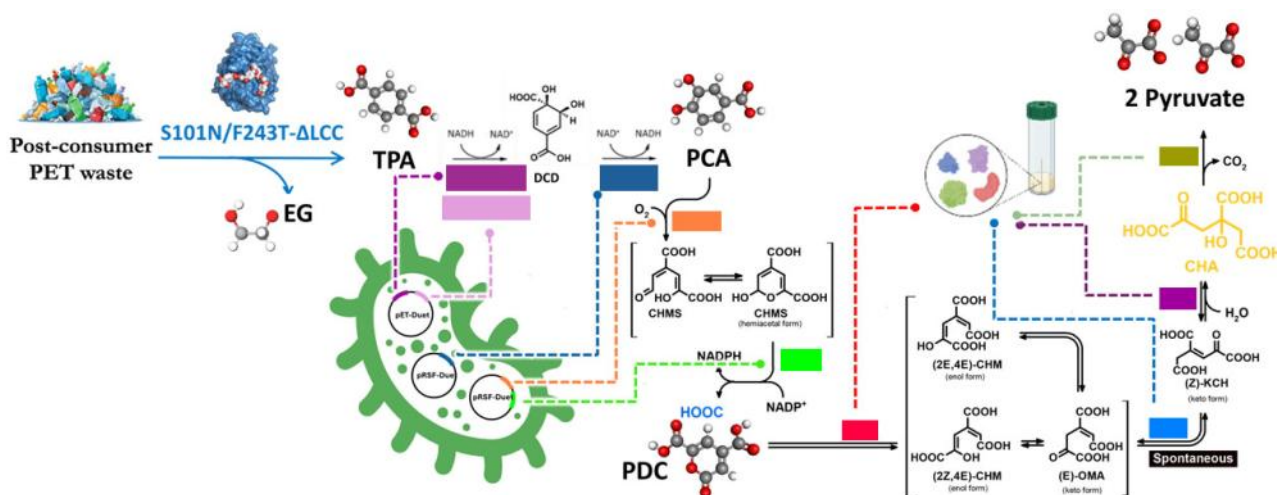
Silvia Galafassi, CNR-IRSA sede di Verbania

La plastica è un materiale straordinario, ma la sua dispersione nell'ambiente è diventata un problema globale. Le microplastiche – frammenti spesso invisibili a occhio nudo – sono ormai presenti nei fiumi, nei mari e perfino nel nostro sangue e nei polmoni. Affrontare questa emergenza significa ripensare i cicli produttivi e trovare soluzioni innovative per ridurre l'impatto di questi inquinanti.

Con questo obiettivo è nato “ProPla – Proteins from Plastics”, un progetto di ricerca finanziato da Fondazione Cariplo nell'ambito del bando Economia Circolare – Ricerca per un futuro sostenibile (edizione 2021). Coordinato dal Prof. Loredano Pollegioni dell'Università degli Studi dell'Insubria, con la collaborazione dell'Università di Milano, dell'Università di Milano Bicocca e del CNR-IRSA, il progetto ha una durata triennale e terminerà nell'aprile 2026.

### Gli obiettivi del progetto

ProPla non ha un solo traguardo, ma una serie di obiettivi che si completano a vicenda. Il primo passo è stato quello di intercettare una fonte di microPET – frammenti di bottiglie e tessuti sintetici – recuperandoli da reflui e acque di lavanderia. Una plastica che, senza questo intervento, sarebbe finita direttamente nell'ambiente. A partire da questo materiale, il proget-



to sviluppa due strategie innovative. Grazie all'ingegneria proteica e alla *systems biology*, ceppi di *Escherichia coli* sono stati modificati per degradare il PET e trasformarlo in amminoacidi, come la L-alanina, molecole preziose per l'industria alimentare, cosmetica e farmaceutica. Ma il progetto non si ferma qui e mette in atto un ulteriore approccio innovativo: le larve della mosca soldato (*Black Soldier Fly*), già impiegate per riciclare scarti organici, vengono arricchite con i batteri ingegnerizzati, trasformandosi così in vere e proprie biofabbriche capaci di accumulare proteine, lipidi e chitina a partire dal microPET.

### *I progressi raggiunti*

A pochi mesi dalla conclusione, ProPla ha conseguito risultati scientifici importanti. Uno dei primi traguardi è stato proprio l'individuazione delle fonti di microPET più significative, in particolare nei reflui di impianti di depurazione e nelle acque di lavanderia. Su questi materiali sono stati sviluppati protocolli innovativi di separazione basati su trattamenti fisico-chimici ed enzimatici, capaci di isolare le microplastiche di PET e renderle disponibili per le fasi successive del progetto. Parallelamente, undici enzimi ricombinanti sono stati assemblati con successo in *E. coli*, dimostrando in scala di laboratorio la possibilità di convertire rifiuti di PET in L-alanina con buone rese. Anche sul fronte entomologico si registrano progressi significativi: sono in corso i test per stabilizzare la colonizzazione dell'intestino delle larve di mosca soldato nera con i batteri modificati, un passo decisivo per dimostrare come la degradazione del PET possa avvenire direttamente all'interno degli insetti. A completare questo quadro, analisi ambientali ed economiche stanno valutando l'impatto complessivo del processo e le opportunità di trasferimento industriale.

ProPla dimostra che la ricerca può offrire soluzioni concrete a problemi globali: le microplastiche non sono più un rifiuto senza via d'uscita, ma l'inizio di una nuova catena del valore. Ciò che oggi inquina fiumi e mari, domani potrà diventare materia prima per i settori delle bioplastiche, cosmetica ed alimentare. È un segnale forte di come scienza, innovazione e responsabilità ambientale possano convergere verso un futuro più pulito e sostenibile.

## **WINCA4TI - Water Interactions with Nature, Climate and Agriculture for Ticino**

L'idea progettuale nasce da risultati ed evidenze di progetti precedenti (POR FESR PITAGORA, Interreg SIMILE, Interreg CE Maurice), per migliorare, completare e sviluppare ulteriori soluzioni sia da un punto di vista tecnologico che di tutela delle risorse naturali, in particolare della risorsa idrica e della biodiversità e dei servizi ecosistemici ad esse correlati.

Il filo conduttore è la risorsa idrica, espressa e rappresentata dal fiume Ticino, dai laghi Maggiore e Lugano e dalla rete dei canali di irrigazione sottesi. L'acqua non ha confini, la sua tutela e la sua gestione devono essere condivise e adottate sull'intero territorio transfrontaliero. Una gestione sostenibile della risorsa idrica a tutela dell'ambiente non può quindi prescindere dalla conoscenza delle interazioni esistenti tra le diverse componenti del sistema e dal coinvolgimento degli stakeholders che agiscono sul territorio.

Il partenariato è formato dal Capofila italiano, rappresentato dal Consorzio di Bonifica Est Ticino Villorese, da un capofila svizzero, rappresentato dalla Scuola Universitaria Professionale della Svizzera italiana - Istituto di Scienze della Terra - Dipartimento Ambiente, Costruzione e design, e dai partner italiani Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca sulle Acque (CNR-IRSA), Sede di Verbania e Università degli Studi di Pavia - Dipartimento di Ingegneria Civile e Architettura e dal partner svizzero Cantone Ticino - Dipartimento del Territorio e Divisione dell'Ambiente - Ufficio della Protezione delle Acque e dell'Approvvigionamento Idrico.

Sono inoltre partner associati al progetto WINCA4TI la Fondazione Bolle di Magadino (CH) e la Fondazione Patrimonio Cà Granda (I).

La complessità del territorio di progetto, sia in termini ambientali che socioeconomici, richiede un approccio multidisciplinare e integrato così come quello messo a disposizione dal partenariato. Inoltre, la complessità e la numerosità di interconnessioni presenti tra acqua, ambiente, natura,

**Interreg**



**Cofinanziato  
dall'Unione Europea**



**Italia – Svizzera | Italie – Suisse | Italien – Schweiz**

**WINCA4TI**





Boa limnologica



agricoltura e attività umane richiedono un approccio partecipato e un pensiero sistemico in grado di cogliere tutti gli elementi presenti, le loro risposte a diverse pressioni e gli effetti dovuti a diverse strategie.

Sia sul Lago Maggiore che sul Lago di Lugano si svolgeranno attività di raccolta dati chimico-fisici attraverso l'utilizzo di boe limnologiche realizzate con il precedente progetto Interreg SIMILE e che qui saranno ulteriormente sviluppate e standardizzate. Le analisi meteo-climatiche coinvolgeranno l'intero bacino imbrifero del Lago Maggiore, che comprende anche il Lago di Lugano, e daranno informazioni sull'evoluzione climatica dell'in-

tero bacino e saranno propedeutiche per tutte le successive attività. La tutela della biodiversità e degli ecosistemi sarà affrontata sia in territorio svizzero che in quello italiano attraverso il coinvolgimento dei partner associati, la Fondazione Bolle di Magadino e la Fondazione Patrimonio Ca' Granda. Le attività riguarderanno soluzioni basate sulla natura con sperimentazione in campo dell'efficacia dell'Agroforestry. Le attività che si svolgeranno all'interno del comprensorio del Consorzio di Bonifica Est Villoresi, legate soprattutto all'efficientamento dell'irrigazione, contribuiranno alla gestione sostenibile della risorsa idrica e potranno essere di modello per l'applicazione ad altre aree simili. Le attività del progetto WINCA4TI sono iniziate a gennaio 2025 e proseguiranno fino al 30

giugno 2027.

Tra gli obiettivi che si vogliono raggiungere c'è quello di individuare possibili rischi, opportunità e sfide per il territorio transnazionale del bacino idrologico del Ticino in tema di politiche gestionali e rinnovamento tecnologico.

I risultati del progetto saranno fondamentali per poter creare un forum partecipato, dove tutti gli stakeholder del territorio avranno modo di restare informati e portare il proprio contributo per uno sviluppo sostenibile del territorio transfrontaliero verso la realizzazione di una Water-Smart Society secondo le indicazioni dell'EU Blue Deal.

Il progetto svilupperà delle strategie condivise, finalizzate a poter essere adottate su tutto il territorio a scala transfrontaliera, per una governance e una gestione/utilizzo efficiente della risorsa idrica del bacino del Ticino, resilienti ai cambiamenti climatici e alla tutela del capitale naturale e della biodiversità.

Il CNR IRSA, grazie alle sue competenze e alla sua esperienza sulle analisi

# Progetti

2/2025

meteo-climatiche, svilupperà un approfondimento sull'evoluzione climatica dell'intero bacino, nonché sulla definizione del bilancio idrologico, ad oggi non completo, ma elemento base per la quantificazione della risorsa idrica disponibile. Grazie alle attività decennali di studi sulla qualità ecologica delle acque del Lago Maggiore, porterà la sua esperienza nella valutazione ed interpretazione delle risposte biologiche ai cambiamenti climatici e all'uso della risorsa. Inoltre, precedenti esperienze nella realizzazione di sistemi di acquisizione dati (centraline idro-meteorologiche e boe limnologiche) costituiscono una base consolidata da cui partire per la messa a sistema e l'implementazione di strumentazione e tecnologie aperte, flessibili ed efficaci.

Questo progetto è entrato a fare parte delle "Storie della Rete Scientifica", uno spazio che il CNR dedica alla condivisione delle best practices e delle storie di successo. Sul sito web del CNR al seguente link:

## Info sul progetto

<https://etvilloresi.it/attivita/progetti/progetto-winca4ti/>

<https://www.interreg-italiasvizzera.eu/wps/portal/site/interreg-italia-svizzera/DettaglioRedazionale/progetti/progetti-finanziati/winca4ti>

<https://cnrsc.sharepoint.com/sites/USRG/SitePages/STORIE-DALLA-RETE-SCIENTIFICA.aspx>

si può trovare l'intervista di Alessandra Megna a Marzia Ciampittiello - Istituto di Ricerca sulle Acque (IRSA), Dipartimento Scienze del sistema terra e tecnologie per l'ambiente, inerente il Progetto WINCA4TI - Interreg VI-A Italia - Svizzera 2021-2027.

Kick off meeting del 21 marzo 2025



## Partecipazione del CNR-IRSA a DIDACTA Italia per la promozione del progetto BLU DIGITALE

a cura di

Jessica Amadio, Barbara Casentini, Francesca di Pippo  
CNR-IRSA sede di Roma - Montelibretti;  
Magda Di Leo  
CNR-IRSA sede di Taranto

**Immagine 1.** Locandina delle Fasi della metodologia innovativa di formazione proposta dal CNR-IRSA

Lo scorso marzo 2025 nella cornice della Fortezza da Basso (Firenze), il CNR-IRSA ha partecipato a DIDACTA Italia, spin off di DIDACTA International, la fiera più importante sulla formazione e l'innovazione del mondo della scuola.



All'interno dello stand del Consiglio Nazionale delle Ricerche, le ricercatrici appartenenti al gruppo di divulgazione e comunicazione dell'IRSA hanno presentato per la prima volta ad un pubblico prevalentemente dedicato al mondo dell'istruzione, il progetto Blu Digitale.

Finanziato nell'ambito del Fondo per la Repubblica Digitale - bando "Polaris - Iniziative innovative per l'orientamento e la formazione di studenti e studentesse in ambito STEM", Blu Digitale è dedicato a sostenere progetti rivolti alla formazione e all'orientamento di studenti. Il progetto nasce per sostenere un accrescimento delle conoscenze e competenze STEM e favorire un approccio costruttivo, aperto e consapevole nella scelta dei percorsi formativi e professionali futuri.

Nello specifico, Blu Digitale ha come obiettivo principale quello di coinvolgere attivamente 400 studenti iscritti al 3-4-5 anno di Scuole Secondarie di Secondo grado della città di Taranto in un percorso di orientamento formativo territorializzato con il fine di promuoverne la sperimentazione delle conoscenze e capacità in organizzazioni dell'economia sociale e della formazione

operanti nei settori della blue economy, economia digitale e ricerca scientifica.

La metodologia innovativa di formazione per far conoscere e apprendere le discipline STEM applicate all'acqua, prevede un percorso di training



# Eventi

2/2025

Le fasi sono le seguenti: (I) Approfondimento teorico dell'argomento, (II) Attività di campo (uscite in barca in diversi siti di campionamento, (III) Analisi in laboratorio (presso le scuole), (IV) Elaborazione e comprensione dati, (V) Disseminazione e divulgazione scientifica ad un evento finale. Blu Digitale si svolgerà nell'arco di 18 mesi e verrà portato avanti da un partenariato di 8 enti fra scuole, ricerca, volontariato e mondo aziendale. Alcuni dei temi suggeriti rientrano nelle seguenti aree di ricerca: Gestione risorse idriche; Biodiversità; Bioremediation; Economia Circolare; Inquinanti emergenti (incluse le microplastiche).

A DIDACTA Italia, le ricercatrici del CNR-IRSA (Immagine 2) hanno avuto la possibilità di presentare ai docenti delle scuole secondarie provenienti da tutta Italia l'innovazione della metodologia per far conoscere le discipline STEM applicate all'acqua. I docenti incontrati hanno mostrato un forte interesse e hanno accolto con entusiasmo l'approccio proposto, riconoscendone l'innovatività e la rilevanza rispetto alle metodologie didattiche tradizionali. La possibilità di integrare approfondimenti teorici, attività pratiche sul campo, analisi scientifiche e momenti di divulgazione ha suscitato un concreto interesse per l'attivazione di collaborazioni, sia nell'ambito

dei Percorsi per le Competenze Trasversali e l'Orientamento (PCTO), sia attraverso la co-progettazione di iniziative e progetti didattici.



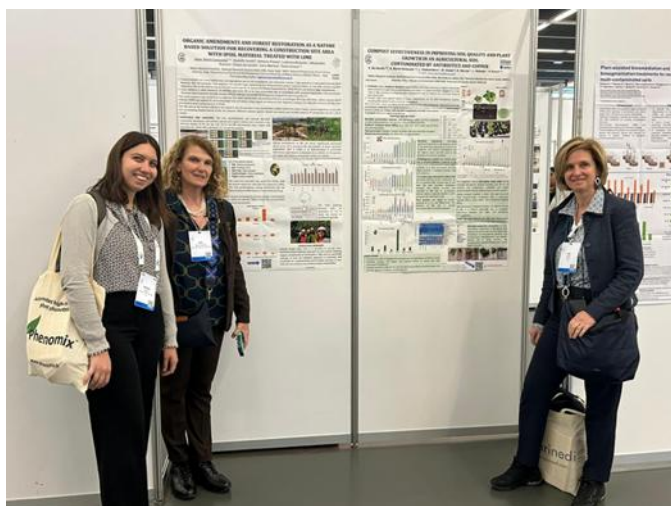
Immagine 2. Delegate CNR-

IRSA a DIDACTA Italia: Magda Di Leo, Barbara Casentini, Jessica Amadio, Francesca Di Pippo

## CNR-IRSA attore protagonista a eventi nazionali e internazionali

a cura del **GdL Comunicazione e Divulgazione,**  
**Area Comunicazione**

**Foto 1.** Delegazione CNR-IRSA alla *SETAC Europe 35th Annual Meeting*



Nel 2025 i ricercatori del CNR-IRSA hanno partecipato a diversi Congressi e Conferenze nazionali ed internazionali. In alcuni eventi in particolare la partecipazione è risultata consistente.

La conferenza **SETAC Europe 35th Annual Meeting**, (<https://www.setac.org>) tenutasi a Vienna tra l'11 e il 15 maggio scorsi, è stata animata da molti contributi, orali e poster, di ricercatrici e ricercatori del CNR-IRSA, che nel corso della conferenza hanno anche moderato diverse sessioni. Oltre a tematiche più specialistiche, sono stati affrontati anche temi d'interesse generale, tra questi: contaminazione da PFAS (Sostanze Per- e Poli-FluoroAlchiliche) e microplastiche, antibiotico resistenza, fragranze sintetiche e nuovi approcci alla valutazione del rischio ambientale. L'IRSA ha anche un ruolo attivo all'interno della *SETAC Italian Language Branch*, che si è riunita a Vienna per lanciare l'incontro nazionale che si terrà a Napoli tra il 13 e il 14 ottobre 2025 all'università Federico II.

Maggiori informazioni:  
<https://italianbranch.setac.org/>



**Foto 2.** Delegazione CNR-IRSA alla *IWA Resource Recovery Conference*

Corposa anche la partecipazione anche alla VI edizione della **IWA Resource Recovery Conference** (<https://www.wetsus.nl/iwa-rr-2025>) dal titolo "*From Novel Concepts to Business*", organizzata da **Wetsus** (<https://www.wetsus.nl>) in collaborazione con la *Delft University of Technology* e *Wageningen University & Research*, che si è tenuta dal 19 al 23 maggio 2025 a Leeuwarden (Paesi Bassi). Le ricercatrici e i ricercatori del CNR-IRSA hanno partecipato attivamente all'evento con diversi contributi, portando un ampio ventaglio di temi e confermando l'impegno dell'Istituto nel campo del recupero delle risorse.

L'Istituto ha contribuito attivamente anche alla IX **European Bioremediation Conference (EBC-IX)** (<https://www.ebc-ix.tuc.gr/en/home>) svoltasi a Chania (Creta, Grecia) dal 15 al 19 giugno 2025, co-organizzata dalla *Technical University of Crete* e dall'Università di Bologna con molteplici presentazioni nel settore del bioris-





**Foto 3.** Delegazione CNR-IRSA alla *European Bioremediation Conference*

sanamento, delle biotecnologie ambientali e della valorizzazione sostenibile delle risorse, anche in questo caso diverse sessioni sono state moderate dal CNR-IRSA.

A livello nazionale particolarmente nutrita la partecipazione al **XXIX Congresso AIOL** (Associazione Italiana di Oceanologia e Limnologia; <https://aiol.info/xxix-congresso-aiol-aps-ets>) tenutosi nella splendida cornice della Mole Vanvitelliana di Ancona tra il 3 e il 6 giugno 2025. L'AIOL ha sede alla sezione di Verbania del CNR-IRSA e da tempo ricercatrici e ricercatori dell'Istituto impegnati nel Consiglio Direttivo e nell'organizzazione di eventi legate all'Associazione. Al Congresso sono stati presentati

diversi contributi di carattere sia ecologico sia eco-tossicologico. Tra i temi trattati ricordiamo idrologia ed ecologia dei laghi, inclusi aspetti legati al popolamento ittico, monitoraggio ad alta frequenza, contaminazione da microplastiche, antibiotico resistenza.

Il CNR-IRSA ha anche partecipato con una folta delegazione alla **Conferenza annuale del CNR DSSTTA** (Dipartimento Scienze del Sistema Terra e Tecnologie per l'Ambiente, <https://dta.cnr.it/project/conferenza-dipartimento-25>) tenutasi ad Ancona (29-30 maggio 2025). Oltre al direttore Giuseppe Mascolo, diversi ricercatori hanno animato l'evento con interventi tecnici e talk. I temi affrontati dalla conferenza sono stati molteplici, tra i quali ambiente e salute, rischi, biodiversità e transizione ecologica, research security, intelligenza artificiale, infrastrutture di ricerca, cooperazione internazionale, fondi europei per la ricerca. Al termine della prima giornata di lavori la delegazione CNR-IRSA ha avuto la possibilità di visitare una delle infrastrutture di ricerca più importanti del CNR DSSTTA: la nave oceanografica Gaia Blu attraccata nel porto di Ancona a poche centinaia di metri dalla sede della conferenza.

**Foto 4.** Delegazione CNR-IRSA alla conferenza annuale del CNR DSSTTA



Il 3 e il 4 luglio il CNR-IRSA ha partecipato ad un incontro a Roma nella sede CNR di piazzale Aldo Moro durante il quale è stata sancita la nascita della **Joint Research Unit eLTER-IT** che traghetterà la rete LTER Italia all'interno della infrastruttura di ricerca europea eLTER RI, composta da centinaia di siti di ricerca ecologica a lungo termine in tutta Europa. Il CNR-IRSA era presente con una folta delegazione composta da rappresentanti di siti di ricerca lacustri e marini. <https://www.cnr.it/it/news/13670/avvio-della-joint-research-unit-di-elter-it>



## Attività dell'Area Seminari del CNR-IRSA

Dal 2020 il CNR IRSA, tramite il Gruppo di Lavoro Seminari, ha promosso la condivisione delle attività di ricerca e il dibattito scientifico organizzando incontri online aperti a tutta la comunità scientifica e non solo. Dal 2023, oltre alla modalità telematica, gli incontri si svolgono anche in presenza, coinvolgendo un pubblico ampio composto da ricercatori, personale in formazione, colleghi di enti pubblici di ricerca (EPR), università, agenzie ambientali, PMI e professionisti.

Le informazioni sui seminari in programma, i link per la registrazione e per la richiesta degli attestati di partecipazione sono disponibili ai seguenti indirizzi:

[https://www.irsa.cnr.it/wp/?page\\_id=387](https://www.irsa.cnr.it/wp/?page_id=387)

Home - eventi IRSA-CNR (Indico)

Le registrazioni degli eventi già svolti sono accessibili sulla piattaforma Tube@CNR:

<https://tube.rsi.cnr.it/a/irsa>

Attualmente l'Area Seminari è coordinata da Carolina Cruz Viggi e composta da Raffaella Balestrini, Simona Crognale, Claudia Dresti, Diego Fontaneto, Marcella Narracci e Pompilio Vergine.

Ad oggi, nella prima metà del 2025, sono stati organizzati 7 seminari e 3 eventi di divulgazione di rilievo.

I seminari organizzati hanno coperto diversi temi di rilievo nel campo della sostenibilità ambientale e delle tecnologie innovative. Un filone importante ha riguardato la conservazione e la gestione delle specie ittiche nelle acque dolci e marine, con approfondimenti dedicati ai progetti di tutela dello storione, della trota, del luccio, dell'agone e dell'anguilla europea. In questo ambito sono state affrontate sia le strategie di conservazione sia le problematiche legate alla gestione delle popolazioni ittiche. Un altro ambito di grande interesse è stato quello delle tecnologie per la produzione di energie rinnovabili, con un seminario dedicato alle *Microbial Electrochemical Technologies* per la produzione di idrogeno e metano. Inoltre, sono state presentate nuove strategie sostenibili per la rimozione di contaminanti emergenti tramite processi di fotocatalisi.

Il 7 febbraio 2025 il CNR-IRSA ha organizzato l'evento "Stories of Wetlands – Episode 1" in occasione della **Giornata Mondiale delle Zone Umide**. L'iniziativa ha offerto una visione multidisciplinare sul valore ecologico delle zone umide e ha promosso un dialogo tra ricercatori, esperti e operatori del settore, sottolineando l'importanza di proteggere questi ecosistemi per un futuro sostenibile.



# News

2/2025

In occasione della **Giornata Internazionale delle Donne e delle Ragazze nella Scienza**, il 14 febbraio 2025 il CNR-IRSA ha organizzato l'evento *"Svelare le Carriere STEM: Microbiologia e Ingegneria insieme per un Approccio Sostenibile alla Depurazione delle Acque"*. Le ricercatrici Maria Concetta Tomei e Simona Rossetti hanno condiviso le loro esperienze professionali, mettendo in luce il contributo femminile nel campo del trattamento delle acque. L'incontro, seguito da oltre 12 classi di scuole superiori da tutta Italia, si è concluso con una vivace sessione di confronto e ispirazione per le giovani partecipanti.



Infine, in occasione della **Giornata Mondiale dell'Acqua**, il 26 marzo 2025 l'IRSA ha organizzato l'evento *"Save Our Glaciers"*, dedicato al tema della conservazione dei ghiacciai. L'incontro ha evidenziato l'urgenza di proteggere queste riserve d'acqua minacciate dai cambiamenti climatici, richiamando l'attenzione sull'importanza dell'acqua dolce e sull'impegno necessario per garantire un futuro sostenibile per tutti.

Per proporre un seminario, un evento e per qualsiasi altra informazione, scrivere a:

[gdl\\_seminari@irsa.cnr.it](mailto:gdl_seminari@irsa.cnr.it)





Tutti i contenuti della Rivista sono liberamente accessibili, nei termini della licenza **Creative Commons** Attribuzione - Non commerciale - Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale (CC BY-NC-SA 4.0)  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



## 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, S.P. 35d, km 0,700

✉ C.P. 10 - 00015 Monterotondo (RM)

e-mail: [redazione.notiziario@irsa.cnr.it](mailto:redazione.notiziario@irsa.cnr.it)

### **Direttore responsabile**

Giuseppe Mascolo

### **Direttore Scientifico**

Paola Grenni

### **Comitato di Redazione**

L. Campanella, M. Ciampittiello, C. Cruz Viggi, A.M. De Girolamo, P. Grenni, L. Guzzella,  
B. Matturro, D. Mosca Angelucci, I. Parlapiano, S. Polesello, S. Valsecchi.

### **Segreteria di Redazione**

S. Ghergo

**<https://www.irsa.cnr.it/Notiziario>**