



Juncus spp è una specie vegetale nota per le naturali capacità depurative delle acque contaminate.

Contaminanti emergenti e resistenza agli antibiotici

Impiego di Nature-Based Solutions (NBS) per un riutilizzo sicuro e sostenibile di acque reflue civili

Il riuso delle acque reflue depurate per l'irrigazione delle colture agricole è attualmente considerata una soluzione estremamente vantaggiosa e auspicabile a causa della scarsità d'acqua. Tuttavia, l'accumulo di antibiotici, ARB e ARGs nelle acque trattate e nei suoli è un problema emergente a causa del trattamento inefficace operato degli impianti di depurazione convenzionali. In questo contesto, per migliorare la qualità delle acque potrebbe essere utile l'impiego di soluzioni naturali ed ecosostenibili (Nature-Based Solutions). Nello studio pilota presentato, si dimostra come le Constructed Wetlands rappresentano soluzioni efficaci e a basso costo per il trattamento delle acque reflue, non solo per la rimozione dei contaminanti noti, ma anche per l'abbattimento della Resistenza Antimicrobica.

****Annamaria Gentile**
*** Paolo Piccolo**
*** Patrizia Iannece**
****Angela Cicatelli**
**** Stefano Castiglione**
**** Francesco Guarino**

1. Introduzione

Attualmente, la scarsità d'acqua rappresenta un'importante problematica da affrontare in tutto il mondo (Garcia & Pargament, 2015). Le attività industriali, l'agricoltura e la crescita demografica esponenziale stanno determinando una forte pressione sulle risorse idriche locali, compromettendone la qualità e la disponibilità e aumentando la necessità dell'impiego di soluzioni sostenibili per il trattamento delle acque reflue, nella prospettiva di un loro riutilizzo sicuro (Pereira *et al.*, 2002) (Sowers *et al.*, 2011) (Meyer *et al.*, 1999). Oggigiorno le acque reflue sono caratterizzate non solo dalla presenza di inquinanti ben noti (sostanze organiche, composti azotati, cloruri ecc.) ma anche da composti quali pesticidi, farmaci e prodotti per la cura del corpo, comunemente utilizzati dall'uomo, in agricoltura e per l'allevamento. Queste sostanze sono chiamate Contaminanti Emergenti (CECs, *Contaminants of Emerging Concern*) e le loro

concentrazioni nelle acque di scarico e nei corpi idrici superficiali variano da ng L^{-1} a Qg L^{-1} . Essi comprendono un gruppo di inquinanti che sta richiamando una crescente attenzione negli ultimi anni a causa dei loro potenziali effetti negativi sull'ambiente e sulla salute umana (Snyder *et al.*, 2003); i CECs sono considerati emergenti poiché la loro presenza nell'ambiente è stata riconosciuta solo di recente, non sono regolamentati e i loro potenziali impatti sono ancora in fase di studio. Questi inquinanti possono diffondersi nell'ambiente in vari modi, in particolare a partire dagli scarichi delle acque reflue a causa della loro incompleta rimozione da parte degli impianti di depurazione convenzionali (Daughton & Ternes, 1999) (Larsson *et al.*, 2007).

Tra i CECs, gli antibiotici sono attualmente i farmaci più uti-

lizzati. La loro presenza nell'acqua trattata e la loro diffusione nell'ambiente causa l'insorgenza della cosiddetta resistenza agli antibiotici o resistenza antimicrobica (AMR, *Antimicrobial Resistance*), una minaccia globale per la salute pubblica che si verifica quando i microrganismi diventano resistenti all'attività di un farmaco antimicrobico, rendendo le infezioni più difficili da trattare, comportando il trasferimento dei geni di resistenza ad altre popolazioni microbiche e aumentando così il rischio di mortalità e l'incremento dei costi sanitari. L'uso diffuso e l'abuso di antibiotici nella medicina umana/veterinaria stanno accelerando la comparsa e la diffusione dell'AMR. Pertanto, alcune strategie per affrontare le sfide dei CECs e dell'AMR prevedono un uso responsabile degli antibiotici, l'informazione della popolazione in merito ai rischi

associati al loro uso irresponsabile, nonché il miglioramento dei processi di trattamento delle acque reflue (Pruden *et al.*, 2013). In questo contesto, una possibile soluzione su base naturale (NBS, *Nature-Based Solution*) per la rimozione dei CECs e dell'AMR dalle acque reflue è rappresentata dall'impiego delle cosiddette *Constructed Wetlands* (CWs) ovvero aree umide artificiali (Chen *et al.*, 2019). Le CWs si basano sulla riproduzione artificiale delle naturali capacità di depurazione delle acque ad opera di specie vegetali e microbiche comunemente presenti in ambienti naturali come stagni, corsi d'acqua a lenta circolazione, torbiere ecc. (Wang *et al.*, 2022). Quando l'acqua scorre, le particelle in sospensione e i sedimenti si depositano e la materia organica è decomposta dai microrganismi come batteri e funghi. Le piante



Foto di Global Water Partnership - a water secure..

Un moderno impianto di depurazione. Oggi le acque reflue sono caratterizzate non solo dalla presenza di inquinanti ben noti (sostanze organiche, composti azotati, cloruri ecc.), ma anche da composti quali pesticidi, farmaci e prodotti per la cura del corpo.



Foto di James Gaither

Arundo donax.

Esemplari della pianta sono stati piantumati nel substrato multistratificato predisposto per la realizzazione delle CWs (aree umide artificiali).



Foto di Forest and Kim Starr

Nerium oleander.

Nel test svolto e presentato in questo articolo, tre piante per ogni specie per metro quadrato sono state messe a dimora in ciascun letto.

e la biodiversità a esse associata favoriscono la rimozione dei nutrienti in eccesso come azoto e fosforo, ma anche dei CECs attraverso il loro assorbimento e assimilazione; allo stesso tempo creano particolari condizioni ambientali che permettono lo sviluppo della diversità microbica, contribuendo notevolmente alla depurazione delle acque contaminate. I complessi apparati radicali delle piante, così come l'uso, nei nostri sistemi artificiali, costruiti ad hoc, di supporti a elevata superficie specifica, denominati *carrier*, permettono la formazione di un'ampia gamma di habitat utili allo sviluppo di biofilm microbici in grado di rimuovere efficacemente gli inquinanti (Spiniello *et al.*, 2023).

Pertanto le CWs rappresentano una soluzione ecosostenibile

per la rimozione dei contaminanti, compresi quelli di interesse emergente, attraverso diversi meccanismi: 1) la filtrazione e l'adsorbimento delle particelle in sospensione e degli inquinanti sulle superfici del substrato e sulle radici delle specie vegetali; 2) la degradazione, da parte delle comunità microbiche, dei composti organici in forme più semplici e biodisponibili alla vegetazione (Scholz & Lee, 2005). Inoltre si ritiene che le CWs possano essere efficienti sistemi utili alla mitigazione dell'AMR attraverso: 1) l'interazione tra le comunità microbiche delle zone umide e i batteri resistenti; 2) la presenza di barriere fisiche rappresentate dalla vegetazione e dal substrato (Liu *et al.*, 2019). In questo contesto due CWs, costituite da due differenti configurazioni idrauliche, sono sta-

te progettate e utilizzate come metodo ecosostenibile per la rimozione dei principali contaminanti ambientali da acque reflue civili, al fine di assicurarne il riutilizzo nel rispetto dei limiti normativi italiani imposti dal D.M. 185/03. Inoltre è stata saggiata la loro capacità nel ridurre le concentrazioni dei CECs, quali antibiotici, batteri e geni antibiotico resistenti (ARB/ARGs), come previsto dal rapporto ISTISAN 21/03 redatto dall'Istituto Superiore di Sanità (Giardina *et al.*, 2003) per ridurre e/o eliminare i rischi sanitari e ambientali associati alla diffusione dell'AMR. Infine, allo scopo di riutilizzare l'acqua depurata dalle CWs, in aggiunta a un trattamento con radiazione ultravioletta (UV ray) gli effluenti sono stati utilizzati per irrigare plantule di lattuga al fine di verificare l'eventuale tra-

sferimento di ARB e ARGs alla rizosfera delle colture o alla loro parte edule (foglie).

2. Materiali e metodi

2.1. Caratterizzazione chimico-fisica delle acque

Il presente studio ha previsto l'impiego di acque reflue civili provenienti da un impianto di depurazione sito nella provincia di Avellino (IT). Tali acque sono state raccolte dopo il trattamento primario (sedimentazione) e poi sottoposte a una caratterizzazione chimico-fisica prima e dopo il loro ricircolo nelle CWS da noi realizzate. Diversi sono stati i parametri stimati come: 1) le concentrazioni di COD, Cl⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺ e N totale sono state stimate attraverso il sistema di cuvette HACH e l'impiego dello spettrofotometro HACH DR3900 (Milano, Italia); 2) le concentrazioni dei metalli e dei metalli pesanti (Al, Mg, Ca, Si ecc.) sono state determinate mediante ICP-OES (Optima 7000DV, PerkinElmer Italia Spa - 20126, Milano, Italia) e sono state utilizzate apposite soluzioni standard per produrre una curva di taratura al fine di convertire le letture dell'emissione ottica nelle concentrazioni dell'analita; 3) la presenza di antibiotici è stata determinata con il sistema 7 T Solarix XR FT-ICR-MS (Bruker Daltonics, Brema, Germania) dotato di una sorgente di ionizzazione elettro spray (ESI); l'acquisizione dei dati è stata effettuata utilizzando il software ftmsControl 2.2.0 (Bruker) e l'elaborazione dei dati grezzi è stata eseguita mediante il software DataAnalysis 4.2 (Bruker).

2.2. Caratterizzazione microbiologica delle acque

La contaminazione delle acque in entrata e in uscita dalle CWS è stata studiata anche dal punto di vista microbiologico: a tale scopo è stato stimato il nume-

ro delle unità formanti colonie (CFU mL⁻¹) relativo a Enterococchi (Et), *E. coli* (*Ec*) e ai batteri totali (BT).

I BT sono stati stimati per diluizione seriale da 10⁻¹ a 10⁻⁴ nei campioni di acque; di tali diluizioni 100 QI sono stati diffusi su terreno di coltura Plant Count Agar (PCA) e successivamente incubati a 30°C per 48 h. Le CFU sono state stimate per visualizzazione e conteggio delle colonie ogni 24 h.

Il numero di CFU mL⁻¹ relativo agli Et è stato stimato diffondendo 100 QI dei campioni di acque sul terreno di coltura di tipo Slanetz Bartley, contenen-

te triptasi, lievito (come fonte di aminoacidi e vitamine del gruppo B), caseina, glucosio (come fonte di energia), azide di sodio (che inibisce la crescita dei batteri Gram-negativi e degli stafilococchi) e Triphenyl Tetrazolium Chlorid (TTC) quale indicatore redox. Le piastre sono state incubate a 37°C per 48 h e le CFU sono state conteggiate ogni 24 h. Tutte le colonie con il tipico colore rosso o bruno-rossastro sono state considerate come Et.

Per quanto riguarda gli *Ec*, il numero di CFU mL⁻¹ è stato stimato utilizzando un terreno di coltura di tipo TBX: terreno selettivo e

TECNO-LIO
L'energia della Vita

LAVORAZIONI C/TERZI
Integratori alimentari
in capsule, liquidi e liofilizzati

Si eseguono produzioni di piccoli e medi lotti

- Integratori in capsule formato 0 in barattolo o in blister
- Integratori liquidi in monodose da 10 e 15 ml
- Integratori con contagocce
- Liquidi e soluzioni in flaconi fino a 1000 ml
- Liofilizzazione in monodose con sigillatura sottovuoto
- Integratori di nostra produzione con possibilità di personalizzazione
- Lavorazione materie prime fornite dal cliente
- Confezionamento finale
- Assistenza per formulazioni personalizzate

Tecno-lio S.r.l.
Via Riviera Berica, 260 - 36100 Vicenza
Tel. 0444530465 - fax. 0444532275
E-mail: info@tecno-lio.it
Website: www.tecno-lio.it

cromogeno utilizzato per l'isolamento e l'identificazione di *Ec*, le cui colonie appaiono di colore blu o blu/verde. Anche in questo caso le piastre sono state incubate a 37°C per 48 h e le CFU sono state conteggiate ogni 24 h.

2.3. Nature-Based Solutions per il trattamento delle acque reflue

Al fine di confrontare l'efficienza di trattamento di due differenti configurazioni impiantistiche, sono state progettate e realizzate, a scala pilota, due CWs. In particolare, le configurazioni adottate prevedevano da un lato un sistema a flusso idrico verticale (*Vertical Constructed Wetland* - VCW) e dall'altro un sistema ibrido in cui un flusso verticale e uno sub-sommerso orizzontale sono stati combinati in serie (*Hybrid Constructed Wetland* - HCW, Brevetto Italiano 102020000005737) (Spiniello *et al.*, 2023).

Le vasche, impiegate per la realizzazione dei suddetti impianti, variano dai 12 L ai 20 L di volume e sono state riempite da materiali eterogenei quali: pietrisco, sabbia e *carrier*.

Quattro differenti specie vegetali (*Arundo donax* L., *Arundo plinii* Turra, *Nerium oleander* L., *Juncus spp.*), note per le loro naturali capacità depurative delle acque contaminate, sono state piantumate nel substrato multi-stratificato da noi predisposto per la realizzazione delle CWs. In particolare, tre piante per ogni specie per metro quadrato sono state messe a dimora in ciascun letto (Spiniello *et al.*, 2023).

2.4. Trattamento UV

Un'aliquota degli effluenti delle CWs (15 L di acqua trattata) è stata sottoposta a radiazione UV. Gli effluenti sono stati poi raccolti in un serbatoio di alluminio sul cui fondo è stata fis-

sata una lampada UV da 11 Watt di potenza. L'acqua, tenuta in agitazione, è stata esposta alla radiazione UV per 15 min e, successivamente, conservata in sterilità.

2.5. Riutilizzo delle acque trattate

Gli effluenti ottenuti dopo i trattamenti nei due impianti pilota (VCW e HCW) e la loro rispettiva aliquota, ulteriormente trattata con radiazione UV (VCW+UV e HCW+UV), sono stati utilizzati per l'irrigazione delle piantine di lattuga secondo il seguente schema sperimentale:

- 24 piantine irrigate con acqua potabile (CNT);
- 24 piantine irrigate con l'effluente VCW;
- 24 piantine irrigate con l'effluente HCW;
- 24 piantine irrigate con l'effluente VCW+UV;
- 24 piantine irrigate con l'effluente HCW+UV.

Le piantine di lattuga sono state coltivate in condizioni controllate (fitotrone) a 24°C con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. In particolare, le lattughe sono state irrigate ripetutamente con 10-15 mL degli effluenti per circa un mese. Dopodiché le radici e le parti eduli (foglie) sono state raccolte separatamente.

2.6. Resistenza Antimicrobica (AMR)

2.6.1. Batteri Antibiotico Resistenti (ARB)

Al fine di verificare la presenza e la quantità di Batteri Antibiotico Resistenti (ARB) nelle acque reflue trattate e non, nelle foglie di lattuga e nella rizosfera delle piantine irrigate con gli effluenti, nonché la concentrazione minima inibitoria (MIC) all'Ampicillina, Tetraciclina, Eritromicina e Vancomicina, sono state utilizzate le strip *M.I.C. Evaluator* (Oxoid, ThermoFisher, Milano, Italia). Tali strip sono state deposte

sui terreni di coltura pre-inoculati (PCA, Slanetz Bartley e TBX) così da generare un gradiente di concentrazione dell'antibiotico (0,015-256 Qg mL⁻¹) definito nell'area intorno alla strip. I livelli di inoculo sono stati appositamente preparati confrontando la torbidità del campione con lo standard McFarland del valore di 0,5.

Nel caso della ricerca di batteri endofiti delle foglie di lattuga, da ciascuna tesi sperimentale sono stati raccolti e sterilizzati 10 g di foglie, le quali sono state sterilizzate mediante l'utilizzo di una soluzione di ipoclorito di sodio all'1,3% e poste in agitazione a 200 rpm (rotazioni per minuto) per 5 min a temperatura ambiente. La soluzione di ipoclorito è stata sostituita con una soluzione di etanolo al 70% e infine le foglie di lattuga ormai sterili sono state risciacquate con acqua distillata sterile. Il risciacquo è stato ripetuto per tre volte al fine di assicurare un lavaggio accurato da ipoclorito ed etanolo. L'efficienza di questa tecnica di sterilizzazione è stata valutata ponendo la superficie delle foglie sterilizzate su piastre contenenti PCA, le quali, dopo incubazione a 30°C per 24 h, non presentavano crescita alcuna di colonie batteriche. Successivamente, le foglie sono state triturate in condizioni axeniche (cappa a flusso laminare) utilizzando bisturi sterili, raccolte e incubate per un'ora in una soluzione nutritizia (acqua peptonata) a temperatura ambiente.

Nel caso della ricerca di ARB rizosferici delle piantine di lattuga, le radici (2,5 g) e le particelle di suolo a esse aderenti (suolo rizosferico) sono state prelevate e collocate in tubi contenenti 25 mL di soluzione fisiologica sterile (0,9% NaCl); i tubi sono stati posti in agitazione a 250 rpm per 30 min a temperatura ambiente, al fine di rilasciare nella

soluzione salina una parte importante di ARB rizadosferici. Le soluzioni sono state trasferite in nuovi tubi sterili e centrifugati per 5 min a 600 rpm a temperatura ambiente per favorire la sedimentazione delle particelle di suolo in eccesso. I surnatanti sono stati trasferiti in nuovi tubi posti a centrifugare a 3.000 rpm per 30 min a temperatura ambiente. I *pellet* batterici sedimentati sul fondo dei tubi sono stati sottoposti a due lavaggi con soluzione fisiologica sterile e infine risospesi in 3,0 mL della medesima soluzione. Infine le concentrazioni cellulari dei batteri sono state stimate valutandone la densità ottica a 600 nm (OD600).

Le piastre sulle quali i batteri sono stati distribuiti per spatolamento, sono state poi poste a incubare per 48 ore a 37°C. Trascorso tale periodo di incubazione, è stata valutata la formazione della zona di inibizione delle strip antibiotiche. Normalmente, se la crescita tocca la strip i batteri risultano resistenti alla concentrazione di intersezione; se la crescita è presente lungo l'intera lunghezza della strip non vi è alcuna zona di inibizione e la concentrazione minima inibitoria è superiore al valore di concentrazione maggiore dell'antibiotico rilasciato dalla strip; se la crescita non è presente lungo la strip vi è una vasta zona di inibizione e la concentrazione minima inibitoria osservata è inferiore al valore minore di concentrazione antibiotica rilasciata dalla strip.

2.6.2. Geni Antibiotico Resistenti (ARGs)

Al fine di verificare la presenza e la quantità di ARGs nelle acque reflue trattate e non, nelle foglie e nella rizosfera delle piantine di lattuga, irrigate con gli effluenti trattati e non con raggi UV, si è proceduto all'estrazione del DNA dal *pel-*

let batterico precedentemente raccolto, all'amplificazione dei geni che conferiscono la resistenza ai quattro antibiotici indagati e, infine, alla loro quantificazione.

2.6.2.1. Estrazione del DNA

Per i campioni d'acqua reflua e trattata, 450 mL sono stati filtrati su membrane in polycarbonato, con una dimensione dei pori di 0,22 μ m e un diametro di 47 mm (GE Healthcare, Milano, Italia). Le membrane sono state poste in tubi da 15 mL contenenti 10 mL di soluzione salina (0,9% NaCl), posti in agitazione per 10 min a temperatura ambiente così da garantire il rilascio dei microrganismi in soluzione. I filtri sono poi stati rimossi e i tubi sono stati centrifugati per 10 min a 14.000 rpm. Il *pellet* sedimentato è stato risospeso in 180 μ L di tampone d'estrazione (ATL) e il DNA è stato purificato utilizzando il kit *DNeasy® Blood & Tissue* (Qiagen; Milano, Italia) a partire da 10^9 cellule, stimate leggendo allo spettrofotometro la densità ottica della soluzione a 600 nm (OD600). Lo stesso kit di estrazione del DNA è stato impiegato sia per i batteri endofiti delle foglie che per quelli rizadosferici.

2.6.2.2. PCR qualitativa e quantitativa

Specifici primer (Tabella 1), noti in letteratura, sono stati impiegati per la determinazione dei ARGs indagati tramite PCR qualitativa e quantitativa nei campioni suddetti.

Le reazioni di PCR qualitativa sono state eseguite in un volume di reazione di 25 μ L contenente 10 ng di DNA e 0,5 U di Taq polimerasi (AmpliQ DNA polimerasi, Fisher Scientific, Italia).

I parametri del ciclo di amplificazione della PCR sono stati i seguenti: 5 min di denaturazione iniziale a 94°C, seguiti da 35

cicli a 94°C per 60 s, 60°C per 60 s e 72°C per 60 s. L'estensione finale è stata programmata a 72°C per 7 min. I prodotti della PCR sono stati sono stati mantenuti a 4°C fino al loro uso e, infine, separati per elettroforesi su gel di agarosio all'1,2%.

Le reazioni di PCR quantitativa sono state eseguite impiegando l'iQ5 e l'iQ SYBR Green Super Mix (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia). Per ogni campione è stata eseguita una reazione in triplicato e un controllo negativo è stato utilizzato per verificare la presenza di falsi positivi e/o contaminazioni. I parametri dei cicli di reazione sono stati i seguenti: una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 3 min seguita da 45 cicli, con un ciclo di denaturazione a 95°C per 15 s, e infine 60°C per 30 s. La raccolta e l'analisi dei dati sono state effettuate utilizzando il software iQ5 2.0. Per quantificare il numero di copie di ARGs indagati, sono state realizzate delle curve di calibrazione utilizzando il numero di copie del 16S rDNA come standard correlato alla concentrazione del DNA genomico di *Ec* nota in letteratura (4.600 Kbp) (Blattner *et al.*, 1997) (Grenier *et al.*, 2014), attraverso la preparazione di appropriate diluizioni. Ciò ha permesso di confrontare i risultati ottenuti dalla qPCR con i valori standard del gene target per risalire all'effettivo numero di copie di ARGs presenti nei campioni analizzati.

Gene target	Primer	Sequenza	T (°C)	bp
16S rDNA	16S rDNA F	GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA	60	146
	16S rDNA R	ACGTCRTCCMACCTTCTCC		
ermA	ermA F	AAGGGTAAAACCCCTCTAG	60	247
	ermA R	TCAAAGCCTGTGCAATTGG		
ampC	ampC F	TCTATCAAMACTGGCARCC	54	550
	ampC R	CCYTTTTATGTACCCAYGA		
vanA	vanA F	ATCGGCAAGACAATATGACAGC	62	240
	vanA R	AGCCTGATTGGTCCACTC		
tetW	tetW F	GAGAGCCTGTATATGCCAGC	60	168
	tetW R	GGGCGTATCCACAATGTTAAC		

Tabella 1: Sequenze dei primer e condizioni di reazione.

2.7. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando i pacchetti *car*, *pgirmess*, *rcompanion* e *ggplot2* disponibili in RStudio. Sono state saggiate la normalità, l'omogeneità e la linearità dei dati al fine di individuare il test statistico più adatto per valutare variazioni significative. In particolare, è stata valutata la varianza per ranghi Kruskal-Wallis seguita dal test post-hoc di Nemenyi.

3. Risultati e discussioni

3.1. Caratterizzazione chimico-fisica delle acque

I due campioni di acque reflue, raccolte in date differenti nell'impianto di Avellino dopo il trattamento primario, sono state fatte ricircolare nei due impianti pilota per 48 h e sono state eseguite successivamente le principali analisi chimico-fisiche dei reflui trattati e non (Tabelle 2-3). Nel caso dell'esperimento effettuato nella configurazione

verticale (VCW) (Tabella 2), le concentrazioni finali dei contaminanti sono risultate conformi ai limiti per il riuso delle acque reflue trattate definiti dal D.M. 185/03, a eccezione dell'azoto totale. L'ammonio è diminuito significativamente, il nitrato è leggermente aumentato al termine del trattamento e, pertanto, la concentrazione finale dell'azoto totale non risulta ancora conforme ai limiti normativi. I valori relativi ai cloruri, così come quelli dei metalli pesanti, sono inferiori ai limiti per il riutilizzo. Una riduzione statisticamente significativa è stata osservata solo nel caso del COD. Anche per ciò che concerne l'esperimento di depurazione dei reflui contaminati, condotto nell'impianto ibrido (HCW), sono state stimate (Tabella 3) le caratteristiche chimico-fisiche delle acque trattate e non. In questo caso, tutti i parametri considerati sono conformi

ai limiti per il riutilizzo di tali acque con una riduzione statisticamente significativa per COD, ammonio e azoto totale. Per i metalli pesanti, le concentrazioni iniziali erano già al di sotto dei limiti normativi e il trattamento ha contribuito a ridurre ulteriormente. Le concentrazioni relative agli antibiotici, invece, non sono state rilevate in quanto inferiori ai limiti di rilevabilità strumentale.

Entrambe le configurazioni (VCW e HCW) sono risultate efficienti per ottenere acqua di buona qualità in un tempo di trattamento molto limitato (48 h). Tra le due configurazioni di impianto, quello ibrido (HCW) ha mostrato una migliore efficienza nella rimozione dei contaminanti, in special modo dell'azoto totale.

Infatti tale configurazione combina due differenti flussi idraulici (orizzontale e verticale) sfruttando i loro rispettivi vantaggi: l'azoto è rimosso in seguito ai processi di nitrificazione in condizioni aerobiche e poi denitrificato nelle condizioni anossiche (Vymazal, 2010). Nella configurazione a flusso verticale, al contrario, il processo di nitrificazione procede in modo efficiente ma, a causa di condizioni aerobiche, non si verifica la denitrificazione del refluo (Arias *et al.*, 2005).

3.2. Caratterizzazione microbiologica delle acque

Nelle acque è stato stimato anche il numero di unità formanti colonie (CFU mL⁻¹) relativo a: Et, Ec e BT. Le analisi microbiologiche hanno mostrato una loro riduzione negli effluenti rispetto alle acque in ingresso per entrambi i casi (VCW e HCW - Tabelle 4 e Tabella 5, rispettivamente). Nel caso dell'esperimento condotto nell'impianto VCW, il numero di CFU mL⁻¹ è stato ridotto di un ordine di grandezza per Et e BT, mentre le

Tabella 2: Concentrazioni iniziali e finali (3 deviazioni standard) relative al primo esperimento condotto nella configurazione verticale (VCW). * Differenze statisticamente significative (Kruskal-Wallis test, p < 0,05)

	Concentrazioni iniziali (mg L ⁻¹)	Concentrazioni finali (mg L ⁻¹)	Limiti normativi (D.M. 185/03)
Cloruri	211 ± 14,8	203 ± 14,2	250
Nitrati	11,3 ± 0,8	11,1 ± 0,8	/
Ammonio	58,9 ± 4,1	0*	2
COD	236 ± 16,4	33,2 ± 2,3*	100
N totale	73,4 ± 5,1	62,1 ± 4,3	15
Alluminio	0,026 ± 0,002	0,026 ± 0,002	1
Boro	0,134 ± 0,010	0,134 ± 0,010	1
Cadmio	0,0020 ± 0,0001	0,0010 ± 0,0001	0,005
Cobalto	0,020 ± 0,001	0,0020 ± 0,0001	0,05
Cromo	0,010 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,1
Ferro	0,025 ± 0,002	0,0060 ± 0,0004	2
Manganese	0,017 ± 0,001	0,0010 ± 0,0001	0,2
Nickel	0,443 ± 0,031	0,032 ± 0,002	0,2
Piombo	0,0030 ± 0,0002	0,0030 ± 0,0002	0,1
Rame	0,048 ± 0,003	0,041 ± 0,003	1
Zinco	0,50 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,5
SAR	8	6	10
Antibiotici	< LOD	< LOD	/

Tabella 3: Concentrazioni iniziali e finali (3 deviazioni standard) relative al primo esperimento condotto nella configurazione ibrida (HCW). * Differenze statisticamente significative (Kruskal-Wallis test, p < 0,05)

	Concentrazioni iniziali (mg L ⁻¹)	Concentrazioni finali (mg L ⁻¹)	Limiti normativi (D.M. 185/03)
Nitrati	16,3 ± 1,2	15,2 ± 1,2	/
Ammonio	53,5 ± 3,7	0*	2
COD	265 ± 18,5	62,5 ± 4,4*	100
N totale	72,10 ± 5,05	11 ± 0,8*	15
Alluminio	0,031 ± 0,002	0,014 ± 0,001	1
Boro	0,103 ± 0,010	0,075 ± 0,005	1
Cadmio	0,0010 ± 0,0001	0,0010 ± 0,0001	0,005
Cobalto	0,0080 ± 0,0005	0,0020 ± 0,0001	0,05
Cromo	0,0020 ± 0,0001	0,0010 ± 0,0001	0,1
Ferro	0,026 ± 0,002	0,015 ± 0,001	2
Manganese	0,0060 ± 0,0004	0,0010 ± 0,0001	0,2
Nickel	0,227 ± 0,010	0,029 ± 0,002	0,2
Piombo	0,0040 ± 0,0003	0,0030 ± 0,0002	0,1
Rame	0,020 ± 0,001	0,019 ± 0,001	1
Zinco	0,40 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,5
SAR	8	6	10
Antibiotici	< LOD	< LOD	/

colonie di *Ec* non erano più presenti. Inoltre non è stata osservata la presenza di batteri dopo trattamento con radiazione UV (Tabella 4).

La configurazione *HCW* è risultata più efficiente anche in questo caso (Tabella 5), infatti, gli Et sono stati ridotti di circa tre ordini di grandezza, mentre i BT di due. Come nel caso del trattamento mediante l'impianto *VCW*, le colonie di *Ec* non erano più presenti e il trattamento UV ha permesso un'eliminazione completa di tutti i batteri.

In entrambi i casi (*VCW* o *HCW*) sono stati rispettati i limiti normativi microbiologici per il riutilizzo delle acque in agricoltura in termini di CFU mL⁻¹ per *Ec* (500 CFU mL⁻¹).

La letteratura scientifica descrive diversi meccanismi alla base dei processi di disinfezione ad opera delle *CWs*. Essi includono: processi fisici di filtrazione e sedimentazione, adsorbimento ad opera del substrato, produzione di agenti antibiotici da

parte delle piante utilizzate per la realizzazione del *CWs* (Gerberg et al., 1987) (Karim et al., 2004) (Boutillier et al., 2009) (Vymazal, 2005). Nel nostro caso, l'uso di differenti specie vegetali potrebbe aver contribuito a migliorare le prestazioni antimicrobiche: infatti, sia il mezzo filtrante che la biodiversità vegetale rivestono un'importanza significativa attribuibile alla variazione tra condizioni aerobiche e anaerobiche, con un conseguente stress per i microrganismi che non sono adattati a differenti livelli di ossigeno (Brix, 1994). Inoltre l'uso della configurazione *HCW* ha sfruttato le capacità di disinfezione anche grazie al flusso idraulico combinato.

3.3. Resistenza Antimicrobica (AMR)

3.3.1. Batteri Antibiotico Resistenti (ARB)

La quantità di colonie resistenti agli antibiotici da noi impiegati nella sperimentazione, formate-

	Pretrattamento (t0)		Post trattamento VCW		Post trattamento UV	
	CFU mL ⁻¹		CFU mL ⁻¹		CFU mL ⁻¹	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Enterococchi	100	120	20	38	0	0
<i>E. coli</i>	50	60	0	0	0	0
Totale	15000	18000	5680	5780	0	0

Tabella 4: Conta batterica prima e dopo i trattamenti nell'impianto *VCW* (24/48 h: tempo di incubazione).

	Pretrattamento (t0)		Post trattamento HCW		Post trattamento UV	
	CFU mL ⁻¹		CFU mL ⁻¹		CFU mL ⁻¹	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Enterococchi	196000	210000	550	670	0	0
<i>E. coli</i>	240	60250	0	0	0	0
Totale	300000	340000	3380	3780	0	0

Tabella 5: Conta batterica prima e dopo i trattamenti nell'impianto *HCW* (24/48 h: tempo di incubazione).

si intorno alle strip, è stata visivamente interpretata dopo 24 h di incubazione delle piastre Petri a 37°C.

La Tabella 6 mostra che le CFU di Et resistenti ai quattro antibiotici sono state completamente rimosse dopo il trattamento nell'impianto *VCW*. In particolare, l'acqua in entrata era caratterizzata dalla presenza di Et resistenti all'ampicillina nell'intervallo 0,015-64 ng QL¹. Inoltre, poche colonie hanno mostrato una leggera resistenza alla tetraciclina (sino a 0,015 ng QL⁻¹) e

	Concentrazioni antibiotici (ng µL ⁻¹)	Pretrattamento (t0)				Post trattamento VCW			
		Ampicillina	Tetraciclina	Eritromicina	Vancomicina	Ampicillina	Tetraciclina	Eritromicina	Vancomicina
Enterococchi	0,015	+++	+	+	++	-	-	-	-
	0,03	+++	-	+	++	-	-	-	-
	0,06	+++	-	+	++	-	-	-	-
	0,12	+++	-	-	++	-	-	-	-
	0,25	+++	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	+++	-	-	-	-	-	-	-
	1	+++	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	+	-	-	-	-	-
	4	-	-	+	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	+	-	-	-	-	-	-	-
	64	+	-	-	-	-	-	-	-
	128	-	-	+	-	-	-	-	-
256	-	-	+	+	-	-	-	-	
<i>E. coli</i>	0,015	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	-	-	-	-	-	-	-	-
	64	-	-	-	-	-	-	-	-
	128	-	-	-	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabella 6: Interpretazione qualitativa del numero di ARB prima e dopo il trattamento nell'impianto *VCW* (+++ presenza elevata; ++ presenza moderata; + bassa presenza; - assenza).

sino a 256 ng QL⁻¹ per l'eritromicina. Una presenza medio-bassa di Et è stata riscontrata nell'intervallo 0,015-0,120 ng QL⁻¹ di vancomicina, e tra queste solo poche CFU erano resistenti a 256 ng QL⁻¹. Nel caso di *Ec*, nessuna colonia è risultata resistente a questi antibiotici. La tabella mostra, inoltre, che dopo 48 h di trattamento non erano più rilevabili colonie di ARB.

Nel caso dell'esperimento condotto nell'impianto *HCW*, le analisi microbiologiche hanno dimostrato una presenza elevata di Et resistenti all'ampicillina, tetraciclina ed eritromicina nell'acqua in entrata, mentre non è stata rilevata alcuna resistenza alla vancomicina (Tab. 7). In particolare, è stata osservata la presenza di Et resistenti all'ampicillina nell'intervallo di concentrazione 0,015-8,0 ng QL⁻¹, mentre una limitata presenza è stata rilevata sino a 256 ng QL⁻¹. Risultati simili sono stati ottenuti anche nel caso della tetraciclina; infatti, è stata ri-

scontrata un'elevata presenza di Et nell'intervallo 0,015-0,5 ng QL⁻¹, mentre una bassa presenza è stata osservata sino a 128 ng QL⁻¹. È stata rilevata, inoltre, un'elevata presenza di Et resistenti all'eritromicina a concentrazioni comprese tra 0,015 e 256 ng QL⁻¹.

Nel caso di *Ec*, poche colonie sono risultate resistenti all'ampicillina (sino a 32 ng QL⁻¹), alla tetraciclina (sino a 8,0 ng QL⁻¹) o all'eritromicina (sino a 1,0 ng QL⁻¹). Tuttavia, nel caso di *Ec* nessuna colonia resistente agli antibiotici è stata osservata dopo il trattamento. D'altra parte, sebbene una notevole riduzione degli Et resistenti all'ampicillina, alla tetraciclina e all'eritromicina sia stata osservata dopo il trattamento del refluo, una presenza medio-bassa, nel caso dell'ampicillina, è stata ancora rilevata nelle concentrazioni comprese tra 0,015 e 0,25 ng QL⁻¹, e bassa tra 0,5 e 2,0 ng QL⁻¹. Anche nel caso della tetraciclina è stata osser-

vata una presenza medio-bassa nell'intervallo di concentrazione di 0,015-0,3 ng QL⁻¹ e bassa tra 0,06 e 0,5 ng QL⁻¹. Il trattamento con *HCW* è stato più efficace nel caso di Et resistenti all'eritromicina: infatti, è stata rilevata una bassa presenza fino a 2,0 ng QL⁻¹.

Anche se dal punto di vista chimico non è stata rilevata la presenza di antibiotici post trattamento, gli studi microbiologici hanno mostrato l'abbondanza di ARB nelle acque in ingresso e la loro significativa riduzione negli effluenti come riportato anche da Santos *et al.* (Santos *et al.*, 2019). Anche se entrambe le configurazioni sono risultate efficaci nella riduzione degli ARB, la configurazione *VCW* sembra essere più efficiente rispetto alla *HCW*, che ha mostrato, alla fine del trattamento, la presenza di alcune CFU resistenti ad ampicillina e tetraciclina, probabilmente perché, in quest'ultimo caso, gli ARB erano più abbondanti nel campione d'acqua in

Tabella 7: Interpretazione qualitativa del numero di ARB prima e dopo il trattamento nell'impianto *HCW* (+++ presenza elevata; ++ presenza moderata; + bassa presenza; - assenza).

	Concentrazioni antibiotici (ng µL ⁻¹)	Pretrattamento (t0)				Post trattamento <i>HCW</i>			
		Ampicillina	Tetraciclina	Eritromicina	Vancomicina	Ampicillina	Tetraciclina	Eritromicina	Vancomicina
Enterococchi	0,015	+++	+++	+++	-	++	++	+	-
	0,03	+++	+++	+++	-	++	++	-	-
	0,06	+++	+++	+++	-	++	+	-	-
	0,12	+++	+++	+++	-	++	+	+	-
	0,25	+++	+++	+++	-	++	+	+++	-
	0,5	+++	+++	+++	-	+	+	-	-
	1	+++	+	+++	-	+	-	-	-
	2	+++	+	+++	-	+	-	+	-
	4	+++	+	+++	-	-	-	-	-
	8	+++	+	+++	-	-	-	-	-
	16	+	+	+++	-	-	-	-	-
	32	+	+	+++	-	-	-	-	-
	64	+	-	+++	-	-	-	-	-
	128	+	+	+++	-	-	-	-	-
256	+	-	+++	-	-	-	-	-	
<i>E. coli</i>	0,015	+	+	-	-	-	-	-	-
	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,06	-	+	-	-	-	-	-	-
	0,12	-	+	+	-	-	-	-	-
	0,25	+	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	+	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	+	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	+	-	-	-	-	-	-
	16	+	-	-	-	-	-	-	-
	32	+	-	-	-	-	-	-	-
	64	-	-	-	-	-	-	-	-
	128	-	-	-	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-	-	-	-	

ingresso rispetto a quello utilizzato per l'esperimento nella configurazione VCW.

3.3.2. Geni Antibiotico Resistenti (ARGs)

La reazione di qPCR per la quantificazione del numero di copie dei geni resistenti ai quattro antibiotici studiati (*ampC*, *tetW*, *ermA* e *vanA*) ha mostrato una riduzione statisticamente significativa (fino al 99%) del numero di copie di ARGs dopo il trattamento nell'impianto VCW per tutti i geni oggetto di indagine. Sono state osservate, invece, differenze statisticamente non significative tra i trattamenti VCW e VCW + UV (Fig. 1). Risultati simili sono stati osservati dopo il trattamento nell'impianto HCW (Fig. 2). È stata osservata una riduzione statisticamente significativa del numero di copie di ARGs sino al 98%. Anche in questo caso, sono state osservate differenze statisticamente non significative tra i risultati ottenuti dopo i trattamenti HCW e HCW + UV. Inoltre, in questo caso, il gene *vanA* non è stato rilevato, confermando così l'assenza di ARB a tale antibiotico.

Questi risultati dimostrano come le CWs, da sole o in combinazione con la radiazione UV, sono in grado di ridurre significativamente gli ARGs ma, nonostante il trattamento degli effluenti con radiazione UV sia stato efficiente nell'abbattimento dei batteri vitali, esso non lo è stato, invece, per l'ulteriore riduzione degli ARGs in quanto, probabilmente, porzioni significative di DNA genomico o plasmidico, codificanti i geni di resistenza, potrebbero rimanere intatti (Stange *et al.*, 2019).

3.3.3. Presenza e quantificazione dell'AMR nelle piantine di lattuga

Gli effluenti ottenuti dopo il trattamento nei due impianti (VCW e HCW), combinati con il trat-

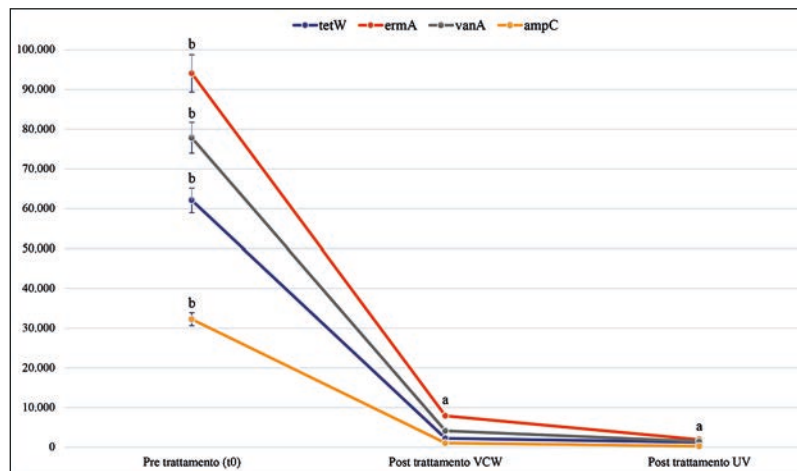


Figura 1: Numero di copie di ARGs prima e dopo i trattamenti VCW e VCW + UV.

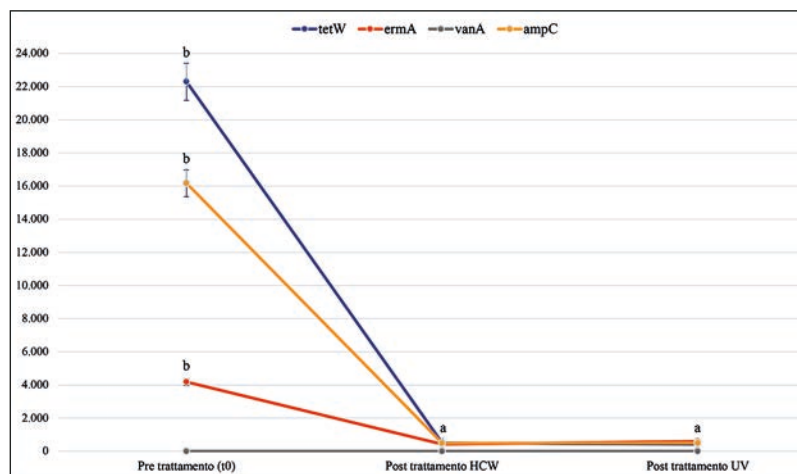


Figura 2: Numero di copie di ARGs prima e dopo i trattamenti HCW e HCW + UV.

tamento UV, sono stati utilizzati per irrigare 144 piantine di lattuga per quattro settimane. Al termine di questo periodo, le lattughe sono state analizzate per verificare l'eventuale trasferimento di ARB/ARGs alla rizosfera o alla loro parte edule (foglie). Nel caso delle piantine di lattuga irrigate con gli effluenti VCW e VCW+UV, non sono stati rilevati ARB in nessuna rizosfera delle piantine (Tab. 8). Invece, i metodi colturali hanno dimostrato una limitata presenza di ARB solo a livello della rizosfera delle lattughe irrigate con l'effluente HCW (Tab. 9) nonostante la loro bassa presenza negli effluenti (Tab. 7). In ogni caso la loro presenza è risultata comunque limitata, probabilmente grazie alle proprietà di resilienza e resistenza intrinse-

Antibiotico	Controllo	Post trattamento VCW	Post trattamento UV
Ampicillina	-	-	-
Tetraciclina	-	-	-
Eritromicina	-	-	-
Vancomicina	-	-	-

che del suolo e del suo microbioma (Negreanu *et al.*, 2012).

Infine è stata indagata la presenza di batteri endofiti resistenti agli antibiotici nelle foglie di lattuga (Tab. 10), simulando un lavaggio domestico e la sanificazione superficiale delle foglie. I risultati hanno evidenziato che non erano presenti ARB endofiti nelle foglie, neanche in quelle irrigate con l'effluente HCW che, invece, apportava un numero limitato di ARB alla rizosfera (Tab. 9). Pertanto, anche se gli effluenti delle CWs hanno fornito ARB e ARGs al terreno in cui sono state coltivate le piantine di lattuga, i nostri risultati dimostrano che né

Tabella 8: Interpretazione qualitativa del numero di ARB a livello della rizosfera delle piantine di lattuga (+++ presenza elevata; ++ presenza moderata; + bassa presenza; - assenza).

Antibiotico	Controllo	Post trattamento HCW	Post trattamento UV
Ampicillina	-	+	-
Tetraciclina	-	+	-
Eritromicina	-	+	-
Vancomicina	-	+	-

Tabella 9: Interpretazione qualitativa del numero di ARB a livello della rizosfera delle piantine di lattuga (+++ presenza elevata; ++ presenza moderata; + bassa presenza; - assenza).

Antibiotico	Controllo	Post trattamento CW	Post trattamento UV
Ampicillina	-	-	-
Tetraciclina	-	-	-
Eritromicina	-	-	-
Vancomicina	-	-	-

Tabella 10: Interpretazione qualitativa del numero di ARB nelle foglie delle piantine di lattuga (+++ presenza elevata; ++ presenza moderata; + bassa presenza; - assenza).

ARB né ARGs sono stati trasferiti ai tessuti fogliari. Risultati simili sono stati riportati anche da Ye *et al.* (Ye *et al.*, 2016) nel caso di lattuga coltivata in un suolo trattato con *biochar*. L'entità dei ARGs forniti dal nostro effluente al suolo era molto inferiore rispetto a quanto riscontrato da Ye e collaboratori, tuttavia, i loro risultati hanno confermato che ARB e ARGs certamente rappresentano un serio problema nella produzione di alimenti sicuri. L'uso di acque reflue recuperate da impianti di trattamento poco efficienti per la coltivazione di piante a foglia verde può comportare rischi significativi per la salute umana, in particolare a causa dell'elevata presenza di ARB.

4. Conclusioni

Il riuso delle acque reflue depurate per l'irrigazione delle colture agricole è attualmente considerata una soluzione estremamente vantaggiosa e auspicabile a causa della scarsità d'acqua. Tuttavia, l'accumulo di antibiotici, ARB e ARGs nelle acque trattate e nei suoli è un problema emergente a causa del trattamento inefficace ad opera degli impianti di depurazione convenzionali. In questo contesto, per migliorare la qualità delle acque eliminando contaminanti emergenti, potrebbe essere utile l'impiego di soluzioni naturali ed ecosostenibili (*Nature-Based Solutions*). Nel nostro studio, condotto a scala pilota, abbiamo dimostrato che le *Constructed Wetlands* rappresentano soluzioni efficaci

e a basso costo per il trattamento delle acque reflue, non solo per la rimozione dei contaminanti comunemente noti (COD, composti dell'azoto, cloruri ecc.), ma anche per l'abbattimento della Resistenza Antimicrobica (AMR). Infatti, grazie ai meccanismi biologici, chimici e fisici, le caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche degli effluenti rispettavano i limiti normativi per il riutilizzo delle acque trattate e, inoltre, l'AMR è stata ridotta sino al 99%. Inoltre gli effluenti riutilizzati per l'irrigazione delle piante di lattuga hanno fornito solo pochi ARB al suolo e alla rizosfera, ma una totale assenza nella parte edule della pianta. Questo è un risultato molto interessante, infatti evidenzia una riduzione consistente dei rischi ambientali e sanitari associati alla diffusione dell'AMR.

In futuro, si auspica di poter condurre ulteriori studi per comprendere meglio il destino e i meccanismi di rimozione di questi contaminanti emergenti ad opera delle CWs, e sicuramente sarebbe interessante riproporre tali esperimenti in contesti reali al fine di garantire un riutilizzo sicuro delle acque reflue trattate mediante CWs in agricoltura per una produzione alimentare sostenibile.

* **Dipartimento di Chimica e Biologia "A. Zambelli", Università degli Studi di Salerno**

** **NBFC, National Biodiversity Future Center, Palermo**

Bibliografia

Arias, C. A., Brix, H., & Marti, E. (2005). Recycling of Treated Effluents Enhances Removal of Total Nitrogen in Vertical Flow Constructed Wetlands. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 40(6-7), 1431-1443. <https://doi.org/10.1081/ESE-200055882>

Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose,

D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453-1462. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>

Boutillier, L., Jamieson, R., Gordon, R., Lake, C., & Hart, W. (2009). Adsorption, sedimentation, and inactivation of *E. coli* within wastewater treatment wetlands. *Water Research*, 43(17), 4370-4380. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.039>

Brix, H. (1994). Functions of Macrophytes in Constructed Wetlands. *Water Science and Technology*, 29(4), 71-78. <https://doi.org/10.2166/wst.1994.0160>

Chen, J., Deng, W.-J., Liu, Y.-S., Hu, L.-X., He, L.-Y., Zhao, J.-L., Wang, T.-T., & Ying, G.-G. (2019). Fate and removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in hybrid constructed wetlands. *Environmental Pollution*, 249, 894-903. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.111>

Daughton, C. G., & Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, 107.

Garcia, X., & Pargament, D. (2015). Reusing wastewater to cope with water scarcity: Economic, social and environmental considerations for decision-making. *Resources, Conservation and Recycling*, 101, 154-166. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2015.05.015>

Gersberg, R. M., Lyon, S. R., Brenner, R., & Elkins, B. V. (1987). Fate of viruses in artificial wetlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(4), 731-736. <https://doi.org/10.1128/aem.53.4.731-736.1987>

Giardina, S., Fanelli, R., Sabbatucci, M., & Zaghi, C. (2003). *ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ*.

Grenier, F., Matteau, D., Baby, V., & Rodrigue, S. (2014). Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BW25113. *Genome Announcements*, 2(5), e01038-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01038-14>

Karim, M. R., Manshadi, F. D., Karpiscak, M. M., & Gerba, C. P. (2004). The persistence and removal of enteric pathogens in constructed wetlands. *Water Research*, 38(7), 1831-1837. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.029>

Larsson, D. G. J., De Pedro, C., & Paxeus, N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 148(3), 751-755. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.008>

Liu, X., Guo, X., Liu, Y., Lu, S., Xi, B., Zhang, J., Wang, Z., & Bi, B. (2019). A review on removing antibiotics and antibiotic resistance genes from wastewater by constructed wetlands: Performance and microbial response. *Environmental Pollution*, 254, 112996. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112996>

Meyer, J. L., Sale, M. J., Mulholland, P. J., &

- Poff, N. L. (1999). IMPACTS OF CLIMATE CHANGE ON AQUATIC ECOSYSTEM FUNCTIONING AND HEALTH'. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 35(6), 1373-1386. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.1999.tb04222.x>
- Negreanu, Y., Pasternak, Z., Jurkevitch, E., & Cytryn, E. (2012). Impact of Treated Wastewater Irrigation on Antibiotic Resistance in Agricultural Soils. *Environmental Science & Technology*, 46(9), 4800-4808. <https://doi.org/10.1021/es204665b>
- Pereira, L. S., Oweis, T., & Zairi, A. (2002). Irrigation management under water scarcity. *Agricultural Water Management*, 57(3), 175-206. [https://doi.org/10.1016/S0378-3774\(02\)00075-6](https://doi.org/10.1016/S0378-3774(02)00075-6)
- Pruden, A., Larsson, D. G. J., Amézquita, A., Collignon, P., Brandt, K. K., Graham, D. W., Lazorchak, J. M., Suzuki, S., Silley, P., Snape, J. R., Topp, E., Zhang, T., & Zhu, Y.-G. (2013). Management Options for Reducing the Release of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes to the Environment. *Environmental Health Perspectives*, 121(8), 878-885. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206446>
- Santos, F., Almeida, C. M. R., Ribeiro, I., & Mucha, A. P. (2019). Potential of constructed wetland for the removal of antibiotics and antibiotic resistant bacteria from livestock wastewater. *Ecological Engineering*, 129, 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.01.007>
- Scholz, M., & Lee, B. (2005). Constructed wetlands: A review. *International Journal of Environmental Studies*, 62(4), 421-447. <https://doi.org/10.1080/00207230500119783>
- Snyder, S. A., Westerhoff, P., Yoon, Y., & Sedlak, D. L. (2003). Pharmaceuticals, Personal Care Products, and Endocrine Disruptors in Water: Implications for the Water Industry. *Environmental Engineering Science*, 20(5), 449-469. <https://doi.org/10.1089/109287503768335931>
- Sowers, J., Vengosh, A., & Weinthal, E. (2011). Climate change, water resources, and the politics of adaptation in the Middle East and North Africa. *Climatic Change*, 104(3-4), 599-627. <https://doi.org/10.1007/s10584-010-9835-4>
- Spiniello, I., De Carluccio, M., Castiglione, S., Amineva, E., Kostryukova, N., Cicatelli, A., Rizzo, L., & Guarino, F. (2023). Landfill leachate treatment by a combination of a multiple plant hybrid constructed wetland system with a solar photoFenton process in a raceway pond reactor. *Journal of Environmental Management*, 331, 117211. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.117211>
- Stange, C., Sidhu, J. P. S., Toze, S., & Tiehm, A. (2019). Comparative removal of antibiotic resistance genes during chlorination, ozonation, and UV treatment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 222(3), 541-548. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.02.002>
- Vymazal, J. (2005). Constructed wetlands for wastewater treatment. *Ecological Engineering*, 25(5), 475-477. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2005.07.002>
- Vymazal, J. (2010). Constructed Wetlands for Wastewater Treatment. *Water*, 2(3), 530-549. <https://doi.org/10.3390/w2030530>
- Wang, J., Long, Y., Yu, G., Wang, G., Zhou, Z., Li, P., Zhang, Y., Yang, K., & Wang, S. (2022). A Review on Microorganisms in Constructed Wetlands for Typical Pollutant Removal: Species, Function, and Diversity. *Frontiers in Microbiology*, 13, 845725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.845725>
- Ye, M., Sun, M., Feng, Y., Wan, J., Xie, S., Tian, D., Zhao, Y., Wu, J., Hu, F., Li, H., & Jiang, X. (2016). Effect of biochar amendment on the control of soil sulfonamides, antibiotic-resistant bacteria, and gene enrichment in lettuce tissues. *Journal of Hazardous Materials*, 309, 219-227. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.074>

Sitarama®

Via Michelucci, 9
50028 Barberino Tavarnelle (FI)

presenta **Henné Color**:
una gamma completa di colorazioni naturali a base di henné,
pianta tintoria conosciuta per le sue proprietà benefiche e
coloranti. Senza ossidanti, ammoniacca, acqua ossigenata:
composta da 6 linee di prodotti:

- **Polvere Henné Color**
riflessanti naturali, di erbe tintorie, disponibile in 7
colorazioni
- **Polvere naturale NON colorante fortificante**
Neutro
- **Crema Colorante Henné Nuance**
colorazione dolce pronta all'uso, per uso frequente,
disponibile in 12 colorazioni
- **Hair Mascara** per un ritocco rapido del colore;
disponibile in 7 colorazioni
- **Shampo Henné mantenimento del colore**
disponibile in 7 colorazioni oltre al neutro
- **Balsamo Henné Ristrutturante**
doppio utilizzo: aggiunto nella preparazione
fissa il colore e dopo la tinta rimuove
le particelle dalla radice dei capelli
lasciandoli morbidi e lucenti.



www.sitarama.com

