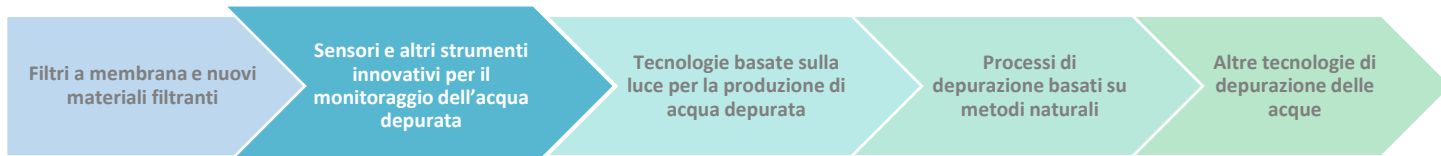




Info-Package 4

Aziende del settore idrico

Scheda informativa 4.2 – Sensori e altri strumenti innovativi per il monitoraggio della qualità delle acque depurate: fatti e cifre



SUWANU EUROPE è un progetto H2020 finalizzato alla promozione di un efficace scambio di conoscenze, esperienze e competenze tra i tecnici e gli attori principali del riuso idrico in agricoltura. Questa scheda informativa fa parte di una serie di 5 schede all'interno del «Pacchetto informativo» 4, indirizzato alle aziende del settore idrico, e descrive le recenti innovazioni nel campo della rilevazione dei patogeni e del carbonio organico nei reflui. Nello specifico viene illustrata la tecnica c.d. citometria a flusso (per l'individuazione dei patogeni) e la fluorescenza UV-LED (per la misura del carbonio organico disciolto). Infine si fornisce una breve sintesi delle nuove tecnologie attualmente in fase di sviluppo.

INTRODUZIONE

1. La citometria a flusso

La maggior parte di patogeni trasmessi con l'acqua non sono coltivabili in vitro e non generano colonie su substrati di coltura convenzionali. A causa di ciò questi batteri sfuggono ai normali sistemi di analisi basati sulla coltivazione batterica. Tra i metodi alternativi, la citometria a flusso si distingue per la sua rapidità e riproducibilità dei risultati in diversi tipi di acqua. Un altro vantaggio consiste nella sua rapidità, che consente di valutare le concentrazioni di batteri in circa 15 minuti. Oltre a fornire un'informazione quantitativa sulla consistenza delle colonie, questa tecnologia permette anche di capire se le membrane cellulari dei batteri sono intatte (batteri vivi) o sono compromesse (batteri morti o danneggiati).

2. I sensori led UV

Il monitoraggio in tempo reale della sostanza organica disciolta (DOM) è necessario per un controllo *smart* ed economico del processo di trattamento delle acque. Infatti, monitorare con una certa frequenza i contenuti di carbonio organico disciolto (DOC) e residui tossici di prodotti per la disinfezione (DBPs) è un'operazione piuttosto onerosa, sia in termini economici che di tempo (motivo per il quale molte agenzie hanno sottolineato l'urgente necessità di adottare un sistema alternativo per il monitoraggio del DOC e dei DBPs). È divenuto quindi necessario avviare lo sviluppo di una tipologia di sensore di tipo economico, compatto, a basso consumo energetico ma comunque sensibile, in grado di fornire le informazioni necessarie sia per l'ottimizzazione automatica dei parametri di processo sia per la stima in tempo reale della formazione dei DBPs durante il trattamento delle acque.

Per rispondere a queste necessità, le tecniche di monitoraggio di tipo spettrale - quali l'assorbimento degli UV e l'intensità della fluorescenza (che sono correlate con il contenuto di DOM) -, sono risultate le più promettenti.

3. Future innovazioni

Nonostante gli sforzi per sviluppare sistemi di monitoraggio real-time, mancano ancora dispositivi affidabili capaci di operare in tempo reale in modo preciso e verificabile e che siano applicabili su larga scala. Il principale limite alla loro diffusione consiste nella scarsa affidabilità dei dati misurati a costi competitivi. D'altronde, la maggioranza dei sistemi disponibili consistono in adattamenti dei tradizionali metodi analitici di laboratorio, che non sono stati pensati per essere usati in applicazioni di campo. Inoltre, devono poter fornire risultati precisi e riproducibili anche in condizioni ambientali difficili. Ne consegue che questi metodi hanno bisogno di essere sottoposti a frequenti calibrazioni/manutenzioni, e spesso consumano ingenti quantità di reagenti chimici. Inoltre, a causa delle difformità tra gli standard di misura e i campioni analizzati (i.e. le misurazioni avvengono in condizioni non controllate), gli analizzatori possono fornire risultati contraddittori. Infine, la difficoltà di individuare problemi tecnici e malfunzionamenti di sensori remotizzati può comportare anche un significativo costo economico e logistico in termini manutentivi.

1. CITOMETRIA A FLUSSO

1.1. La tecnologia

L'integrità delle membrane cellulari è un criterio consolidato per distinguere le cellule vitali (attive o inattive), da quelle con un danneggiamento (o una compromissione) delle membrane cellulari. Questa informazione è di grande importanza negli studi sul funzionamento delle colonie batteriche all'interno degli ambienti naturali, al fine di assegnare un grado di attività alle cellule più attive, che sono effettivamente responsabili delle osservazioni. Il principio di funzionamento di questo approccio consiste nell'uso simultaneo di una sonda permeante (e.g. sonde molecolari; SYBR Green) e una impermeante (ioduro di propidio), sfruttando il trasferimento energetico che avviene quando entrambe le sonde stanno colorando gli acidi nucleici. Una completa estinzione della fluorescenza della sonda permeante da parte di quella impermeante indica le cellule con una membrana compromessa; un parziale estinzione indica le cellule con una membrana poco danneggiata; e infine, una mancanza di estinzione caratterizza le membrane delle cellule ancora intatte.

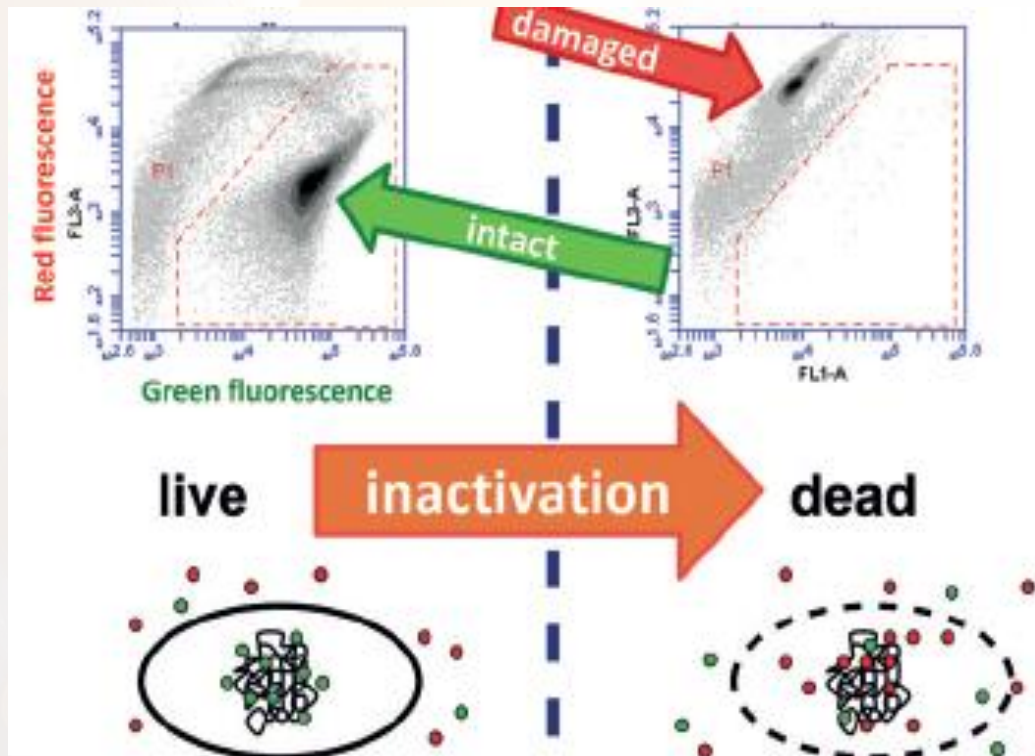


Figura 1: Esempio di un diagramma di densità di una sospensione batterica ottenuto con la citometria a flusso che distingue le cellule vive e/o con membrane intatte (all'interno dell'area delimitata dalla linea rossa tratteggiata), rispetto a quelle morte e/o con membrane danneggiate (all'esterno dell'area delimitata dalla linea rossa tratteggiata).

1.2. Applicazioni alla depurazione delle acque

La citometria a flusso è applicabile a ogni tipo di acqua, incluse le acque reflue, e permette una misurazione rapida e affidabile del numero di cellule batteriche che si adatta perfettamente al monitoraggio dei reflui durante i processi di depurazione.

Basandosi sul fatto che la rilevazione non è fondata sulla coltivazione dei batteri, la citometria a flusso permette di misurare l'intera popolazione batterica indipendentemente dai requisiti di crescita dei diversi batteri che la compongono. Mentre un indicatore igienico tradizionale, come la presenza di coliformi, enterococchi intestinali o di *Clostridium perfringens* non è tipicamente rilevabile dopo una filtrazione a membrana e il processo di conteggio delle colonie normalmente non è disponibile prima di 2-3 giorni, la citometria a flusso offre una valida alternativa per la valutazione microbiologica dell'efficacia dei vari passaggi di trattamento delle acque.

Il metodo è inoltre pienamente compatibile con i principi dell'analisi dei rischi e dei punti di controllo critico (HACCP), in quanto la rapida rilevazione di cambiamenti microbiologici rappresenta una buona base per l'implementazione di controlli di processo.

2. IL SENSORE DI FLUORESCENZA LED UV

2.1. La tecnologia

Il sensore LED, che consente di misurare simultaneamente l'assorbimento degli UV280 e la fluorescenza delle molecole proteiche e umiche, consente di monitorare con una buona sensibilità e accuratezza i cromofori e i fluorofori. Inoltre, la cromatografia liquida con un sensore di carbonio organico combinata con una analisi 2D di correlazione sincrona, permette di osservare come i costituenti delle DOM di elevato peso molecolare si scindano in molecole più piccole in funzione del decremento della fluorescenza che si manifesta nelle sostanze umiche. I campioni vengono caratterizzati dal punto di vista spettrale con una cromatografia ad esclusione dimensionale ad alte prestazioni con assorbimento multiplo di UV e scansioni della fluorescenza multi emissione.

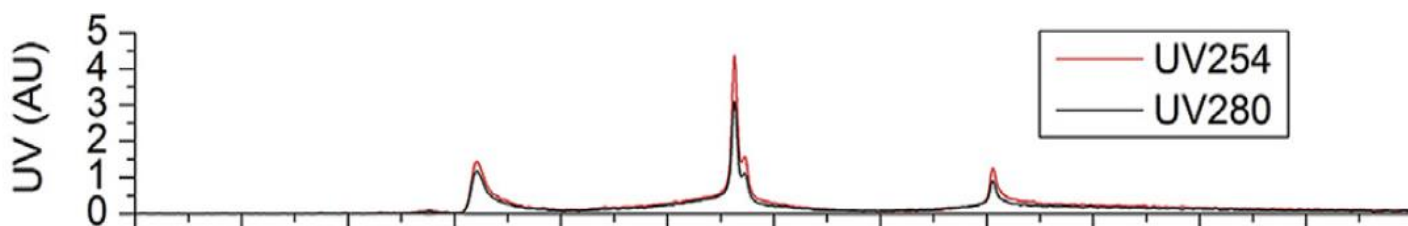


Figura 2: Immagine di uno spettrofotometro (in basso) e di un esempio di diagramma che mostra i picchi misurati dallo strumento utilizzando un LED UV254 e un LED UV280.

2.2. Applicazioni alla depurazione delle acque

La clorurazione è il metodo più usato per la disinfezione durante il trattamento delle acque, in quanto è efficace contro un grande numero di patogeni e fornisce una capacità di disinfezione residuale nel tempo. Tuttavia, questo processo rilascia dei sottoprodotti tossici (DBPs), (che inevitabilmente si formano a causa della reazione tra il cloro e le sostanze organiche naturali (NOM)), che possono, tuttavia, causare problemi – anche seri - per la salute pubblica. Molti studi hanno suggerito che i DBPs sono citotossici e genotossici, e che l'esposizione cronica a questi composti può essere associabile con casi di cancro alla vescica e al colon (negli esseri umani).

Essere in grado di individuare queste sostanze con un sensore a fluorescenza UV può essere utile a mettere in atto misure correttive per ridurre la concentrazione di DBPs al termine del trattamento di clorurazione.

3. FUTURE INNOVAZIONI

3.1. Tecnologie

Per il caso specifico della rilevazione dei patogeni all'interno dell'acqua esistono interessanti prospettive di sviluppo per i sensori fotonici, i quali migliorano la capacità di rilevazione biologica sfruttando le naturali proprietà di fluorescenza di alcuni batteri, come l'*Escherichia coli*. Il sensore fotonico per patogeni, proposto Da AIMEN, è progettato per misurare la fluorescenza naturale dei batteri da campioni di acqua raccolti *in situ*. Un'approfondita analisi dei campioni di acqua è ciò che fa (e farà) la differenza con le altre metodologie allo stato dell'arte in questo campo. Questo sensore non fornisce però un'accurata stima di presenza di batteri fluorescenti (e.g. *E. coli*), ma esegue un monitoraggio che consente di stabilire una stima circa la presenza di patogeni. Questo deve essere visto come un sistema di primo allarme, che richiede ulteriori analisi di laboratorio per determinare la presenza e la CFU dei patogeni nell'acqua. Si tratta, quindi, di un sistema privo di specificità, ma non richiede nessun trattamento dell'acqua, nessun pre-trattamento del campione e nessun reagente, il che lo rende molto economico e facile da utilizzare.

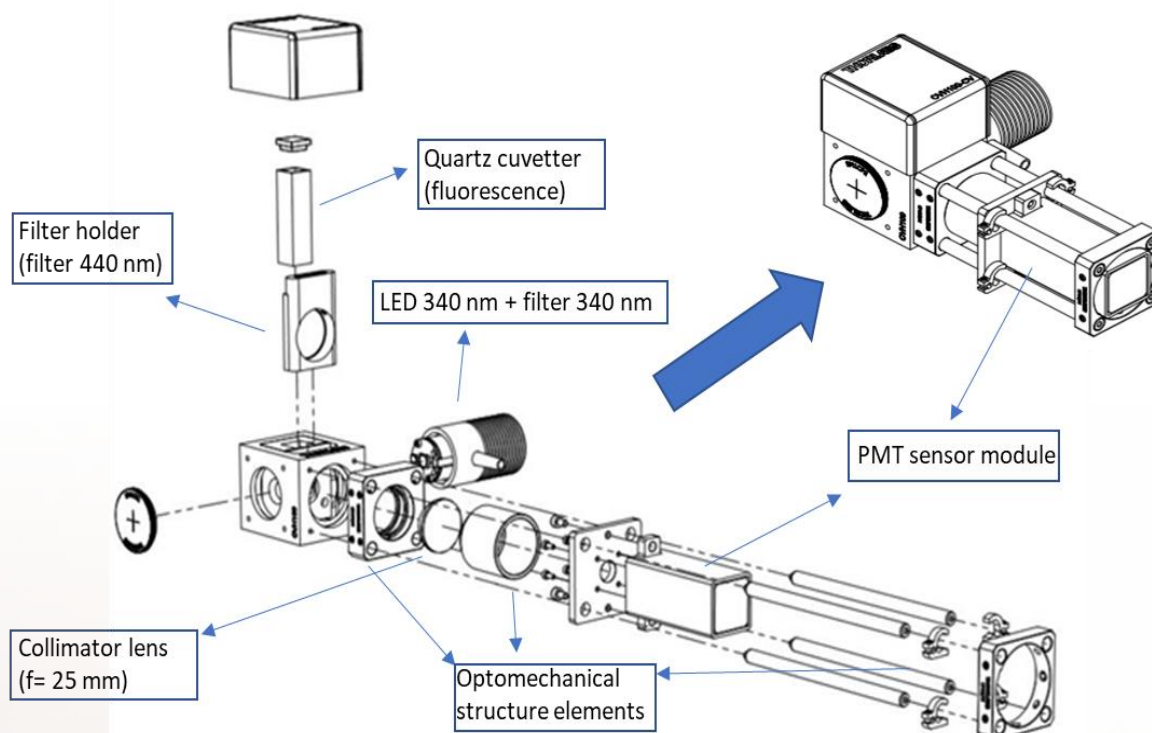


Figura 3: Configurazione del sensore PMT suggerito da AIMEN per le misure di fluorescenza di *E. coli*.

3.2. Applicazioni alla depurazione delle acque

Sebbene siano stati sviluppati alcuni sensori per misurare in modo diretto la fluorescenza naturale di questi batteri in condizioni di campo, senza trattamenti preventivi dei campioni e utilizzando l'acqua all'interno dei sistemi di circolazione (ricreando, quindi, un sistema di monitoraggio dell'acqua «in linea»), non ci sono rapporti che attestino il loro utilizzo su campioni reali di impianti di depurazione esistenti.

Con il sensore sviluppato da AIMEN, tuttavia, parrebbe possibile realizzare un sistema monitoraggio real-time in linea, in grado di misurare in continuo la fluorescenza all'interno di un tubo di derivazione di un impianto di depurazione idrica. Se il sensore risulterà affidabile e dimostrerà di funzionare correttamente, potrebbe rivoluzionare il monitoraggio delle acque al di fuori di contesti di laboratorio, senza pre-trattamenti dei campioni e senza l'aggiunta di reagenti e/o la necessità di strumenti costosi.

5. Bibliografia

- Dartnell, L. (2013). Fluorescence characterization of clinically-important bacteria. *PLoS one* vol. 8,9.
- Edberg, S. (2000). *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 106S-116S.
- Hesari, N. (2016). A biosensor platform for rapid detection of *E. coli* in drinking water. *Enzyme and Microbial Technology* vol. 83, Pages 22-28.
- Hongying, Z. (2012). Quantum dot enabled detection of *Escherichia coli* using a cell-phone. *The Analyst* vol. 137.
- Kilungo, A. (2013). Continuous Real-time Detection of Microbial Contamination in Water using Intrinsic Fluorescence. doi: 10.4172/2155-6210.S12-002. *J Biosens Bioelectron* S12:002.
- Li, W. T., Jin, J., Li, Q., Wu, C. F., Lu, H., Zhou, Q., & Li, A. M. (2016). Developing LED UV fluorescence sensors for online monitoring DOM and predicting DBPs formation potential during water treatment. *Water research*, 93, 1-9.
- Simões, J. (2018). Continuous and Real-Time Detection of Drinking-Water Pathogens with a Low-Cost Fluorescent Optofluidic Sensor. *Sensors (Basel, Switzerland)* vol. 18,7 2210.
- Wildeboer, D. (2010). Rapid detection of *Escherichia coli* in water using a hand-held fluorescence detector. *Water Research* vol. 44, Pages 2621-2628.
- Zulkifli, N. (2018). Detection of contaminants in water supply State-of-the-art monitoring technologies and their applications. *Sensors and Actuators B* 255 (2018), 2657–2689.



CONTATTI:

Coordinatore

Rafael Casielles (BIOAZUL SL)
Avenida Manuel Agustin Heredia nº18 1ª Málaga (SPAIN)
Mail | info@suwanu-europe.eu Website | www.suwanu-europe.eu

CONTATTI:

Responsabile della scheda informativa

Andres Acosta (TTZ Bremerhaven)
Am Ludeneich 12 27572 Bremerhaven (GERMANY) | Website |
<https://www.ttz-bremerhaven.de/de/>



THIS PROJECT HAS RECEIVED FUNDING FROM
THE EUROPEAN UNION' HORIZON 2020 RESEARCH
AND INNOVATION PROGRAMME
UNDER GRANT AGREEMENT N. 818088

