



Programma di attività- Monitoraggio ambientale degli antibiotici e dell'antibiotico-resistenza sui fertilizzanti organici e i terreni agrari

CUP H79I23001400001

Indice

PREMESSA	2
DESCRIZIONE DELLA COLLABORAZIONE.....	2
OBIETTIVI DELLA COLLABORAZIONE	3
METODOLOGIE DI INDAGINE.....	3
A. Predisposizione dei campioni da sottoporre ad analisi.....	3
B. Fasi operative e analitiche.....	4
RISULTATI ATTESI	4
A. Azione A.4.1 -Effluenti zootecnici.....	4
B. Azione A.4.2 – Matrici organiche ottenute dai rifiuti utilizzate in agricoltura	5
OUTPUT DI PROGETTO	5
BIBLIOGRAFIA.....	5
TEMPISTICA DI SVOLGIMENTO DELLE ATTIVITÀ (DIAGRAMMA DI GANTT)	7
ANALISI DELLE SPESE BUDGET	8



PREMESSA

Come indicato nella DGR N. 1191 del 5 ottobre 2023 che ha approvato il “Piano Regionale di contrasto all’antimicrobico-resistenza (PRCAR) 2022 – 2025”, nonché nei vari documenti che disciplinano la materia in ambito comunitario e nazionale, il fenomeno della resistenza agli antimicrobici richiede un’azione coordinata a livello globale, multidisciplinare e olistico attraverso l’approccio One Health che considera l’impatto reciproco di elementi umani, animali ed ambientali.

In tale prospettiva, la letteratura scientifica evidenzia come l’ambiente non rappresenti un semplice comparto recettore degli antimicrobici e dei microrganismi resistenti, ma un sistema dinamico nel quale le pressioni selettive di origine antropica possono interagire con i serbatoi naturali di geni di resistenza, contribuendo in modo complesso e non lineare alle dinamiche dell’antimicrobico-resistenza (Berendonk et al., 2015).

Come riportato nel documento dal titolo “One Health Governance in the European Union”, pubblicato dalla Direzione Generale per la Salute e la Sicurezza Alimentare dell’UE nel novembre del 2024, *“Esiste ormai un consenso scientifico sull’interdipendenza tra la salute di esseri umani, animali ed ecosistemi (inclusi piante, funghi e batteri). La stragrande maggioranza delle malattie infettive emergenti ha origine negli animali.”*

Le attività umane, come il cambiamento dell’uso del suolo e della copertura del suolo, stanno aumentando l’esposizione di persone e animali domestici alla fauna selvatica. Una delle conseguenze è un aumento del rischio di insorgenza e diffusione di agenti patogeni in entrambe le direzioni. Inoltre, negli ultimi decenni si è registrato un aumento della frequenza e della gravità degli eventi meteorologici estremi, e il ritmo crescente del cambiamento climatico sta avendo un impatto sostanziale sulla salute di esseri umani, animali ed ecosistemi (inclusi piante, funghi e batteri).

E’ per tale motivo che la Regione Veneto, nell’ambito del “Documento programmatico per la declinazione degli obiettivi trainanti e delle azioni strategiche per il contrasto all’AMR e ICA” approvato con DGR n. 740/2026, ha incluso fra i propri traguardi anche l’obiettivo A4 - “Implementare conoscenze relative alla concentrazione residuale di antibiotici nell’ambiente e correlazione con i livelli di ABR”, che verrà declinato in un’azione rivolta ad indagare e monitorare il fenomeno dell’antibiotico resistenza negli effluenti di allevamento, nelle matrici organiche ottenute dai rifiuti e utilizzate in agricoltura (fanghi di depurazione e ammendanti compostati contenenti fanghi di depurazione delle acque reflue urbane), e nei terreni agrari.

Tali azioni verranno attuate in collaborazione con il Dipartimento DAFNAE dell’Università di Padova, e con il coinvolgimento dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZS Ve) attraverso la realizzazione delle due attività di seguito riportate:

- (A4.1) Il monitoraggio degli effluenti zootecnici e dei suoli con essi concimati.
- (A4.2) Il monitoraggio delle matrici organiche ottenute dai rifiuti e utilizzate in agricoltura (fanghi di depurazione e ammendanti compostati contenenti fanghi di depurazione delle acque reflue urbane), e dei suoli con esse concimati.

DESCRIZIONE DELLA COLLABORAZIONE

La valutazione delle ricadute ambientali connesse all’impiego degli effluenti zootecnici e dei fertilizzanti organici in genere, rappresenta un elemento essenziale per comprendere la portata dei fenomeni legati all’antimicrobico-resistenza negli ecosistemi agricoli. L’utilizzo di antimicrobici negli allevamenti può determinare la presenza, negli effluenti, sia di residui di principi attivi sia di batteri portatori di geni di resistenza. Una volta applicati al suolo, tali componenti possono interagire con le comunità microbiche autoctone, esercitare pressioni selettive e contribuire alla diffusione di resistenze in matrici ambientali che fungono da potenziali serbatoi.

La Collaborazione tra Regione del Veneto e il dipartimento DAFNAE dell’Università di Padova è motivata quindi nell’opportunità di porre in essere le seguenti azioni:

1. identificare eventuali rischi connessi alla persistenza di antibiotici o di batteri resistenti nelle matrici ambientali;
2. comprendere gli effetti diretti e indiretti sulla biodiversità microbica e sugli equilibri ecologici del suolo;



3. stimare le potenziali vie di trasferimento della resistenza verso la fauna selvatica, gli animali da allevamento e, indirettamente, l'uomo;
4. orientare pratiche gestionali che riducano l'impatto degli spandimenti e favoriscano un uso sostenibile delle matrici organiche.

OBIETTIVI DELLA COLLABORAZIONE

L'attività di indagine e monitoraggio è orientata a costruire un quadro tecnico affidabile e utilizzabile per valutazioni di politica agro-ambientale e di tutela e prevenzione sanitaria. In particolare, mira a:

1. caratterizzare la biodiversità microbica dei suoli trattati con effluenti ed altri fertilizzanti organici, verificando se tali pratiche determinino modificazioni rilevanti rispetto a condizioni considerate fisiologiche;
2. analizzare le funzioni microbiologiche coinvolte nel ciclo dell'azoto, per individuare eventuali deviazioni dai processi naturali di fertilità del suolo;
3. monitorare la presenza e la diffusione di geni di antibiotico-resistenza (ARGs) potenzialmente introdotti o amplificati dagli effluenti, valutandone le implicazioni ambientali e sanitarie;
4. individuare eventuali squilibri ecologici nelle comunità microbiche correlabili ai carichi organici o alla presenza di residui farmacologici;
5. integrare dati tassonomici, funzionali e ambientali, così da identificare eventuali pressioni selettive riconducibili alle pratiche agronomiche e fornire basi tecniche solide per decisioni regolatorie o gestionali.

METODOLOGIE DI INDAGINE

L'approccio metodologico adottato consente di descrivere in modo accurato lo stato biologico e funzionale dei suoli analizzati, attraverso le tecniche di seguito descritte.

Il Metabarcoding 16S rRNA risulta funzionale a caratterizzare la struttura delle comunità microbiche. Questa tecnica permette di descrivere i gruppi batterici presenti e i principali indici di biodiversità, fornendo informazioni utili per valutare gli effetti delle pratiche agricole sugli equilibri ecologici del suolo. I risultati devono essere comunque interpretati come descrittivi della struttura, e non delle funzioni o del rischio AMR.

Le Analisi delle funzioni del ciclo dell'azoto verranno eseguite tramite la quantificazione (qPCR) dei geni coinvolti nei principali processi biogeochimici. Tali marcatori consentono di valutare possibili variazioni nella fertilità naturale del suolo.

Una tecnica importante per le funzioni del progetto è il Digital PCR (dPCR), che è funzionale alla quantificazione assoluta degli ARGs legati agli antimicrobici maggiormente utilizzati nelle filiere zootecniche. Questa tecnica fornisce misurazioni precise delle abbondanze genetiche.

L'integrazione dei dati microbiologici con i parametri chimico-fisici e agronomici dei siti, quali pH, rapporto C/N, nutrienti disponibili, tessitura del terreno, rotazioni colturali e modalità di spandimento consente una lettura complessiva degli effetti delle pratiche agricole e fornisce una base scientifica solida a supporto delle decisioni tecniche e politiche regionali.

A. Predisposizione dei campioni da sottoporre ad analisi

Il criterio di individuazione dei punti di prelievo dei campioni va a privilegiare gli ambiti sottoposti ad uso agronomico di reflui zootecnici o fanghi di depurazione, in coerenza con le azioni approvate dal PNCAR. Si tratta di terreni per cui, considerata la base informativa dei registri degli interventi di fertilizzazione, risulta attestato l'uso di letame, liquame zootecnico, fanghi di depurazione o ammendanti compostati contenenti fanghi di depurazione delle acque reflue urbane.



Per quanto riguarda la predisposizione dei campioni sottoposti ad analisi nell'ambito del presente progetto, verrà fatto tesoro, tra l'altro, della collaborazione già realizzata tra ARPAV e la Regione Veneto caratterizzazione dei suoli nei termini definiti dalla Direttiva Nitrati.

Le attività seguono un piano di monitoraggio periodico concordato tra Arpav e Regione del Veneto (DGR 1729/2019 all. B e seguenti), che comprende lo studio scientifico sulla presenza di nutrienti in appezzamenti agricoli ordinari gestiti con fertilizzanti organici e zootecnici.

ARPAV effettua, secondo i protocolli standard, analisi chimico-fisiche sull'orizzonte superficiale dei suoli (circa 40 cm di profondità). I campioni di suolo raccolti entrano a far parte della pedoteca di ARPAV, che rappresenta l'archivio fisico e digitale dei campioni di suolo del Veneto, situata presso la struttura territoriale ARPAV di Treviso.

Per i restanti campioni sottoposti ad analisi nell'ambito della presente collaborazione, sarà cura di DAFNAE definire i punti in relazione alle informazioni di dettaglio che potranno essere condivise dalla Regione del Veneto sull'ubicazione degli ambiti sottoposti ad uso agronomico dei materiali oggetto di indagine.

B. Fasi operative e analitiche

Le attività si articoleranno nelle seguenti fasi:

1. Ricezione dei campioni di suolo predisposti da parte di ARPAV o raccolta dei campioni presso i siti stabiliti;
2. preparazione, omogeneizzazione e conservazione dei campioni in condizioni idonee a preservare l'integrità del DNA;
3. estrazione del DNA totale e svolgimento delle analisi biomolecolari previste (metabarcoding 16S rRNA, qPCR dei geni funzionali del ciclo dell'azoto, dPCR per la quantificazione degli ARG);
4. integrazione dei dati microbiologici con le informazioni agronomiche e chimico-fisiche dei siti;
5. elaborazione bioinformatica e statistica dei risultati, finalizzata a individuare pattern ricorrenti, relazioni tra pratiche di gestione e segnali biologici di interesse.

L'impostazione operativa consente di ottenere dati solidi e interpretabili, adeguati a un primo monitoraggio regionale del fenomeno, coerentemente con l'approccio One Health e con gli obiettivi conoscitivi dell'azione A.4.

RISULTATI ATTESI

A. Azione A.4.1 -Effluenti zootecnici

Per quanto riguarda l'azione A.4.1, relativa agli effluenti zootecnici e ai suoli con essi concimati, l'attività di indagine e monitoraggio è finalizzata alla costruzione di un quadro conoscitivo di riferimento su una matrice di origine agricola strettamente connessa alle pratiche di allevamento e alla gestione agronomica dei nutrienti.

In particolare, le restituzioni attese sono i seguenti:

1. dati quantitativi sulla presenza e abbondanza dei ARG nei suoli fertilizzati con effluenti zootecnici, con particolare attenzione ai geni associati alle classi di antimicrobici maggiormente utilizzate in ambito veterinario. Tali risultati consentiranno di valutare se e in quale misura gli effluenti possano contribuire alla pressione selettiva sul microbioma del suolo, distinguendo tra presenza naturale di ARG e potenziali segnali di origine antropica;
2. una caratterizzazione della biodiversità microbica dei suoli interessati dallo spandimento, utile a individuare eventuali pattern ricorrenti associabili alla tipologia di effluente, alle modalità di gestione agronomica e al contesto territoriale (Zone Vulnerabili ai Nitrati e Zone Ordinarie), senza attribuire a tali fattori un significato diretto in termini di rischio AMR;
3. indicatori biologici di equilibrio, interpretabili come segnali ecologici di alterazione delle comunità del suolo imputabili ai carichi organici e alle pratiche di fertilizzazione, utili a supportare valutazioni tecnico-gestionali sulla sostenibilità delle pratiche agricole;



4. informazioni sulle funzioni microbiologiche legate al ciclo dell'azoto, che permettano di verificare se le modalità di utilizzo degli effluenti siano compatibili con il mantenimento della fertilità biologica del suolo o se possano determinare deviazioni dai processi naturali.

Nel complesso, i risultati attesi per l'azione A.4.1 forniranno una base scientifica solida per integrare il tema dell'AMR nella valutazione ambientale degli effluenti zootecnici, senza sovrapporlo impropriamente agli aspetti normativi o gestionali già regolati dalla disciplina sui nitrati.

B. Azione A.4.2 – Matrici organiche ottenute dai rifiuti utilizzate in agricoltura

L'azione A.4.2, dedicata alle matrici organiche ottenute dai rifiuti utilizzate in agricoltura – in particolare fanghi di depurazione e ammendanti compostati contenenti fanghi di depurazione delle acque reflue urbane – mira a colmare un'importante lacuna conoscitiva relativa a matrici di origine prevalentemente urbana, caratterizzate da filiere e processi di trattamento differenti rispetto agli effluenti zootecnici.

I risultati attesi riguardano in particolare:

1. la valutazione della presenza e della distribuzione di ARG nei suoli fertilizzati con fanghi e ammendanti compostati, con attenzione ai geni potenzialmente associati a pressioni selettive di origine antropica urbana. I dati consentiranno di distinguere il contributo della matrice applicata rispetto al fondo naturale di resistenza presente nei suoli;
2. l'analisi degli effetti dei processi di trattamento (depurazione e compostaggio) sulla riduzione o trasformazione del carico microbiologico e genetico, fornendo indicazioni indirette sull'efficacia dei trattamenti nel contenimento dei potenziali rischi ambientali legati all'AMR;
3. una caratterizzazione delle comunità microbiche dei suoli riceventi, utile a verificare se l'impiego di tali matrici determini alterazioni significative rispetto a condizioni di riferimento e a valutare la compatibilità degli apporti con il mantenimento degli equilibri ecologici del suolo;
4. elementi conoscitivi utili alla valutazione integrata dei rischi ambientali, che permettano di contestualizzare l'uso agricolo dei fanghi all'interno dell'approccio One Health, distinguendo chiaramente tra aspetti di fertilità, gestione dei rifiuti e potenziale rilevanza per l'antimicrobico-resistenza.

Nel loro insieme, i risultati dell'azione A.4.2 contribuiranno a fornire evidenze scientifiche a supporto delle politiche regionali sull'utilizzo agricolo delle matrici organiche di origine urbana, rafforzando la capacità di valutazione preventiva dei possibili impatti ambientali senza introdurre automatismi interpretativi tra uso dei fanghi e rischio AMR.

OUTPUT DI PROGETTO

La reportistica di progetto, che il Dipartimento DAFNAE dovrà inviare alla Direzione Agroambiente è così organizzata:

1. Report delle attività realizzate nel corso dell'anno solare 2026, suddiviso per ciascuna delle due attività di progetto. Il report dovrà contenere quanto previsto nella sezione "risultati attesi" di cui sopra.
2. In caso di prolungamento delle attività di progetto oltre il 31/12/2026, report delle attività realizzate nelle fasi successive, riportante il dettaglio delle ulteriori attività svolte, e le evidenze scientifiche ricavate.

BIBLIOGRAFIA

Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M. N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F.,



& Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>

Cytryn, E. (2013). The soil resistome: the anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biology & Biochemistry*, 63, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.03.017>

European Food Safety Authority (EFSA). (2021). Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EFSA Journal*, 19(6), e06651. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6651>

Heuer, H., Schmitt, H., & Smalla, K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.009>

Thiele-Bruhn, S. (2019). Environmental risks from antibiotic residues in soil and water: A review. Umweltbundesamt (UBA), Dessau-Roßlau, Germany.

Zhu, Y.-G., Gillings, M. R., Simonet, P., Stekel, D. J., Banwart, S., & Peñuelas, J. (2018). Human dissemination of genes and microorganisms in Earth's Critical Zone. *Global Change Biology*, 24(4), 1488–1499. <https://doi.org/10.1111/gcb.14003>.

“One Health Governance in the European Union”, pubblicato dalla Direzione Generale per la Salute e la Sicurezza Alimentare dell’UE nel novembre del 2024.

“Rapporto di Monitoraggio Ambientale” di cui all’art. 18 del d.lgs. n. 152/2006 inerente all’applicazione del Quarto Programma d’Azione per le zone vulnerabili ai nitrati di origine agricola del Veneto (quadriennio 2022-2025).

Rapporto sulle vendite e sull’uso di antimicrobici negli animali (anno 2023) – Ministero della Salute. “L’uso degli antibiotici in Italia – Rapporto Nazionale 2023” (Agenzia Italiana del Farmaco - AIFA).



TEMPISTICA DI SVOLGIMENTO DELLE ATTIVITÀ (DIAGRAMMA DI GANTT)

TEMPISTICHE DELLE ATTIVITÀ	lug-26	ago-26	set-26	ott-26	nov-26	dic-26
1. Ricezione dei campioni	X					
2. preparazione, omogeneizzazione e conservazione dei campioni	X	X				
3. estrazione del DNA totale e svolgimento delle analisi biomolecolari		X	X	X		
4. integrazione dei dati microbiologici con le informazioni agronomiche e chimico-fisiche provenienti da ARPAV				X	X	
5. elaborazione bioinformatica e statistica dei risultati				X	X	X

Al termine di ogni mese si svolgerà una fase di confronto tra DAFNAE e UO Agroambiente, con l'eventuale coinvolgimento dell'IZS Ve, in cui verranno evidenziati i risultati, le criticità e i possibili adattamenti del programma di lavoro.



80c642bc



ANALISI DELLE SPESE BUDGET

Nella tabella che segue, i costi sostenuti dalla Regione del Veneto nell'ambito del presente accordo di collaborazione sono riassunti e raggruppati in funzione delle indagini svolte, delle spese vive e del personale universitario che verrà coinvolto, che la presente collaborazione intende riconoscere a finanziamento per mero ristoro delle spese sostenute.

capitolo	importo a carico Regione Veneto	importo a carico DAFNAE	note
personale a tempo indeterminato		30.000,00 €	si tratta di valorizzazioni attraverso time-sheet
personale a tempo determinato	67.500,00 €		
materiali di consumo	19.000,00 €		
missioni	3.500,00 €		
costi indiretti	10.000,00 €		comprende :personale TD, missioni, materiale Consumo, altre spese indirette collegate al progetto
TOTALE	100.000,00 €	30.000,00 €	



80c642bc

