

QUALITÀ DELL'ACQUA IN ALLEVAMENTI DI TACCHINI IN VENETO: CONFRONTO CHIMICO-FISICO E MICROBIOLOGICO TRA APPROVVIGIONAMENTO CON POZZO E CON ACQUEDOTTO

Di Martino G.¹, Piccirillo A.², Gallina A.¹, Comin D.¹, Capello K.¹, Montesissa C.², Bonfanti L.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), Legnaro (PD);

² Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA), Università degli Studi di Padova;

Summary

Limited data are available regarding the chemical-physical and microbiological quality of drinking water for turkeys in North-eastern Italy. Groundwater is frequently used as a source of supply and may be either unsuitable for drug dissolution and stability or be subjected to contaminant infiltration. Therefore, this study aimed at describing water quality in 14 turkey farms supplied with well water and 14 farms with aqueduct water. Salinity, hardness, pH, ammonia, sulphate, phosphate, nitrate, chromium, copper and iron were quantified in each sample. Total bacterial count at 22 °C and 37 °C, presence and enumeration of *Enterococcus* spp. and *E. coli*, and presence of *Campylobacter* spp. were evaluated. Water samples were collected twice per year (in winter and in summer) at 3 sampling sites: at the water source (A), in the tank where drugs are mixed for medicated water preparation (B) and at the nipple line (C). Results of chemical-physical analyses showed that the quality profile of both sources is frequently within the limit of tap water for human use. However, hardness ranged between 80-500 mg/l and in 70% of farms exceeded 200 mg/l. At site A no farms exceeded 1 mg/l of iron; however, at B-C sites one farm supplied with well water exceeded 1.3 mg/l in both seasons. At site A, microbiological quality of well and aqueduct water was mostly within the limit of tap water for human use. However, both sources had a poor microbiological quality at B and C sites (e.g. up to 4,400 CFU/100 ml of *E. coli* in well water and 1,300 CFU/100 ml in aqueduct water). *Campylobacter* spp. were rarely isolated; however, the prevalence of positivity by real time PCR was around 70% in both water sources. These preliminary findings indicate some criticisms in hardness and cleaning/disinfection procedures of pipeline, particularly in farms supplied with well water.

INTRODUZIONE

Il regolamento 852/2004/CE stabilisce i requisiti per l'acqua di abbeverata nelle produzioni animali e precisa che deve risultare "potabile o pulita, al fine di prevenire la contaminazione delle specie allevate", ma non stabilisce alcun limite di accettabilità. La mancanza di disposizioni specifiche riguardo alla qualità dell'acqua di abbeverata rappresenta a oggi un rilevante punto critico per il benessere e la sanità animale in relazione alle qualità igienico-sanitarie dei prodotti da essi derivati: l'acqua proveniente da pozzi artesiani (comune fonte di approvvigionamento idrico) potrebbe risultare contaminata a causa di infiltrazione da parte di sostanze inorganiche, fertilizzanti, batteri, contaminanti e patogeni (Rossi e Gastaldo, 2005). Inoltre, acque non idonee potreb-

bero comportare anche riduzione delle prestazioni produttive, alterazione della qualità dei prodotti e danni alle attrezzature (Enne *et al.*, 2006).

Negli ultimi anni è aumentata l'attenzione sulla problematica connessa ai contaminanti chimici e biologici nell'alimentazione animale ed è stato recentemente svolto uno studio sulla qualità dell'acqua di abbeverata negli allevamenti suinicoli del Veneto (Giacomelli *et al.*, 2014), ma resta una sostanziale carenza scientifica riguardo alla qualità dell'acqua nel settore avicolo. L'importanza della quantità e qualità dell'acqua nell'alimentazione zootecnica viene spesso sottovalutata, in realtà l'acqua è essenziale, sia per quantità richieste sia per costanza dei fabbisogni, intimamente coinvolta in tutte le funzioni fisiologiche e metaboliche dell'organismo animale. Studi specifici hanno dimostrato che alcune caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua influenzano negativamente l'efficacia dei farmaci (antibatterici e antielmintici) quando somministrati in veicolo acquoso. In particolare, pH, durezza e salinità non idonei possono diminuire la solubilità dei principi attivi e favorire la precipitazione degli stessi come composti insolubili, causando un sottodosaggio del farmaco (Enne *et al.*, 2006), con la possibile comparsa di fenomeni di antibiotico-resistenza nelle popolazioni batteriche.

Per quanto riguarda invece la qualità microbiologica, l'EFSA ha recentemente indicato l'acqua di abbeverata come una delle cause di contaminazione diretta da *Campylobacter* spp. per animali e uomo (EFSA, 2011), e studi sul settore avicolo hanno riportato che la somministrazione di acqua di pozzo contaminata può essere il veicolo di introduzione di *Campylobacter* in allevamenti (Zimmer *et al.*, 2003; Pérez-Boto *et al.*, 2010). A questo riguardo sono ancora scarsi i dati disponibili, sebbene *Campylobacter* rappresenti un importante agente zoonotico, per il quale la direttiva 99/2003/CE raccomanda la definizione di opportuni programmi di sorveglianza.

Sulla base di queste motivazioni è stato attuato un progetto di ricerca per il monitoraggio della qualità dell'acqua di abbeverata in un campione di allevamenti di tacchini con approvvigionamento a pozzo e ad acquedotto, omogeneamente distribuiti nel territorio della Regione Veneto. Sono stati valutati durezza, pH, salinità, ferro, rame, indici di inquinamento agricolo quali ammoniaca, nitrati e solfati, quella di cationi indicatori di inquinamento industriale quali il cromo. È stata valutata anche la qualità microbiologica dell'acqua analizzando i seguenti parametri: cariche batteriche totali a 22 °C e 37 °C e presenza e conteggio di *E. coli* ed enterococchi, quali indicatori di inquinamento fecale. Il conteggio delle colonie batteriche a 22 °C è un indicatore di scarso significato sanitario, ma è utile per valutare l'efficacia del trattamento dell'acqua, o per valutare la pulizia e l'integrità del sistema idrico di distribuzione. Un incremento nel conteggio delle colonie batteriche a 37 °C può rappresentare un segnale precoce d'inquinamento antropico e una loro presenza elevata può essere causa di malattie come gastroenteriti e infezioni della cute e delle mucose, particolarmente in animali con compromissione del sistema immunitario (Bonato, 2007). Infine, è stato valutato il ruolo dell'acqua di abbeverata quale potenziale fonte di infezione da *Campylobacter* spp.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Allo studio hanno partecipato 28 allevamenti di tacchini della Regione del Veneto

(province di Padova, Treviso, Vicenza, Verona e Venezia), 14 dei quali riforniti con acqua di acquedotto e altrettanti con acqua di pozzo quale unica fonte per l'abbeverata degli animali. In ogni azienda sono stati raccolti campioni di acqua in tre punti: dalla sorgente di approvvigionamento (punto A), in corrispondenza del sistema di medicazione dell'acqua prima dell'ingresso nel capannone (punto B) e all'inizio della linea di abbeveratoi (punto C). I campionamenti sono stati effettuati due volte nell'anno solare 2012, in corrispondenza della stagione estiva e di quella invernale. Tutti i campioni sono stati prelevati in contenitori sterili e trasportati al laboratorio a temperatura di refrigerazione e immediatamente processati per l'analisi microbiologica, conservati in frigo e processati entro 48 ore per le analisi chimico-fisiche.

Analisi chimico/fisiche

Al momento del prelievo dal pozzo per ogni campione è stata registrata la profondità del pozzo di prelievo, la temperatura dell'acqua, il pH, la conducibilità e la salinità mediante sonda YSI Model 85 (YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA).

La concentrazione di ammoniaca, è stata determinata attraverso spettrofotometrica all'indofenolo (APAT, 2003); la concentrazione dei nitrati e dei fosfati è stata determinata attraverso cromatografia ionica (APAT, 2003). La determinazione di cromo, rame e ferro è stata effettuata attraverso spettroscopia di assorbimento atomico (APAT, 2003).

Esami microbiologici

Le analisi microbiologiche sono state effettuate a partire da campioni di un litro di acqua, per la definizione della carica batterica totale a 22 °C e a 37 °C; inoltre, è stata effettuata la ricerca e conta di *Enterococcus* spp. e di *E. coli*, e la presenza di *Salmonella* spp. Non esistendo una normativa specifica per le acque di abbeverata, nel presente lavoro si è scelto di effettuare le analisi nel rispetto delle procedure ISO stabilite dalla Direttiva Europea 98/83/CE sulle acque destinate al consumo umano e recepite in Italia dal D.Lgs. n. 31/01 (Istituto Superiore di Sanità, 2007). La ricerca di *Campylobacter* spp. è stata effettuata su campioni di 2 litri di acqua. Ciascun campione, diviso in due aliquote da 1 litro, è stato analizzato con due diverse metodiche per il rilievo di *Campylobacter* spp.: isolamento in coltura e *real-time* PCR. Per l'isolamento in coltura di *Campylobacter* spp. i campioni sono stati processati seguendo i principi della metodica standard per il rilievo di *Campylobacter* termotolleranti dall'acqua (ISO 17995), alla quale sono state apportate lievi modifiche (SCA, 2002; Williams *et al.*, 2012). I campioni di acqua sono stati sottoposti a filtrazione attraverso una membrana sterile con pori del diametro di 0,2 µm (Sartorius, Goettingen, Germania) tramite un sistema di pompa a vuoto. Successivamente, ciascuna membrana singolarmente è stata inoculata in 50 ml di brodo di arricchimento selettivo Exeter (Mast Diagnostics, Merseyside, UK), e il campione ottenuto incubato a 41,5 °C in condizioni di microaerofilia. Dopo 48 ore di incubazione, un'aliquota (200 µl) di ciascuna brodocoltura è stata seminata su Karmali agar (OXOID, Basingstoke, UK), previa filtrazione passiva secondo la procedura descritta da Giacomelli *et al.* (2012). Le piastre sono state incubate per 48 ore a 41,5 °C in microaerofilia e quindi esaminate per la ricerca delle colonie tipiche di *Campylobacter* spp. Le colonie sospette sono state sottoposte a *multiplex end-point*

PCR per l'identificazione di genere e specie, secondo il protocollo di Yamazaki-Matsune *et al.* (2007).

Per la *real-time* PCR ciascuna aliquota è stata filtrata attraverso membrane sterili con pori del diametro di 0,2 μm (Sartorius). I filtri sono stati posti in provette con 5 ml di acqua deionizzata sterile e agitati vigorosamente. Un'aliquota di 3 ml della soluzione così ottenuta è stata centrifugata a 5.000 rpm per 10 minuti, mentre i rimanenti 2 ml sono stati conservati a -20 °C. Il *pellet* è stato risospeso in 200 μl di PBS e sottoposto a estrazione del DNA utilizzando l'*High Pure Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Il DNA estratto è stato sottoposto a un saggio di *multiplex real-time* PCR con sonde Taqman® e *primer* specifici per *C. jejuni* e *C. coli*, come descritto da Toplak *et al.* (2012).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Analisi chimico/fisiche

La salinità è equivalente ai solidi totali disciolti (STD), i quali vengono espressi come milligrammi di residuo fisso per litro di acqua dopo essiccamento a 180 °C. I campioni di acqua prelevati dai 14 pozzi nelle due stagioni presentavano un *range* di salinità compreso tra 129 mg/l e 758 mg/l; mentre i campioni di acquedotto tra 111 mg/l e 458 mg/l. Questi sono considerati valori limite per l'acqua di bevanda, dato che i primi effetti negativi sull'organismo sono evidenti con STD superiore a 3.000 mg/l (Rossi e Gastaldo, 2005; Enne *et al.*, 2006).

Tutti i campioni presentavano una durezza (contenuto di sali di calcio, magnesio e ioni disciolti come carbonati, bicarbonati, solfati, nitrati e cloruri) compresa tra 80 e 500 mg/l di CaCO_3 , di cui circa il 70% superava i 200 mg/l. A questo riguardo è importante sottolineare che, in funzione anche di altri fattori, come il pH e la presenza di bicarbonato, l'acqua con una durezza superiore a 200 mg/L potrebbe causare depositi e incrostazioni di carbonato di calcio nei sistemi di distribuzione e sulle superfici di contatto e interferire con la dissoluzione e l'assorbimento di Tetracicline (Enne *et al.*, 2006; Bonato, 2007).

Per quanto riguarda il pH, tutti i campioni al punto A rientravano in un *range* di accettabilità, pari a valori compresi fra 6,7 e 8,6. Sono stati invece rilevati dei valori anomali (3,7) nei punti B e C del medesimo allevamento con pozzo durante la stagione estiva. In generale acque con pH al di fuori di questo *range* possono contribuire a una minore ingestione di acqua e alimento e, di conseguenza scadenti performance produttive, all'insorgenza di turbe del metabolismo e della fertilità, diarrea, oltre alla precipitazione di alcuni farmaci somministrati con l'acqua, con possibilità di tempi di sospensione prolungati e di presenza di residui di medicinali nelle carcasse (Rossi e Gastaldo, 2005; Enne *et al.*, 2006). Inoltre, anche se il pH è soltanto uno dei vari fattori che determinano il grado di corrosione, in generale più basso è il pH, più alta è la capacità di corrosione dell'acqua. Acque particolarmente acide ($\text{pH} < 5-5,5$) possono provocare negli animali problemi all'apparato urinario e digestivo, fenomeni di demineralizzazione e fragilità scheletrica oltre a essere causa di corrosione delle tubature (Enne *et al.*, 2006). La positività per ammoniaca a livelli superiori di 1 mg/ml è stata rilevata in inverno in due aziende con acquedotto e in 3 con pozzo; in estate solo in un allevamento con

acquedotto e uno con pozzo. Tali contaminazioni, che solo in un caso hanno raggiunto i 17 mg/l, possono derivare da impianti e condutture di cemento (per rilascio), oppure possono essere una conseguenza della disinfezione con clorammina o dell'acidificazione dell'acqua (Bonato, 2007).

In nessun allevamento il ferro presentava valori superiori a 1 mg/l nel punto A, mentre nei punti B e C in un allevamento con pozzo raggiungeva 1,5 mg/l in entrambe le stagioni. Il ferro è un contaminante naturale, ma in genere la sua concentrazione non supera gli 0,3 mg/l. In conseguenza del suo impiego come coagulante (per depurazione di acqua) il ferro può aumentare nell'acqua trattata e distribuita, così come in seguito al suo rilascio dalle tubature dei sistemi di distribuzione per corrosione delle stesse. Concentrazioni superiori a 2 mg/l possono ridurre il flusso idrico nelle tubature per fenomeni di flocculazione e accelerare il processo di degradazione di antibatterici come gli Aminoglicosidi; mentre a 5 mg/l il ferro può inattivare le Tetracicline (Bonato, 2007). La maggior parte degli allevamenti presentava valori di nitrati più bassi dei limiti stabiliti per l'acqua potabile a uso umano (50 mg/l). Tuttavia, in entrambe le stagioni e in tutti i punti di prelievo, tre allevamenti con pozzo presentavano concentrazioni di nitrati comprese tra 73 e 95 mg/l, mentre in inverno un allevamento con acquedotto presentava livelli tra 89 e 102 mg/l sempre in tutti i punti di prelievo. Nelle acque superficiali la concentrazione di nitrati è in genere ridotta (0-18 mg/l), ma può raggiungere diverse centinaia di mg/l in caso di contaminazione con acque di dilavamento di scariche di rifiuti, o con reflui di origine agricola, umana, animale e industriale. Infatti, l'incremento nell'uso di fertilizzanti, la produzione e lo smaltimento dei reflui animali rappresentano i principali fattori responsabili del progressivo aumento dei livelli di nitrati nelle acque (Bonato, 2007).

Parametri microbiologici

La carica batterica totale a 37 °C e 22 °C rilevata ai punti A ha dimostrato valori frequentemente più bassi dei valori limite stabiliti per l'acqua potabile a uso umano (rispettivamente <20UFC/ml e <100 UFC/ml). Tuttavia 4 allevamenti in estate (due con pozzo e due con acquedotto) e 5 in inverno (3 con pozzo e 2 con acquedotto) superavano tale limite. Nei punti B e C invece solo 2 allevamenti con pozzo in entrambe le stagioni e 7 allevamenti con acquedotto in inverno (4 dei quali anche in estate) hanno presentato valori conformi con i limiti dell'acqua potabile. Sia in estate sia in inverno il 29% degli allevamenti (14% con acquedotto e 43% con pozzo) presentava inquinamento con *E. coli* e/o Coliformi e/o Enterococchi nel punto A. Nei punti B e C, invece, questa percentuale di contaminazione raggiungeva valori tra il 50% (inverno) e il 79% (estate) degli allevamenti con pozzo e valori tra il 21% (inverno) e il 57% (estate) degli allevamenti con acquedotto con una carica di *E. coli* fino a 4.400 CFU/100ml nell'acqua di pozzo e di 1.300 CFU/100ml nell'acqua di acquedotto. Questo dato mette in luce la necessità di migliorare le procedure di sanificazione periodica delle tubazioni, in particolare negli allevamenti con acqua di pozzo. *Salmonella* spp. è stata isolata (*S. kentucky*) nel sito A di un unico allevamento a pozzo, sia in estate sia in inverno. La positività in *real-time* PCR per *Campylobacter* spp. è stata rilevata nei diversi punti di prelievo in 6 allevamenti con pozzo (43%) e 10 con acquedotto (71%) in estate; in 10 allevamenti con pozzo (71%) e 11 con acquedotto (79%) in inverno.

Il microrganismo è stato isolato solo in inverno nel punto B e C di un allevamento con pozzo (*C. jejuni*) e nel punto B di un allevamento con acquedotto (*C. coli*). La scarsa frequenza con la quale *Campylobacter* è stato isolato evidenzia il noto limite delle metodiche di isolamento di *Campylobacter* dall'acqua, che possono esitare in sottostima della presenza del microrganismo e risultati falsamente negativi. Ciò dipende dall'estrema suscettibilità del microrganismo la cui vitalità, e di conseguenza la possibilità di isolamento in coltura, si riduce rapidamente in seguito a variazioni anche minime delle condizioni chimico-fisiche del substrato nel quale si trova. Inoltre, nell'acqua *Campylobacter* può essere presente anche nella cosiddetta forma "vitale ma non coltivabile" (*viable but not-culturable*, VBNC), la quale comporta dei cambiamenti fisiologici e morfologici che gli permettono di sopravvivere anche in condizioni avverse (Rollins e Colwell, 1986) ma non rilevabili tramite coltura batterica. Per questi motivi, nel presente studio si è scelto di affiancare alla procedura di isolamento in coltura una metodica di biologia molecolare quale la *real-time* PCR, la quale, avendo come *target* il DNA del microrganismo, è in grado di rilevarne la presenza anche in condizioni di non coltivabilità. I risultati ottenuti confermano l'importanza dell'impiego di metodiche alternative a quelle classiche per la ricerca di *Campylobacter* nell'acqua.

CONCLUSIONI

Complessivamente i dati chimico-fisici indicano delle possibili criticità per quanto riguarda la durezza dell'acqua, mentre i dati microbiologici evidenziano necessità di migliorare le procedure di sanificazione periodica delle tubazioni, in particolare negli allevamenti con pozzo.

Questi aspetti qualitativi dell'acqua rivestiranno una grande importanza per studi successivi volti a determinare il corretto dosaggio del farmaco in veicolo acquoso, tenendo in considerazione una possibile minore stabilità e solubilità del principio attivo e la massiva colonizzazione degli impianti da parte della microflora delle tubazioni.

Campylobacter spp. è stato isolato con frequenza molto sporadica, tuttavia ciò potrebbe essere imputato alla difficoltà di isolamento. Infatti, la positività in *real-time* PCR ha evidenziato elevati livelli di prevalenza in entrambe le tipologie di approvvigionamento, sia in estate sia in inverno.

RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato finanziato dal Ministero della Salute (RC IZSVe 10/11).

BIBLIOGRAFIA

1. APAT - Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici. (2003). Metodi analitici per le acque. <http://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/manuali-e-linee-guida/metodi-analitici-per-le-acque>.
2. Bonato A. (2007). Acqua e salute - Indicazioni tratte dalle linee guida dell'OMS

- sulla qualità dell'acqua destinata al consumo umano. A cura della Regione del Veneto. <http://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/acqua/file-e-allegati/documenti/acque-interne/acque-potabili/Bonato.pdf>
3. Enne G, Greppi G and M Serratoni. (2006). Il ruolo dell'acqua nell'allevamento animale. *Italian J. Agron.* 3: 519-527.
 4. European Food Safety Authority. (2011). Scientific Opinion on Campylobacter in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA J.* 9(4): 2105.
 5. Giacomelli M, Andrighetto C, Lombardi A, Martini M and A Piccirillo. (2012). A longitudinal study on thermophilic Campylobacter spp. in commercial turkey flocks in Northern Italy: occurrence and genetic diversity. *Avian Dis.* 56: 693-700.
 6. Giacomelli M, Drigo M, Pasotto D, Piccirillo A, Menandro ML, Ribaud G, Zago G and C Montesissa. (2014). Studio baseline sulla qualità microbiologica e chimico-fisica dell'acqua di abbeverata in allevamenti suini in Veneto. Atti del XL Meeting annuale SIPAS, 27-28 marzo 2014, Montichiari (BS).
 7. Istituto Superiore di Sanità. (2007). Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici. Rapporti ISTISAN 07/5.
 8. Pérez-Boto D, García-Pena FJ, Abad-Moreno JC, Hurtado-Pizarro MD, Pérez-Cobo I and MA Echeita (2010). Drinking water as the source of Campylobacter coli infection in grandparent heavy breeders. *Avian Pathol.* 39: 483-487.
 9. Rollins DM and RR Colwell (1986). Viable but nonculturable stage of Campylobacter jejuni and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol.* 52: 531-538.
 10. Rossi P and A Gastaldo (2005). Un'abbeverata di qualità per animali in perfetta salute. *Agricoltura.* Luglio/agosto, 141-143.
 11. Standing Committee of Analysts (2002). The microbiology of drinking water – part 10 – Methods for the isolation of Yersinia, Vibrio and Campylobacter by selective enrichment, Nottingham, UK, The Environment Agency. <http://www.environment-agency.gov.uk/static/documents/Research/mdwpart10.pdf>
 12. Toplak N, Kovač M, Piskernik S, Možina SS and B Jeršek (2012). Detection and quantification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli using real-time multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 112: 752-764.
 13. Williams LK, Sait LC, Cogan TA, Jørgensen F, Grogono-Thomas R and TJ Humphrey (2012). Enrichment culture can bias the isolation of Campylobacter subtypes. *Epidemiol Infect.* 140: 1227-1235.
 14. Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K, Kawahara R, Kawatsu K, Kumeda Y, Kitazato M, Nukina M, Misawa N and T Tsukamoto (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter hyointestinalis subsp. hyointestinalis, Campylobacter jejuni, Campylobacter lari and Campylobacter upsaliensis. *J. Med. Microbiol.* 56: 1467-1473.
 15. Zimmer M, Barnhart H, Idris U and MD Lee (2003). Detection of Campylobacter jejuni strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens. *Avian Dis.* 47: 101-107.