

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali

Scuola di Dottorato di Ricerca in Territorio, Ambiente, Risorse e Salute

- *CICLO XXVI* -

**SALUTE PUBBLICA E PATOGENI EMERGENTI IDROTRASMESSI:
IMPLEMENTAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI MONITORAGGIO E TUTELA DELLA QUALITÀ
DELLE RISORSE IDROPOTABILI LUNGO LE FILIERE IDRICHE.**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Mario Aristide Lenzi

Supervisore: Ch.mo Prof. Gianumberto Caravello

Dottoranda: Irene Amoruso

Indice

Riassunto.....	4
Synopsis.....	5
Indice delle abbreviazioni.....	6
SEZIONE I - Introduzione.....	7
1.I patogeni emergenti <i>G. duodenalis</i> e <i>C. parvum</i>	8
1.1 Patogeni emergenti e riemergenti.....	8
1.2 Le parassitosi protozoarie come infezioni idrotrasmesse emergenti.....	10
1.3 <i>Giardia duodenalis</i>	12
1.3.1 Tassonomia e nomenclatura.....	12
1.3.2 Ciclo vitale ed elementi di biologia cellulare.....	14
1.3.3 Aspetti clinici della giardiasi.....	16
1.4 <i>Cryptosporidium parvum</i>	18
1.4.1 Nomenclatura e tassonomia.....	18
1.4.2 Ciclo vitale ed elementi di biologia cellulare.....	20
1.4.3 Aspetti clinici della criptosporidiosi.....	20
1.5 Il contesto mondiale.....	23
1.5.1 Nord America.....	24
1.5.2 Regno Unito.....	25
1.6 Lo scenario italiano.....	25
1.6.1 Dati epidemiologici.....	25
1.6.2 <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> nelle risorse idriche.....	27
1.7 Panoramica sui metodi analitici disponibili.....	29
1.7.1 Ricerca delle (oo)cisti in campioni fecali.....	29
1.7.2 Ricerca delle (oo)cisti nelle matrici ambientali.....	31
2.Analisi del rischio: scopi e principi applicativi.....	32
SEZIONE II – Materiali e metodi.....	35
3.Il sito sperimentale: la filiera idrica integrata di Padova.....	36
3.1 Il sito di captazione dell'acquedotto padovano: le risorgive di Villaverla.....	36
3.2 La storia idrogeologica dell'acquifero dell'Alto Vicentino.....	39
3.3 Il bilancio idrologico.....	40
3.4 La storia dell'acquedotto di Padova.....	42
3.5 L'acquedotto moderno.....	44
3.6 Il sistema fognario e la depurazione.....	47
3.6.1 Il depuratore di Ca' Nordio.....	51
3.7 Il corpo idrico recettore: il fiume Bacchiglione.....	52
4.Il monitoraggio della filiera idrica integrata: i siti di campionamento.....	56
4.1 Acquifero dell'Alto Vicentino.....	56
4.2 Filiera di approvvigionamento dell'acqua potabile.....	58
4.2.1 Sala Sorgenti.....	61
4.2.2 Partitore.....	61
4.2.3 Canaletta a pelo libero.....	61
4.2.4 Nodo pre-distribuzione.....	64
4.2.5 Canale Brentella.....	64
4.3 Sistema fognario.....	64
4.3.1 Collettore Intervento 10.....	66
4.3.2 Collettore Forcellini.....	66

4.3.3 Collettore ZIP.....	66
4.3.4 Collettore Fossetta.....	66
4.3.5 Depuratore Ca' Nordio: ingresso.....	70
4.3.6 Depuratore Ca' Nordio: effluente.....	70
4.4 Corpo idrico recettore.....	70
4.4.1 Ponte dei Sabbionari.....	71
4.4.2 Lungargine Donati.....	72
4.4.3 Bovolenta.....	72
4.4.4 Ca' Bianca.....	72
4.4.5 Foce del Brenta-Bacchiglione.....	72
4.5 Aree balneabili marino-costiere.....	75
4.5.1 Spiaggia di Isolaverde.....	77
4.5.2 Spiaggia di Brondolo.....	77
5. Metodiche analitiche.....	78
5.1 Protocolli analitici sperimentali: prove di laboratorio.....	78
5.1.1 Filtrazione su Cartuccia in Polipropilene (FCP).....	79
5.1.2 Filtrazione su Membrana in Nitrocellulosa (FMN).....	80
5.2 Protocolli analitici sperimentali: prove sul campo.....	82
5.3 Metodiche operative.....	82
5.4 Protocollo di immunostaining.....	82
5.5 Analisi integrative.....	83
5.5.1 Parametri e metodi microbiologici.....	83
5.5.2 Metodi molecolari.....	86
6. Valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio di contaminazione protozoaria	87
6.1 Database delle epidemie di giardiasi e criptosporidiosi.....	87
6.2 Indice di Rischio Contaminazione Protozoaria delle Risorse Idropotabili.....	88
SEZIONE III – Risultati e discussione.....	91
7. Risultati I – Metodiche analitiche.....	92
7.1 Efficienza di recupero del protocollo FCP.....	92
7.2 Efficienza di recupero del protocollo FMN.....	93
7.3 Risultati delle prove su campo.....	94
7.4 Metodica operativa FCP per la detezone di <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i>	96
7.5 Metodica operativa FCPsed.....	98
8. Risultati II – Monitoraggio della filiera idrica integrata di Padova.....	100
8.1 Organizzazione dei risultati analitici.....	100
8.2 Acquifero dell'Alto Vicentino.....	100
8.3 Filiera di approvvigionamento dell'acqua potabile.....	102
8.3.1 Sala Sorgenti.....	104
8.3.2 Partitore.....	104
8.3.3 Canaletta a pelo libero.....	104
8.3.4 Nodo pre-distribuzione.....	105
8.3.5 Canale Brentella.....	106
8.4 Sistema fognario.....	108
8.4.1 Collettore ZIP.....	109
8.4.2 Collettore Fossetta.....	109
8.4.3 Collettore Intervento 10.....	110
8.4.4 Collettore Forcellini.....	110
8.4.5 Depuratore Ca' Nordio: ingresso.....	110
8.4.6 Depuratore Ca' Nordio: effluente.....	111

8.5	Corpo idrico recettore.....	112
8.5.1	Ponte dei Sabbionari.....	113
8.5.2	Lungargine Donati.....	114
8.5.3	Ponte di Bovolenta.....	114
8.5.4	Ca' Bianca.....	114
8.5.5	Foce.....	114
8.6	Aree balneabili marino-costiere.....	115
8.6.1	Spiaggia di Isolaverde.....	115
8.6.2	Spiaggia di Brondolo.....	115
8.7	Quadro d'insieme.....	116
9.	Risultati III – Database GCDB e Indice IRCPRI.....	120
9.1	Giardiasis and Cryptosporidiosis database.....	120
9.2	Indice di Rischio di Contaminazione Protozoaria delle Risorse Idropotabili.....	120
10.	Discussione.....	121
10.1	Confronto con la bibliografia nazionale e internazionale.....	121
10.2	Alcune considerazioni circa i metodi analitici.....	124
10.3	Conclusioni e prospettive preliminari.....	126
11.	Bibliografia.....	129

Riassunto

Il presente progetto di ricerca dottorale verte sulla valutazione del ruolo ecologico ed epidemiologico che alcuni patogeni emergenti idrotrasmessi, i protozoi *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium parvum*, rivestono all'interno delle filiere idriche integrate. Entrambi i protozoi presentano una forma di resistenza ambientale, denominata rispettivamente cisti per *Giardia* e oocisti per *Cryptosporidium*, che conferisce loro una maggiore capacità di sopravvivere sia ai convenzionali trattamenti di potabilizzazione dell'acqua che a quelli di depurazione del refluo. Il pericolo che essi rappresentano come contaminanti delle risorse idropotabili consiste dunque nella loro potenziale capacità di dare luogo a focolai epidemici di sindromi gastroenteriche, sia a livello dell'intera comunità che fruisce del servizio idrico, che degli eventuali frequentatori di aree balneabili soggette a contaminazione. In primo luogo si è condotta un'approfondita ricerca bibliografica volta a determinare lo stato dell'arte sul tema: essa ha consentito di individuare le molteplici linee di ricerca già perseguite nell'ambito descritto, ottenendo così un quadro complessivo che delinea, sia a livello internazionale che nazionale, l'ambito conoscitivo noto circa i due suddetti patogeni emergenti. Contestualmente si è ottenuta anche una panoramica sulle differenti metodiche analitiche disponibili per la detezione di *Giardia* e *Cryptosporidium* nelle matrici ambientali. I protocolli descritti in letteratura, per lo più derivanti dalle metodiche impiegate nella parassitologia clinica, non sono risultati compatibili con un'attività di monitoraggio ambientale routinaria. Il motivo principale di tale inadeguatezza risiede principalmente nei costi troppo elevati degli stessi. All'interno di tale cornice teorica è emersa innanzitutto la necessità di realizzare una nuova metodica per la detezione delle (oo)cisti protozoarie nelle acque, caratterizzata da costi più contenuti, ma pur soddisfacentemente versatile, efficiente, sensibile e specifica. Il protocollo analitico implementato, denominato *metodica della filtrazione su cartuccia in polipropilene* (FCP), è stato utilizzato per la valutazione preliminare della qualità dell'acquifero di attingimento dell'Alto Vicentino ed in seguito impiegato per il monitoraggio della filiera idrica integrata che serve la città di Padova, selezionata come sistema sperimentale. La rete di monitoraggio di tale filiera è stata ricamata grazie alla selezione strategica di 18 siti di campionamento che consentono di ottenere una visuale complessiva dell'intero sistema, che nel complesso si compone di: filiera di distribuzione dell'acqua potabile (5 siti), sistema di allontanamento e depurazione del refluo civile (6 siti), corpo idrico recettore (5 siti) e, da ultimo, aree marino-costiere balneabili prospicienti la foce dello stesso (2 siti). Come attività corollaria, si è poi fruito dei numerosi *case-report* reperibili in letteratura che descrivono epidemie di giardiasi e criptosporidiosi, innescate o dall'ingestione di acqua infetta o dalla balneazione in acque contaminate, per la creazione di un database epidemiologico relativo al periodo 1954-2012 e denominato *Giardiasis & Cryptosporidiosis Database* (GCDB). Tale database consente non solo la catalogazione sistematica e la consultazione interattiva degli eventi epidemici, ma è stato sfruttato per implementare un modello predittivo capace di stimare il Rischio di Contaminazione Protozoaria delle Risorse Idropotabili tramite il computo di un apposito indice numerico (IRCPRI).

Synopsis

The present research project mainly focuses on the assessment of the eco-epidemiological role played by two emerging waterborne pathogens, *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum*, within the integrated urban water supply & management chain. While in the water environment, both protozoa develop a resistance form that grants them enhanced protection against the most commonly adopted drinking water and wastewater treatments. The two resistance forms are called *cyst* for *Giardia* and *ooocyst* for *Cryptosporidium*, respectively. As water resources contaminants, the two protozoa figure as etiologic agents of two peculiar gastrointestinal parasitic infections, giardiasis and cryptosporidiosis, that can give rise to outbreaks both within the polluted waterworks served community and among people eventually swimming in contaminated recreational waters. An exhaustive bibliographic research has been carried out in order to fully characterize the state of the art on the *Giardia* and *Cryptosporidium* topic. Integrated data coming from a wide range of studies provided a detailed picture that describes both the national and international background by focusing on the two protozoa relevance, both under environmental and public health aspects. A compilation of reported analytical methods for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* (oo)cysts in water samples was also obtained. Available protocols were mainly derived from clinical parasitology methods and resulted unfit for any environmental monitoring activity. The core factor being responsible for this incompatibility was identified as method expensiveness, that proved to be too high for routine sample analysis. Within this theoretical background, the first goal was that of creating a novel analytical protocol for the detection of protozoa (oo)cysts in waters, compliant with target cost-effectiveness, sensibility, specificity, efficiency and versatility criteria. The operative procedure subsequently named *Polypropylene-cartridge filtration method* (PCF) was then implemented: first validated during a pilot survey of the Alto Vicentino aquifer, it was subsequently adopted for the monitoring program of the integrated urban water chain of Padua city (Italy), selected as main experimental model. The monitoring network is composed by 18 sampling sites and provides full insight of the presence and persistence of *Giardia* and *Cryptosporidium* along the whole system. In detail, investigated chain segments were: drinking water supply system (5 sites); sewage system and wastewater treatment plant (6 sites); receiving water body (5 sites) and marine recreational waters flanking the mouth of the river (2 sites). As additional and complementary activity, case-report studies about giardiasis and cryptosporidiosis outbreaks were collected and processed for the creation of the Giardiasis & Cryptosporidiosis Database (GCDB). Data inserted in the GCDB cover the period 1954-2012. However, they are not merely catalogued and interactively consultable, but were also used for the implementation of a predictive model for the estimate of an Index for the Water Resources Protozoan Contamination Risk (WRPPCI).

Indice delle abbreviazioni

AE	Abitanti equivalenti
CAC	Codex Alimentarius Commission
CGDB	Giardiasis & Cryptosporidiosis Database
CIB	Centro Idrico Brentelle
CMT	Conta Microbica Totale
DWO	Drinking Water Outbreaks
EB	Elution buffer
ER	Efficienza di recupero
FAO	Food and Agriculture Organization
FCP	Filtrazione su Cartuccia in Polipropilene
FMN	Filtrazione su Membrana in Nitrocellulosa
ICPRI	Indice di Contaminazione Protozoaria delle Risorse Idriche
IF	Immunofluorescenza
mAb	Monoclonal antibody
MF	Membrane Filtration
MRA	Microbiological Risk Assessment
NTU	Nephelometric Turbidity Units
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
PCA	Plate Count Agar
PBS	Phosphate buffer saline
PP	Polipropilene
RWO	Recreational Waters Outbreaks
SDS	Sodio-dodecil-solfato
SISP	Servizio di Igiene e Sanità Pubblica
UFC	Unità Formanti Colonia
ZIP	Zona Industriale di Padova

SEZIONE I - Introduzione

1. I patogeni emergenti *G. duodenalis* e *C. parvum*

Il presente progetto di ricerca si articola nell'ambito concettuale della moderno management olistico delle risorse idropotabili e, nel suo complesso, si concentra sulla caratterizzazione del ruolo epidemiologico ed ecologico che due patogeni enterici emergenti, i protozoi idrodiffusi *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium parvum*, rivestono all'interno della filiera idrica integrata che serve la città di Padova.

1.1 Patogeni emergenti e riemergenti

L'elevato ritmo di sviluppo umano e la rapida crescita demografica mondiale che stanno caratterizzando la nostra epoca esercitano una pesante pressione antropica sull'ambiente, che si compone di molteplici fattori spesso tra loro interagenti. Le risorse idropotabili costituiscono un'interfaccia tra la salute umana e quella ambientale tanto importante quanto fragile e, in tale contesto, rappresentano uno dei punti più vulnerabili dell'intero ecosistema.

Le malattie infettive idrotrasmesse o, con terminologia anglosassone, le *waterborne infections*, rappresentano di fatto una delle principali cause di morbilità e mortalità a livello mondiale. Esse arrivano a mietere 1.8 milioni di vittime all'anno, di cui il 90% sono bambini (WHO, 2004).

Nonostante una larga porzione di tale infezioni sia causata da patogeni idrotrasmessi per così dire classici, già ben caratterizzati, di recente sono stati isolati nuovi microrganismi che apportano ulteriori sfide al quel settore della salute pubblica intimamente connesso al celebre trinomio WASH costituito da Acqua, Servizi Sanitari ed Igiene (ing. *Water, Sanitation and Health*). Tra il 1972 ed il 1999, sono stati scoperti 35 nuovi agenti eziologici e, in aggiunta, altri microrganismi sono riemersi dopo lunghi periodi silenti (WHO, 2003). L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce i patogeni emergenti come “*apparsi per la prima volta in una popolazione umana negli ultimi 30 anni, oppure già rinvenuti in precedenza, ma caratterizzati da un'incidenza crescente e/o dall'espansione in areali geografici nei quali non sono mai stati precedentemente notificati*” (WHO, 1997). Coerentemente, si trova un definizione anche per un gruppo di patogeni definiti come *riemergenti*, ovvero quelli che “*in seguito ad un cambiamento a lungo termine riscontrato nella loro epidemiologia, vanno ad aumentare la propria incidenza a livello delle popolazioni umane*” (Woolhouse, 2002).

Secondo tali criteri, l'elenco più aggiornato dei patogeni emergenti consta di 175 diverse specie di microrganismi, che includono batteri (e.g. *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Bartonella henselae*, *Ehrlichia* spp.), virus (e.g. HIV-1, HIV-2, virus dell'epatite C, E, F e G, Sin Nombre virus), prioni (prione della BSE), protozoi (e.g. *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*), elminti (e.g. *Metorchis conjunctus*, *Gymnophalloides seoi*) e funghi microscopici (e.g. *Encephalitozoon intestinalis*, *Scenedosporium prolificans*) (Desselberger, 2000; Taylor et al., 2001; WHO, 2003) (Fig. 1).

Degno di nota come circa il 75% di codesto gruppo sia composto da specie zoonotiche (Slingenbergh et al., 2004).

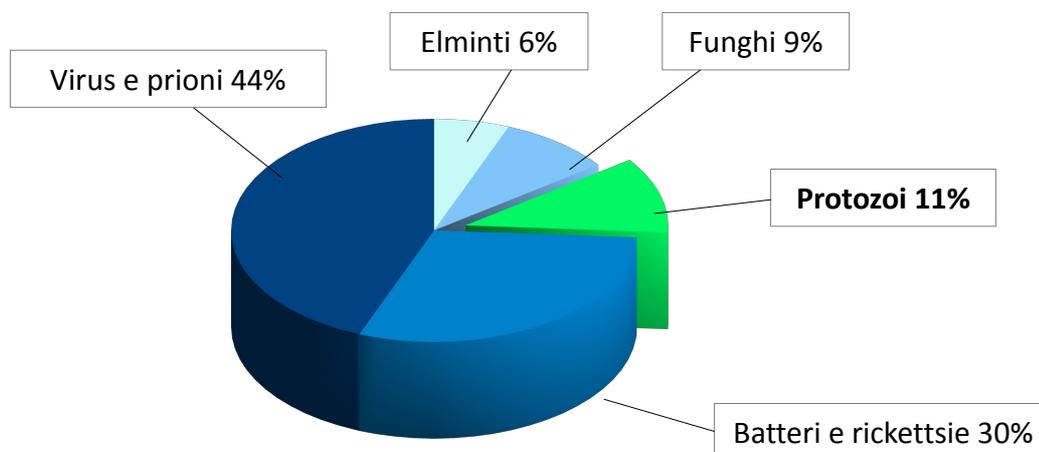


Fig. 1: Distribuzione per gruppo dei patogeni emergenti. Il grafico riporta le percentuali indicative delle diverse categorie di appartenenza dei patogeni emergenti (adattata da Taylor et al., 2001).

Sono stati identificati sei fattori responsabili dell'emergenza e della riemersione di tali microrganismi patogeni e, di conseguenza, delle sindromi infettive da essi causate. Si tratta di fattori prettamente antropici, legati prevalentemente agli sviluppi socio-culturali intrapresi a partire dal secondo dopoguerra (Institute of Medicine, 1992):

- cambiamenti profondi nei trend demografici
- rapido avanzamento tecno-industriale
- incremento del commercio e dei viaggi internazionali
- pesanti modifiche a carico dell'ambiente e dell'uso del suolo
- programmi di salute pubblica non adeguati
- adattamento evolutivo dei patogeni

Gran parte di tali fattori va di fatto ad incrementare la vulnerabilità delle popolazioni umane a determinate malattie infettive, nonché ad accrescere il loro livello di esposizione ai patogeni in questione (Cohen, 2000). Nel caso delle sindromi infettive veicolate da acqua ed alimenti, i fattori di emergenza hanno destato un interesse ancor maggiore, in quanto essi risultano interagire sinergicamente ed in maniera ancor più impattante: essi coinvolgono infatti, oltre all'aspetto clinico, anche delle complesse dinamiche ecologiche, zoonotiche e culturali.

D'altra parte lo studio retrospettivo della storia di molte sindromi infettive mostra con chiarezza come lo sviluppo parallelo dell'uomo e dei patogeni umani costituisca un ottimo esempio di co-evoluzione (Gagneux, 2012). I fenomeni di migrazione delle popolazioni umane, ad esempio, hanno portato alla disseminazione intercontinentale di numerose malattie infettive che in precedenza erano rimaste confinate in determinate aree geografiche. Gli stessi cambiamenti climatici possono consentire l'espansione dell'areale diffusivo di alcuni patogeni,

così come le moderne tecniche di allevamento intensivo o le modifiche delle abitudini alimentari possono facilitare l'insorgenza e la disseminazione di sindromi zoonotiche.

E' vero anche che la sempre più frequente scoperta di nuovi patogeni non sia imputabile unicamente ad un rapido ed esteso deterioramento della salute ecosistemica globale, quanto anche all'incredibile sviluppo tecnologico, e di conseguenza della risoluzione analitica, dei metodi di detezione e di diagnosi (WHO, 2003).

1.2 Le parassitosi protozoarie come infezioni idrotrasmesse emergenti

Anche lo sviluppo della conoscenza in merito alle sottili relazioni che legano la salute umana alla qualità dell'acqua è stato marcato dalla periodica identificazione di nuovi patogeni, oltre che dalla sempre più approfondita comprensione delle dinamiche di contaminazione e trasmissione da parte dei patogeni già noti (WHO, 2003).

Prima del 1960 la quasi totalità delle infezioni gastrointestinali veicolate da acqua ed alimenti era correlata ad agenti eziologici di tipo batterico, come ad esempio *Salmonella enterica*, *Clostridium botulinum*, e *Staphylococcus aureus*. Nel corso degli anni '60 vennero isolati sia *Clostridium perfringens* che *Bacillus cereus*, ma ancora si trattava di batteri. I primi virus enteropatogeni trasmessi mediante l'ingestione di acqua ed alimenti contaminati, *Norovirus* e *Rotavirus*, vennero identificati negli anni '70. Tra gli anni '80 e '90 si delineò con maggior precisione il ruolo di alcuni altri procarioti enteropatogeni, quali *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*, ma soprattutto vennero inseriti nella lista degli emergenti anche alcuni protozoi parassiti, tra cui *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* e *Cyclospora cayetanensis* (Newell et al., 2010). Sebbene le parassitosi trasmesse da acqua e alimenti abbiano ad ora ricevuto minor attenzione rispetto a quelle di eziologia batterica, è comprovato che, a livello mondiale, esse constano di milioni di casi all'anno e che, soprattutto se trascurate, portino sovente ad un esito letale (Broglia and Kapel, 2011).

Tra i patogeni emergenti si annoverano ad oggi diversi elminti e protozoi. Anche nel caso delle parassitosi emergenti è possibile imputare la loro comparsa sia al repentino mutamento dello scenario di esposizione della popolazione umana, legato alle nuove abitudini alimentari, al commercio internazionale e, significativamente, alla crescente richiesta di acqua per l'uso ed il consumo umano, ma anche al potenziamento dei test diagnostici (Broglia and Kapel, 2011).

Sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo, i protozoi enteropatogeni emergenti idrodiffusi più comuni appartengono ai generi *Giardia* e *Cryptosporidium* (Nygard et al., 2006). Entrambi i parassiti vengono veicolati da acqua ed alimenti contaminati, e quindi trasmessi lungo la via di infezione oro-fecale, nelle loro forme di resistenza ambientale, denominate rispettivamente cisti ed oocisti (Spinelli et al., 2006). Le parassitosi enteriche di cui i due protozoi sono responsabili, la giardiasi e la criptosporidiosi, sono altresì classificabili come zoonosi e, in quanto tali, compaiono come comuni infezioni parassitiche sia di animali domestici quali il cane ed il gatto, che della fauna selvatica. Quest'ultima, se infetta, contribuisce alla contaminazione ambientale mediante la dispersione di cisti ed oocisti tramite

l'espulsione delle feci (Gomez-Couzo et al., 2005).

Giardiasi e criptosporidiosi, al pari delle altre infezioni idrotrasmesse, possono dare luogo a delle vere e proprie epidemie comunitarie che, nel caso di distribuzione di acqua contaminata da parte di un sistema acquedottistico, vanno ad interessare l'intera comunità servita. Le fonti di approvvigionamento idrico sono comunemente rappresentate da fiumi, invasi artificiali, laghi o falde sotterranee: la contaminazione di tali risorse avviene mediante diversi meccanismi, quali la contaminazione fecale diretta, il dilavamento del suolo o ancora la contaminazione crociata, chiaramente involontaria, con il sistema fognario. Si va così ad instaurare un ciclo di infezione che, nel complesso, interessa l'ambiente, l'uomo e la fauna (Almeida, 2010).

Giardia e *Cryptosporidium* possiedono un vantaggio selettivo rispetto ad altri microrganismi contaminanti, quali, ad esempio, coliformi ed enterococchi. Tale vantaggio risiede nell'elevata resistenza che le (oo)cisti dei due protozoi esibiscono nei confronti dei comuni trattamenti di disinfezione, operati sia a livello della potabilizzazione dell'acqua che di depurazione del refluvo fognario. I moderni impianti di trattamento impiegano tecnologie chimico-fisiche per l'abbattimento della carica microbica indesiderata che, in origine, erano state calibrate per risultare efficaci nei confronti dei contaminanti classici. La crescente richiesta idrica fa sì che le fonti selezionate per l'approvvigionamento umano siano in numero sempre maggiore e, di frequente, qualitativamente non ottimali. Le forme di resistenza di *Giardia* spp. e di *Cryptosporidium* spp. si mostrano però non sensibili ai comuni disinfettanti idrici quali il cloro ed i suoi composti, o quantomeno non lo sono ai dosaggi impiegati negli impianti di trattamento. Basti pensare che, in Italia, il limite di legge contemplato dal D.Lgs. 31/2001 e s.m. per la massima concentrazione di cloro libero ammissibile nelle acque potabili è pari a 0.20 mg/l, ma che le cisti di *Giardia*, in condizioni di pH e temperatura standard, vengono uccise dal disinfettante unicamente in seguito a 10' di esposizione ad una concentrazione di 1.5 mg/l (Jarroll et al., 1981). *Cryptosporidium* mostra una cloro-resistenza addirittura più elevata, così pure come una maggior capacità di resistere ai danni ossidativi indotti dall'ozonizzazione (Finch and Belosevic, 2002).

Oltre alla peculiare resistenza ai disinfettanti esibita dalle (oo)cisti dei due protozoi, va menzionata anche la loro eccezionale capacità di sopravvivere nell'ambiente acquatico: si stima che le cisti di *Giardia* possano sopravvivere nelle acque superficiali per almeno 60, giorni ad una temperatura di 8 °C, mentre le oocisti di *Cryptosporidium*, ad una temperatura di 4 °C, resistono senza subire alcun danno addirittura per 12 mesi (Nasser et al., 2007).

Dal momento che la presenza di (oo)cisti è documentata come ubiquitaria nelle acque superficiali (Leclerc et al., 2002), ma che in alcuni casi sia stata evidenziata anche in acque telluriche (Watanabe et al., 2005), si ritiene che nessuna risorsa idrica destinata all'uso ed al consumo umano sia virtualmente protetta da eventi di contaminazione protozoaria. Diversi studi hanno poi evidenziato come non sembri sussistere alcuna relazione tra i livelli di concentrazione assunti dalle (oo)cisti protozoarie e quelli dei parametri indicatori classici, e.g. coliformi totali, *Escherichia coli*, enterococchi fecali e clostridi (Bonadonna et al., 2002; 2004). Da queste ultime considerazioni emerge una pressante esigenza di valutare

l'implementazione e l'introduzione di nuovi parametri indicatori per il controllo della qualità delle acque che contemplino in modo mirato i criteri e le dinamiche proprie della contaminazione parassitologica (Katz et al., 2006).

1.3 *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis è uno dei più rilevanti protozoi enteropatogeni umani. *Giardia* è endemica in molte regioni del pianeta e rappresenta un grave problema di salute pubblica, soprattutto nei paesi in via di sviluppo. *Giardia* rappresenta il principale agente eziologico delle parassitosi intestinali infantili, causando all'incirca 10^8 nuovi casi di giardiasi all'anno. L'OMS, che classifica la giardiasi come la sindrome diarroica parassitica maggiormente diffusa, fornisce una stima di 200 milioni di individui sintomatici a livello mondiale (Aguilar-Diaz, 2011).

1.3.1 *Tassonomia e nomenclatura*

Secondo la tassonomia moderna, il genere *Giardia* appartiene al phylum Metamonada Grassé, 1952 stat. nov. et emend. Cavalier-Smith, 1981; classe Trepomonadea; ordine Diplomonadida e famiglia Hexamitidae (Thompson and Moni, 2011). I membri di questa famiglia di protozoi flagellati sono sprovvisti di mitocondri e perossisomi, possiedono organelli citoplasmatici presenti a coppie e, similamente, due nuclei gemelli, entrambi trascrizionalmente attivi (Morrison et al. 2007). Nello specifico, *Giardia* si distingue per la sua caratteristica forma a pera, la presenza di quattro paia di flagelli e di due corpi mediani, oltre che di un peculiare organello di attracco, denominato ventosa ventrale.

In realtà, la tassonomia di *Giardia* è oggetto di dibattito da ben più di 100 anni, con il risultato di una nomenclatura tutt'altro che univoca, ma che, anzi, è arrivata più volte a riportare nomi diversi per una stessa specie. Da qui ne deriva un certo grado di confusione in merito all'esatta epidemiologia della giardiasi ed, in particolare, al livello di specificità d'ospite e del contributo zoonotico effettivo (Thompson and Monis, 2011).

Giardia duodenalis venne descritta per la prima volta nel 1681 dal naturalista olandese Antoni van Leeuwenhoek (Delft, 24.10.1632 – 27.08.1723), mentre egli stava osservando al microscopio un campione delle proprie feci. Vilém Dušan Lambl (Lettin, 05.12.1824 – 12.02.1895), un medico cecoslovacco, osservò di nuovo *Giardia* nel 1859, annotandola nei suoi appunti con il nome di *Cercomonas intestinalis*. Lambl ne fornì una descrizione altamente dettagliata, tanto che il protozoo venne successivamente classificato come *Giardia lamblia* in suo onore. Il termine *Giardia* venne in realtà impiegato per la prima volta nel 1882 da Kunstler, per descrivere alcuni flagellati provenienti dall'intestino dei girini di alcuni anuri, denominati *Giardia agilis*. Sei anni dopo, nel 1888, Blanchard promosse per contro l'introduzione di *Lamblia* come nome indicativo del genere. Solamente nel 1914 le due terminologie, *Giardia* Kunstler - 1882 e *Lamblia* Blanchard - 1888, vennero decretate sinonimiche e il primato venne più correttamente riattribuito alla dicitura *Giardia* (Alexeieff,

1914; Kofoid and Christiansen, 1915; Kofoid, 1920).

Nonostante *Giardia* possenga un aspetto insolito che la rende facilmente distinguibile da tutti gli altri protozoi, si riscontra la quasi totale assenza di caratteristiche morfologiche che, a livello intra-generico, rende alquanto ardua la distinzione tra specie differenti. Si trova che, a partire dal 1959, ben 51 specie di *Giardia* siano state descritte, di cui due nell'uomo, 28 in altri mammiferi, una nei pesci, 14 negli uccelli, 4 negli anfibi e due nei rettili (Thompson and Monis, 2004; 2011). Ad ogni modo è risultato evidente che ci si trovasse di fronte ad un caso di polinomia, correlato in taluni casi all'osservazione e descrizione indipendenti di una stessa specie con specificità d'ospite non ristretta. A riprova di ciò, va precisato che, mediante microscopia ottica, sono solamente tre le specie morfologicamente distinguibili, ovvero *G. agilis* degli anfibi, *G. muris* dei roditori e *G. duodenalis*, comune a uomo, mammiferi ed uccelli (Filice, 1952). La recente introduzione di tecniche molecolari ha iniziato a svelare come in realtà, anche all'interno della specie *G. duodenalis*, siano presenti numerosi genotipi differenti, dei quali soltanto alcuni sono di fatto stati isolati negli esseri umani (Miliotis and Bier, 2003). *G. duodenalis* sembra di fatto consistere in un complesso di specie affini, ma genotipicamente distinguibili. Tali sotto-specie vengono chiamate *assemblaggi* e possono essere discriminate grazie a tecniche elettroforetiche (analisi degli zimodemi) e molecolari (RFLP, multilocus-genotyping, sequenziamento, ecc.) (Miliotis and Bier, 2003).

Species	Major host(s)
<i>G. agilis</i> Kunstler, 1882	Amphibians
<i>G. ardeae</i> Noller, 1920.....	Birds
<i>G. microti</i> Benson, 1908.....	Muskrats and voles
<i>G. muris</i> Benson, 1908	Rodents
<i>G. psittaci</i> Erlandsen and Bemrick, 1987.....	Birds
<i>G. varani</i> Lavier, 1923 ^a	Lizards
<i>G. duodenalis</i> Davaine, 1875	Mammals
Assemblage A (= <i>G. duodenalis</i> sensu stricto ^{?b})	Humans, nonhuman primates, domestic and wild ruminants, alpacas, pigs, horses, domestic and wild canines, cats, ferrets, rodents, marsupials, other mammals
Assemblage B (= <i>G. enterica</i> ^{?b})	Humans, nonhuman primates, cattle, dogs, horses, rabbits, beavers, muskrats
Assemblage C (= <i>G. canis</i> ^{?b}).....	Domestic and wild canines
Assemblage D (= <i>G. canis</i> ^{?b})	Domestic and wild canines
Assemblage E (= <i>G. bovis</i> ^{?b}).....	Domestic ruminants, pigs
Assemblage F (= <i>G. cati</i> ^{?b}).....	Cats
Assemblage G (= <i>G. simondi</i> ^{?b}).....	Mice, rats
Assemblage H.....	Seals

Tab. 1: Specie riconosciute di *Giardia* e assemblaggi di *Giardia duodenalis*. a. caratterizzazione molecolare in corso. b. nomenclatura proposta (da: Feng and Xiao, 2011).

1.3.2 Ciclo vitale ed elementi di biologia cellulare

Il ciclo vitale di molti protozoi parassiti prevede l'alternanza di due forme: vi è una forma di resistenza ambientale, con capacità infettiva, denominata cisti, ed una forma vegetativa, detta trofozoite, la quale, grazie alla sua motilità, è capace di colonizzare le pareti intestinali dell'ospite (Aguilar-Diaz, 2011) (Errore: sorgente del riferimento non trovata). Anche *Giardia* possiede un ciclo vitale che prevede l'alternanza di due forme alterne (Fig. 3): l'infezione ha origine in seguito all'ingestione accidentale delle cisti.

Queste, dopo aver attraversato l'ambiente acidico caratteristico del tratto gastrico ed essere state condizionate dagli enzimi pancreatici e da altre proteasi endogene, intraprendono il processo di eccistamento nell'intestino tenue.

Nella porzione prossimale dell'intestino tenue i trofozoiti possono dunque replicarsi e colonizzare la mucosa dell'ospite, aderendovi grazie alla ventosa ventrale. A livello distale, i trofozoiti si incistano poi nuovamente: la loro capacità di sopravvivere a condizioni anche leggermente diverse da quelle del tenue sarebbe infatti pressoché nulla. Il processo di incistamento è legato all'esposizione dei trofozoiti ad un pH leggermente basico, dovuto alla presenza degli acidi biliari e dei loro sali. Le cisti novelle vengono veicolate nell'ambiente esterno mediante l'espulsione delle feci, andando così a chiudere il circuito della via di trasmissione (Miliotis and Bier, 2003).

A monte del processo di incistamento, ciascun trofozoite intraprende la citocinesi, così che ogni cisti contiene di fatto due trofozoiti, per un totale di quattro nuclei (Errore: sorgente del riferimento non trovata). La cisti possiede un guscio protettivo filamentoso e rigido, composto principalmente di carboidrati (60%) e proteine (40%), tra cui predomina la N-acetilglucosamina. La funzione principale del guscio è quella di impedire la lisi osmotica della cisti nell'ambiente acquatico esterno. L'attività metabolica risulta sensibilmente rallentata rispetto a quella del trofozoite, così che la cisti riesce a sopravvivere per molto tempo senza doversi nutrire. La cisti acquisisce il suo potenziale infettivo non appena viene amalgamata nella massa fecale.

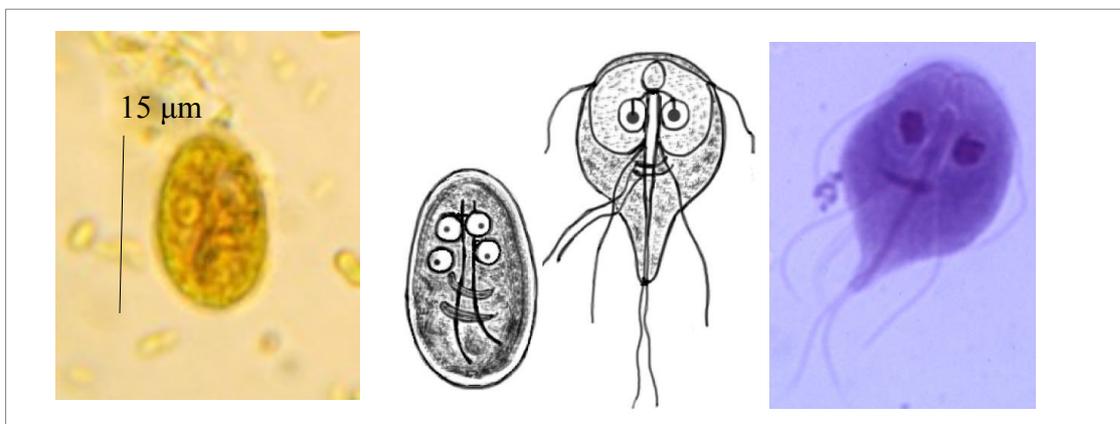


Fig. 2: Le due forme sviluppate da *Giardia duodenalis*: cisti (forma di resistenza) e trofozoite (forma vegetativa).

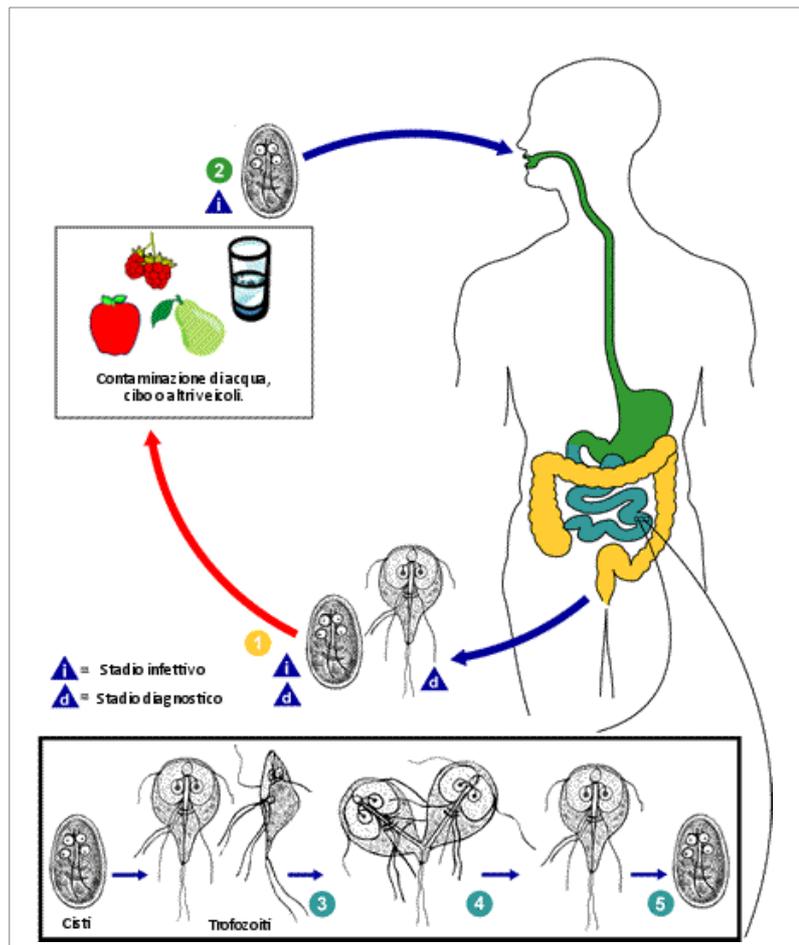


Fig. 3: Il ciclo vitale di *Giardia duodenalis*: le cisti vengono espulse nell'ambiente con le feci da un individuo infetto (1) e vanno a contaminare acqua, cibo o altri veicoli che finiranno poi per attualizzare la trasmissione oro-fecale (2). A livello del duodeno dell'ospite, le cisti ingerite si eccistano, dando origine a due trofozoi vegetativi ciascuna (3). I trofozoi si moltiplicano nell'intestino ospite tramite fissione binaria (4) e, nel tratto distale del tenue, essi si incistano nuovamente (5). Con le feci vengono espulse prevalentemente cisti, ma è talvolta possibile rinvenire qualche trofozoite, il quale ad ogni modo va incontro a rapido degradamento (adattata da: www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html).

Come già accennato, i trofozoi possiedono una caratteristica forma a pera, solcata longitudinalmente (Errore: sorgente del riferimento non trovata). Sono lunghi 12-15 μm e larghi 5-9 μm . Essi presentano una superficie dorsale convessa, speculare alla concavità ventrale su cui si trova la ventosa che consente ai trofozoi di attaccarsi saldamente all'epitelio intestinale dell'ospite. Come gli altri membri della famiglia Hexamitidae, i trofozoi di *Giardia* possiedono quattro paia di flagelli, collocate in posizione anteriore, laterale, ventrale e caudale, e due nuclei completi e trascrizionalmente attivi. Non è ancora chiara la ragione della presenza di due nuclei. Si ricorda l'assenza di alcuni organelli tipici degli eucarioti, quali mitocondri, perossisomi e nucleoli (Adam, 2001; Ankarklev, 2010). Nel citoplasma periferico si trovano sovente dei vacuoli con funzione lisosomiale ed endosomiale. Altro organello caratteristico di *Giardia* è poi il corpo mediano, presente in duplice copia, che fa parte delle strutture citoscheletriche ma la cui funzione esatta non è ancora nota.

Il metabolismo dei trofozoi è strettamente anaerobico, coerentemente con l'assenza di

mitocondri. La via della fosforilazione ossidativa, che nella respirazione cellulare tipica segue la glicolisi ed il ciclo di Krebs per produrre ATP, è chiaramente assente. L'ATP viene generata mediante fosforilazione a livello del substrato, ovvero tramite il trasferimento diretto di un gruppo fosfato ad una molecola di ADP.

I trofozoiti hanno una capacità assai limitata di sintetizzare ex novo le macromolecole: le purine e le pirimidine, ad esempio, vengono inconsapevolmente fornite dall'ospite, così come gran parte degli aminoacidi e degli acidi grassi. Il glucosio rappresenta l'unica fonte energetica nota di natura carboidratidica che viene impiegata da *Giardia* (Adam, 2001; Miliotis and Bier, 2003; Ankarklev, 2010).

1.3.3 Aspetti clinici della giardiasi

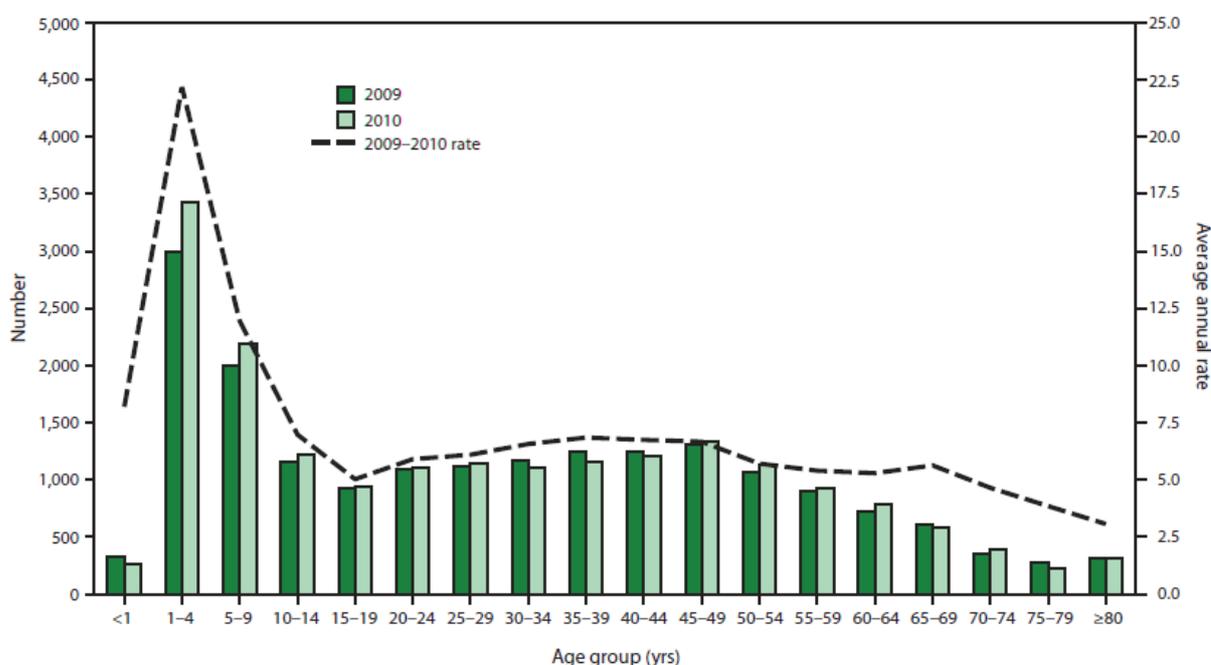
La sindrome di cui *Giardia duodenalis* è l'agente eziologico prende il nome di giardiasi. Il quadro clinico della giardiasi è eterogeneo e può variare da una grave e prolungata persistenza dei sintomi intestinali, con annessi perdita di peso e stato di malnutrizione, ad una forma cronico-asintomatica. L'infezione è perlopiù caratterizzata da una sintomatologia di lunga durata che include diarrea, tenesmo rettale, steatorrea, flatulenza e crampi addominali. La diarrea è talvolta accompagnata da nausea e/o vomito. Le feci appaiono oleose, particolarmente maleodoranti e schiumose. Astenia e perdita di peso sono sintomi comuni, che si verificano nel 70-90% dei pazienti sintomatici. Gli episodi febbrili non sono altrettanto comuni e vengono riportati soltanto nel 20% dei casi.

Nei paesi industrializzati la giardiasi mostra una prevalenza del 2-5 %, mentre nei paesi in via di sviluppo essa raggiunge il 20-30%, coerentemente con un livello di esposizione della popolazione ed un tasso di infezione nettamente superiori (Oberhuber et al., 1997; Ajeegah et al., 2007).

La percentuale di pazienti sub-clinici si attesta in media attorno al 50%, ma in alcuni casi si è riscontrata un'elevata variabilità di tale percentuale. Ciò è probabilmente da correlare all'efficienza del sistema immunitario dell'ospite, o anche alla virulenza della specie o assemblaggio infettante. I bambini di età compresa tra gli 1 ed i 9 anni sembrano essere la categoria maggiormente a rischio di contrarre giardiasi (Fig. 4) (Yoder et al. 2012a). Il periodo di incubazione della malattia è tipicamente di circa 7 giorni, ma può oscillare tra esordi repentini (1-2 giorni di incubazione) ed esordi tardivi (2 settimane). La fase acuta, di risoluzione spontanea nei soggetti immunocompetenti, dura tipicamente da 1 a 4 settimane, ma in alcuni pazienti, se non trattati, si può protrarre per alcuni mesi (EPA, 1998).

Nonostante l'isolamento e la descrizione di *Giardia* come protozoo flagellato presente nell'intestino umano risalga al XIX secolo, fu solamente negli anni '60 che si iniziò ad associarla ad una sindrome diarroica ben precisa e ad attribuirle di conseguenza il titolo di patogeno. La conferma iniziale della patogenicità di *Giardia duodenalis* derivò da due diversi approcci. Il primo andò a constatare la cospicua presenza di trofozoiti in campioni biotipici della mucosa intestinale del tenue, in pazienti con diarrea di eziologia non batterica, mentre il secondo andò a sottolineare lo stretto legame tra diarrea e presenza di cisti nelle feci (Miliotis

and Bier, 2003). Negli anni '50 vennero condotti alcuni studi su dei detenuti “volontari” (Rendtorff, 1954), ai quali venivano somministrate concentrazioni crescenti di cisti di *Giardia* al fine di stabilirne la dose infettiva. Ne risultò che il 30 % dei volontari sviluppava l'infezione in seguito all'ingestione di sole 10 cisti. La stessa percentuale venne riportata anche per la dose di 100 cisti. La somministrazione di 10 000 cisti comportò l'insorgenza di giardiasi nel 100 % dei volontari, i quali continuarono poi ad eliminare cisti nelle feci per un periodo di 5-41 giorni. Tra gli anni '60 e '70 la comprensione del quadro clinico-epidemiologico associato all'infezione da parte di *G. duodenalis* venne perfezionata, grazie al verificarsi di diverse epidemie idrotrasmesse di giardiasi, a livello comunitario, per le quali fu possibile rintracciare il patogeno sia nei campioni fecali provenienti dalla popolazione colpita, che nelle fonti di approvvigionamento idrico (Moore et al., 1969; Veazie, 1969; Taylor et al., 1972; Meyer, 1973). Furono proprio questi primi studi a varcare la soglia dell'isolamento di *Giardia* dai soli campioni clinici, a favore di un riscontro della presenza del protozoo anche a livello ambientale.



* N = 39.234; età non nota per 1.041 casi.

† Incidenza su 100.000

Fig. 4: Giardiasi negli USA: numero di casi notificati (*) e tasso di incidenza (†) per classe di età negli anni 2009 e 2010. L'istogramma suggerisce una distribuzione bimodale, con il maggior numero di casi e l'incidenza più elevata per le classi di età 1-4 e 5-9 anni ed un picco minore per gli adulti tra i 35 ed i 49 anni (adattato da Yoder et al. 2012a).

1.4 *Cryptosporidium parvum*

Il genere *Cryptosporidium* venne descritto per la prima volta verso l'inizio del XX secolo, ma bisogna attendere gli anni '80 perchè esso venga indiziato di essere correlato ad una sindrome diarroica estremamente defedante, e spesso con esito letale, assai ricorrente nei pazienti HIV. Ad oggi si riscontrano infezioni da parte di *Cryptosporidium* in un ampio spettro di specie ospiti. Il microrganismo viene prevalentemente acquisito mediante l'ingestione di acqua contaminata, ma si individuano anche casi di trasmissione diretta orizzontale. *Cryptosporidium* è stato segnalato in modo ubiquitario nelle aree sia urbane che rurali del pianeta: particolarmente significativi alcuni eventi epidemici verificatesi nel Nord America, i.e. USA e Canada, e Regno Unito (Desselberger, 2000).

1.4.1 *Nomenclatura e tassonomia*

Il genere *Cryptosporidium* venne descritto per la prima volta nel 1907 dal parassitologo statunitense Ernest Tyzzer nei topi da laboratorio (Desai et al., 2012). Ad ogni modo la sua rilevanza clinica, sia umana che veterinaria, iniziò ad emergere solamente negli anni '70 (Miliotis and Bier, 2003). L'interesse suscitato da *Cryptosporidium* a partire da allora è aumentato esponenzialmente. Basti pensare che, su PubMed, il numero di articoli ad esso dedicati è passato dai 13 pubblicati fino al 1980, ai 3871 del 2013.

Tra gli anni '80 e '90 una triade di scoperte portò alla ribalta il ruolo epidemiologico di *Cryptosporidium*. In primo luogo venne stabilito il legame eziologico tra il coccidio ed una particolare forma diarroica, talvolta ricorrente con carattere epidemico, in alcuni mammiferi, uomo incluso. In base ad alcuni lavori pionieristici si era infatti inizialmente ritenuto che l'infezione da parte di *Cryptosporidium* fosse altamente ospite-specifica, ma di fatto fu possibile dimostrare la possibile trasmissione da vitellini, agnelli, renne ed umani infetti a topi, ratti, cavie, polli, maialini e agnelli (O'Donoghue, 1985; Angus et al., 1985). Si noti la peculiare suscettibilità all'infezione dei cuccioli rispetto agli esemplari adulti. Ulteriori indagini condotte nel Regno Unito e negli Stati Uniti su episodi di diarrea acuta nel bestiame portarono al nuovo inquadro di *Cryptosporidium* quale agente eziologico di prim'ordine e andarono a sottolineare il suo potenziale infettivo quale patogeno zoonotico.

In secondo luogo, *Cryptosporidium* venne correlato con la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) quale patogeno opportunisto, e potenzialmente letale, per i pazienti HIV (Gross et al., 1986; Hart and Baxby, 1990). A breve, dopo l'isolamento del protozoo nei pazienti immunocompromessi, *Cryptosporidium* venne incriminato anche di essere un comune responsabile di diarree infantili e diarree del viaggiatore di eziologia non batterica (Te Wiata and Lennon, 1985; Pherwani et al., 1989).

Da ultimo, nel 1993, *Cryptosporidium* si rese protagonista della più grande epidemia idrotrasmessa mai verificatasi negli Stati Uniti (MacKenzie et al., 1994; Cicirello, 1997). All'epoca già si sospettava la possibile idrodifusione di *Cryptosporidium*, ma mai si era verificato un focolaio epidemico di grandi dimensioni: per lo più si erano riscontrati casi

singoli o comunque non riconducibili con certezza ad un unico evento di contaminazione della risorsa idropotabile. Solamente in seguito alla sopracitata epidemia, verificatasi nella città di Milwaukee, nel Wisconsin, che vide il contagio di circa 400 000 persone (MacKenzie et al., 1994), le autorità sanitarie ed i gestori del servizio idrico iniziarono a considerare a tutti gli effetti *Cryptosporidium* come nuova minaccia idrotrasmessa (Miliotis and Bier, 2003).

La tassonomia ufficiale di *C. parvum* lo vede appartenere al phylum degli Apicomplexa, caratterizzato dalla presenza di un complesso apicale; classe Sporozoa, con riproduzione sessuata ed asessuata che prevede la formazione di oocisti; sottoclasse Coccidiasina, con ciclo vitale che include merogonia, gametogenesi e sporogenesi; ordine Eucoccidiida, caratterizzato dal processo di schizogonia; famiglia *Cryptosporidiae*, la quale, anziché una sporocisti, presenta 4 sporozoitii completamente formati all'interno dell'oocisti (Xiao et al., 2004a). Ad ogni modo, la tassonomia molecolare di *Cryptosporidium* continua per contro a rappresentare una sfida aperta, dal momento che diversi aspetti della biologia cellulare e del genoma del parassita, nonché delle interazioni tra esso e i suoi ospiti, restano poco chiari. Da un lato sembra che sussistano delle nette differenze tra isolati provenienti da fonti diverse, ma queste restano difficilmente caratterizzabili in termini utili per una speciazione definitiva (Miliotis and Beer, 2003). E' recente la proposta di alcuni autori di validare ben 30 diverse specie di *Cryptosporidium*, 14 delle quali aventi l'uomo come ospite (Fig. 5) (Šlapeta, 2013).

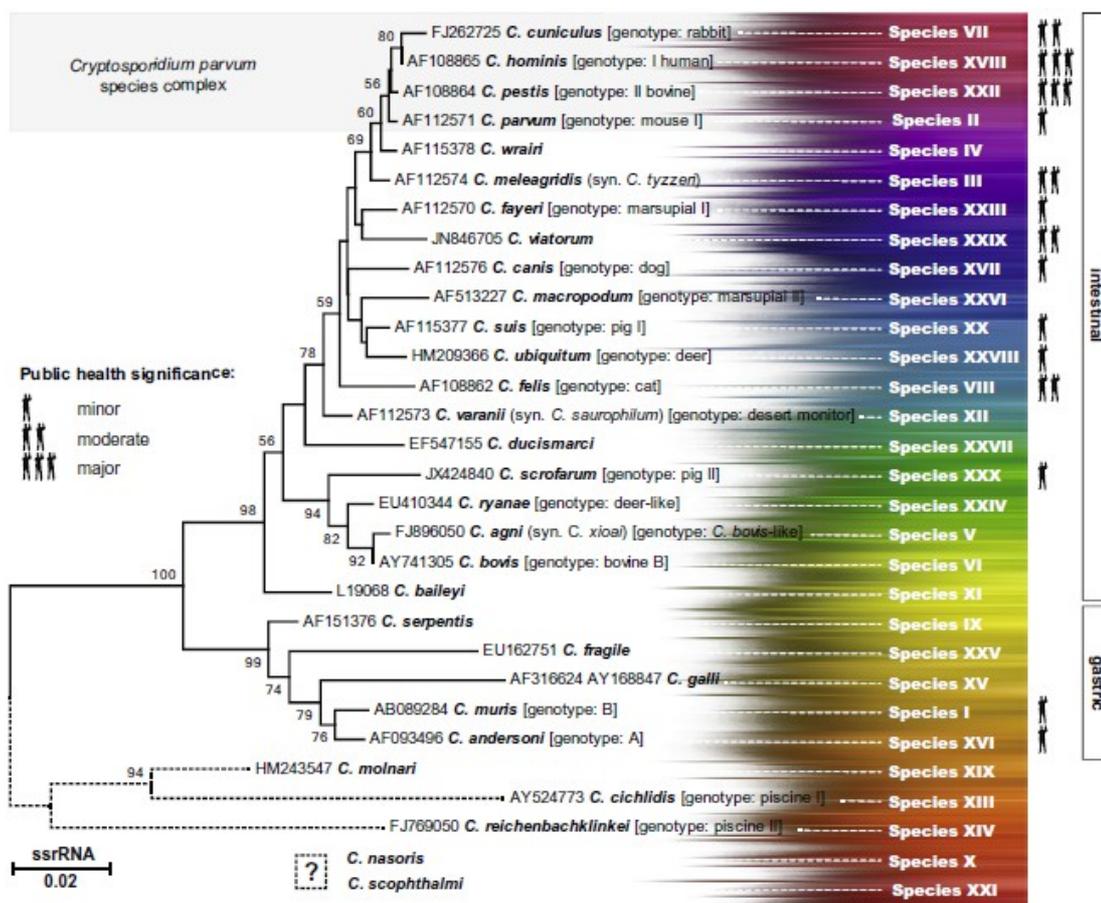


Fig. 5: Filogenesi di 28 specie di *Cryptosporidium* ottenuto da un dataset di sequenze di ssrRNA (Šlapeta, 2013).

1.4.2 *Ciclo vitale ed elementi di biologia cellulare*

Cryptosporidium parvum, al pari di altri coccidi enterici, è caratterizzato da un ciclo vitale monoxeno, ovvero che si espleta all'interno di un solo ospite e, più precisamente, nel suo tratto gastrointestinale. Anch'esso presenta due forme differenti, una ambientale, denominata oocisti, ed una vegetativa, lo sporozoite (Fig. 6). Le caratteristiche che risultano invece peculiari a *Cryptosporidium*, consistono nella sua capacità di infettare un vasto spettro di ospiti differenti, un'elevata resistenza ai disinfettanti, in particolare al cloro, ed infine il suo curioso posizionamento a livello della membrana cellulare degli enterociti dell'ospite (Ramirez et al., 2004).

Il ciclo vitale ha inizio con l'ingestione delle oocisti mediante l'assunzione di acqua o altro veicolo infetto (Fig. 7). Ciascuna oocisti rilascia nell'intestino 4 sporozoiti, i quali vanno ad infraporsi alle cellule epiteliali della mucosa, inserendosi parzialmente all'interno della membrana cellulare. Essi poi, internalizzati a mezza via tra citoplasma e plasmalemma, si trasformano in trofozoiti ed iniziano a riprodursi in modo asessuato. Essi intraprendono due cicli di merogonia consecutivi, andando a rilasciare rispettivamente otto e quattro merozoiti. Questi ultimi progrediscono verso due diversi stadi di sviluppo sessuato, denominati micro- e macrogamonti. L'incontro tra i due porta alla formazione dello zigote, il quale, dopo due divisioni asessuate, intraprende il processo di incistamento e va a ricostituire l'oocisti, contenente 4 sporozoiti. Il tutto avviene mantenendo la posizione internalizzata sulla membrana cellulare degli enterociti ospiti (Miliotis and Beer, 2003).

1.4.3 *Aspetti clinici della criptosporidiosi*

La sindrome diarroica causata da *Cryptosporidium parvum* prende il nome di criptosporidiosi: essa è una delle parassitosi enteriche umane più comuni a livello mondiale. È ubiquitaria e si presenta in gran parte delle specie di vertebrati esistenti, ma l'effettiva componente zoonotica è lungi dall'essere delucidata in modo esaustivo. Nei paesi industrializzati la prevalenza di *Cryptosporidium parvum* si attesta tra l'1 ed il 6 % (Fig. 8), mentre nei paesi in via di sviluppo essa oscilla attorno al 20 % (Current and Garcia, 1991; Desai et al., 2012). È interessante notare come, nei paesi industrializzati, l'infezione clinica da parte di *Cryptosporidium* colpisca prevalentemente bambini, giovani adulti e immunocompromessi, mentre, nei paesi poveri, essa sia frequente negli infanti ma assai rara negli adulti (Desai et al., 2012; Yoder et al., 2012b).

La criptosporidiosi si manifesta nei soggetti immunocompetenti come una forma diarroica acuta, di risoluzione spontanea (7-10 gg), ma piuttosto eterogenea, in relazione a numerosi fattori quali le caratteristiche dell'ospite (età, anticorpi materni, precedenti esposizioni, ecc.) () e quelle del parassita (infettività delle oocisti, carica infettante, specie, genotipo, ecc.). I sintomi clinici tipici del quadro sono diarrea acquosa, dolore e crampi addominali, nausea e perdita di peso (Ajeegah et al., 2007).

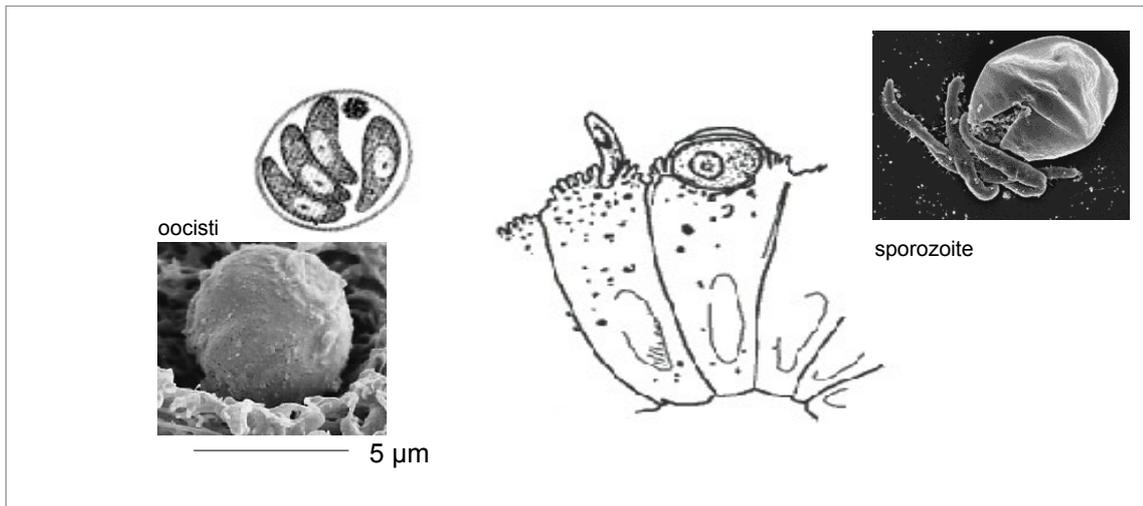


Fig. 6: Le due forme assunte da *Cryptosporidium* durante il suo ciclo vitale: l'oocisti (sinistra), sua forma resistente, e lo sporozoite (destra), forma vegetativa.

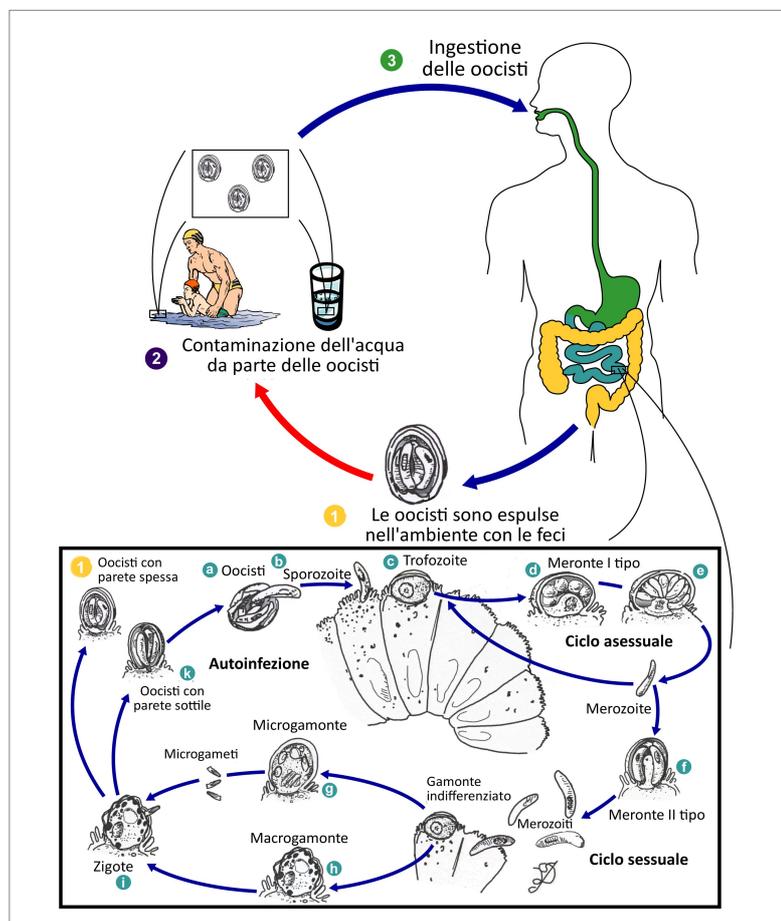


Fig. 7: Il ciclo vitale di *Cryptosporidium parvum*: le oocisti vengono immesse nell'ambiente durante la defecazione di un soggetto infetto (1) e vanno a contaminare le risorse idriche (2). L'ingestione accidentale delle oocisti può avvenire o per assunzione di acqua contaminata o durante la balneazione in acque infette (3). A livello del duodeno dell'ospite, le oocisti (a) si eiecistano dando origine a quattro sporozoiti ciascuna (b). Gli sporozoiti si inseriscono nella membrana degli enterociti e si trasformano in trofozoiti (c), che iniziano a riprodursi in modo asessuale (d,e,f). Alcuni merozoiti intraprendono poi un ciclo riproduttivo sessuale che vede l'unione di micro- e macrogamonti in zigoti (g,h,i). Ciascuno zigote può evolversi in oocisti con parete sottile, che darà luogo ad un processo di autoinfezione (k), o in oocisti con parete spessa, che verrà espulsa insieme alle feci (1). (adattata da: www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html)

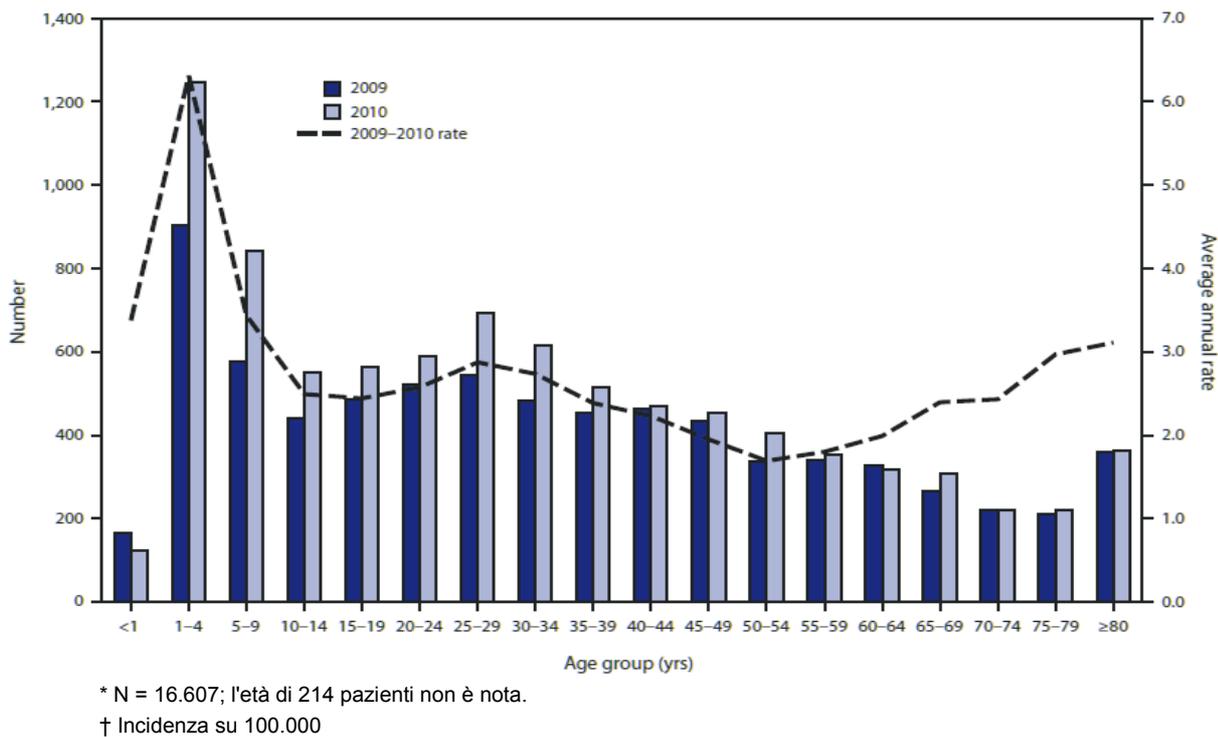


Fig. 8: Criptosporidiosi negli USA: numero di casi (*) e incidenza annuale (†) per classi di età negli anni 2009 e 2010. L'istogramma mostra come sia il numero di casi notificati che il tasso di incidenza siano maggiormente elevati per i bambini tra gli 1 ed i 4 anni di età, seguiti da quelli tra i 5 ed i 9 anni e dagli adulti tra i 25 ed i 29 anni (adattato da Yoder et al. 2012b).

L'infezione ha origine nell'intestino tenue, dove gli sporozoitii emergono dalle oocisti e vanno ad infettare gli enterociti, insediandosi sia tra i villi che nelle cripte mucosali. La dose infettiva è alquanto bassa: si è dimostrato che 10 oocisti sono sufficienti per indurre infezioni in adulti sani (Okuhuysen et al., 1999). L'infezione può talvolta migrare e arrivare ad interessare anche la mucosa gastrica e l'intestino tenue distale, nonché il crasso. La vastità dell'area interessata è direttamente correlata alla gravità dell'infezione. Come regola generale, più essa sarà prossimale al tenue, e più sarà pesante la sintomatologia diarroica.

I parassiti danneggiano il margine dei microvilli e posso pertanto condurre alla perdita dell'epitelio ciliato. La rapida perdita di superficie mucosale comporta, come strategia controffensiva, l'accorciamento dei villi residui, l'allungamento del lume criptale ed infine l'aumento del ritmo di divisione cellulare. Ad ogni modo si va incontro ad una drastica riduzione del potere assorbente dell'intestino e si riscontra un ridotto riassorbimento di liquidi, elettroliti e nutrienti.

La criptosporidiosi è una delle principali infezioni opportunistiche che vanno a complicare il quadro dell'AIDS. I pazienti HIV esposti a *C. parvum* sviluppano un'intensa e persistente sindrome diarroica. La prevalenza della criptosporidiosi nei soggetti affetti da AIDS nei paesi industrializzati è sensibilmente più elevata rispetto al resto della popolazione (15%). L'infezione, se non trattata, non è auto-limitante e si protrae per mesi o addirittura anni. I parassiti possono migrare in sede ectopica e infestare i dotti epatobiliari e pancreatici, dando luogo a colangite epatica, colecistite e pancreatite (Desai et al., 2012). In seguito ad

infezione cronica la mucosa intestinale subisce un profondo processo disorganizzativo, con conseguente distruzione della superficie epiteliale, fibrosi, infiltrazione cellulare e ascessi criptali (Miliotis and Bier, 2003).

Il ruolo del sistema immunitario nel fronteggiare l'infezione da parte di *C. parvum* è ancora dibattuto: non sembra che la risposta anticorpale rappresenti un fattore primario nella fase recupero, quanto piuttosto essa espleti un effetto di protezione contro eventuali re-infezioni. Gli elementi che apportano un contributo al processo di guarigione endogeno nel paziente immunocompetente sembrano per lo più basarsi sull'azione dei linfociti T di tipo CD4, pre contro molti poco numerosi nei pazienti HIV, e sul meccanismo dell'interferone-gamma (IFN γ). Altre citochine e cellule immunitarie contribuiscono alla risposta concertata contro *Cryptosporidium* (Theodos, 1998).

1.5 Il contesto mondiale

Nei paesi industrializzati, le migliori tecniche acquisite nel campo dell'ingegneria sanitaria ed ambientale durante il XX secolo hanno portato all'eradicazione virtuale delle più temibili infezioni idrodifuse quali tifo e colera. Il moderno concetto di gestione integrata delle filiere idriche consente non solo di garantire un elevato profilo qualitativo per le risorse idriche destinate all'uso ed al consumo umano, ma anche l'attuazione di un processo depurativo, o di rigenerazione delle acque "esauste" prima della loro reimmissione nell'ambiente (FAO/WHO, 2008a). L'approccio olistico è di fatto indispensabile per una tutela congiunta della salute sia umana che ambientale.

L'altro lato della medaglia, per contro, è rappresentato dalla sempre più ingente richiesta idrica che le attività antropiche necessitano e l'impatto che le stesse esercitano su più fronti a livello ambientale. In un tale contesto, nei paesi poveri si stanno progressivamente ingrandendo sia le problematiche correlate alla quantità di acqua disponibile, che quelle legate alla sua qualità. Dovendo infatti individuare nuove fonti di approvvigionamento idrico, spesso ci si deve accontentare di una qualità dell'acqua non idonea all'uso ed al consumo umano.

Le acque superficiali sono certamente le più esposte al rischio di inquinamento, per altro sia microbiologico che chimico, ma numerosi studi hanno mostrato come anche le acque di falda, soprattutto se provenienti da pozzi poco profondi, siano vulnerabili alla contaminazione (Barwick et al., 2000; Levin et al., 2002).

Ad ogni modo, i paesi industrializzati non sono per nulla esenti dal problema. In essi, come verrà ripreso in seguito, il rischio principale possiede un carattere tipicamente tecnologico. I trattamenti di potabilizzazione e depurazione classici (filtrazione, flocculazione, disinfezione chimica, ecc.), nati e calibrati per far fronte ai "vecchi" patogeni idrodifusi, non risultano sufficienti per la rimozione dei microrganismi contaminanti emergenti, i quali, come nel caso di *Giardia* e di *Cryptosporidium*, presentano caratteristiche biologiche diverse e una capacità di resistenza nettamente maggiore (LeChevallier et al., 1991; Rose et al., 1991; 2001; Rose, 1999).

In base ai *case report* presenti in bibliografia, si osserva come nel corso del 1900 siano

stati identificati e descritti 325 eventi epidemici di parassitosi enteriche idrotrasmesse (Karanis et al., 2007), i quali iniziano per lo più a venire notificati dagli anni '60 in poi. Noto che, nella sola decade 2000-2010, sono stati descritti più di 200 episodi analoghi (Baldursson and Karanis, 2011). Il 60.3 % delle epidemie comunitarie riportate in tale elenco è riconducibile a *Cryptosporidium*, il 35.1 % a *Giardia* ed il 4.5 % ad altri protozoi. Circa la metà degli outbreak di parassitosi (46.7 %) è stata registrata in Australia, mentre il Nord America consta del 33.1 % degli eventi. Il Sud America contribuisce con 2.5 punti percentuali e l'Asia con un 7 %. In Europa, infine, si è verificato il 16.5 % dei casi totali, così ripartiti per aree geopolitica: Gran Bretagna 12 % (24 casi); Scandinavia 3.5 % (7 casi) e Germania e Danimarca con lo 0.5 % (1 caso) ciascuna (Karanis et al., 2007; Baldursson and Karanis, 2011). Va segnalata la totale assenza di report epidemiologici provenienti dall'Italia (cfr. 1.6.1).

1.5.1 Nord America

Negli Stati Uniti si richiede la disinfezione obbligatoria come step finale di potabilizzazione, per tutte le fonti di approvvigionamento “che siano influenzate da acque superficiali”. A tal proposito si precisa che quasi il 70 % dell'utenza americana (ca. 200 milioni di persone) dipende esclusivamente dalle acque superficiali, mentre il restante 30 % si rifornisce da fonti sotterranee o, per l'appunto, miste (EPA, 2009). Il trattamento più diffuso è la disinfezione chimica mediante impiego del cloro e dei suoi composti. Sebbene la clorazione venga talvolta messa in discussione a causa del potere carcinogeno associato ai sottoprodotti del cloro, e.g. i trialometani, l'esperienza, il buon senso e, non da ultimo, diverse analisi del tipo costo-benefici vertono a favore di tale prassi. Il rischio di sviluppare forme tumorali in seguito all'esposizione cronica ai sottoprodotti della clorazione è in fatti di gran lunga inferiore rispetto al rischio di contrarre infezioni enteriche anche gravi in assenza di disinfezione. Ad ogni modo, i livelli di cloro ammessi dalla legge statunitense non si dimostrano sufficienti contro alcuni patogeni emergenti, quali *Giardia* e *Cryptosporidium*, ma anche alcuni enterovirus (Levin et al., 2002).

Già negli anni '60 alcuni eventi epidemici vennero associati alla contaminazione dell'acqua potabile da parte di *Giardia duodenalis*. Uno tra i primi si verificò presso una nota stazione sciistica: 59 persone vennero diagnosticate di giardiasi e si sospettò un pattern idrotrasmesso. Pur tuttavia all'epoca non vennero condotte analisi a livello delle matrici ambientali indiziate, ma unicamente sulle feci dei pazienti sintomatici (Miliotis and Bier, 2003).

La più importante epidemia di *Cryptosporidiosi* idrodiffusa mai verificatasi negli Stati Uniti risale alla primavera del 1993. L'acquedotto della città di Milwaukee, nello stato del Wisconsin, captò acqua superficiale pesantemente contaminata dalle oocisti del protozoo, causando il contagio di ben 403 000 persone. In concomitanza di questo evento di enormi proporzioni, se ne investigarono gli aspetti clinici, epidemiologici ed anche ambientali. Si scoprì che a monte di uno dei principali siti di captazione dell'acquedotto, sito sul lago

Michigan, era da poco stato inaugurato l'impianto di depurazione di uno dei centri urbani limitrofi. Lo scarico del depuratore andava così a contaminare l'acqua lacustre che riforniva la città di Milwaukee (MacKenzie et al., 1994; Cicirello, 1997).

1.5.2 *Regno Unito*

Nel complesso il Regno Unito si rivela il paese europeo da cui proviene la maggior parte delle segnalazioni di epidemie idrotrasmesse di eziologia protozoaria. Nello specifico, risultano alquanto numerosi eventi endemici di criptosporidiosi, anche se spesso di modesta portata. Di frequente sono coinvolte aree urbane o peri-urbane, con approvvigionamento captante acque superficiali, in modo simile a quanto già visto per gli Stati Uniti (Karaniš et al., 2007; Baldursson and Karaniš, 2011). Nel Regno Unito sovente viene riportata una correlazione tra l'intensità del dilavamento del suolo, in coincidenza di precipitazioni abbondanti, ed il verificarsi di un evento epidemico. Alcuni studi hanno parimenti evidenziato una correlazione tra la quantità d'acqua ingerita e la velocità del progresso dell'infezione, andando a suggerire un modello di tipo dose/risposta. (Atherton, 1995; Karaniš et al., 2007; Baldursson and Karaniš, 2011).

1.6 **Lo scenario italiano**

La ricerca italiana non ha contribuito alla ribalta iniziale di *Giardia* e *Cryptosporidium*, ma è soltanto nel corso degli ultimi anni che hanno iniziato ad apparire dati ed indagini circa il contesto nazionale inerente all'epidemiologia dei due protozoi idrodiffusi. Se, da un lato, gli studi più datati mostravano un carattere puramente clinico-descrittivo, degno di nota è sicuramente l'approccio interdisciplinare che caratterizza alcuni dei lavori più recenti, i quali vanno ad indagare in modo complementare ambiti tra loro assai differenti, quali epidemiologia umana e veterinaria, ecologia ambientale e dati molecolari (Bonadonna et al., 2006; Giangaspero et al., 2007; Geurden et al., 2012).

1.6.1 *Dati epidemiologici*

In contrapposizione a quanto visto a livello mondiale, l'Italia non viene annoverata tra le Nazioni interessate da eventi epidemici di parassitosi idrotrasmesse. A tal proposito si può da un lato ipotizzare una più elevata qualità delle risorse idropotabili captate, coerentemente con la ricchezza idro-geologica della penisola, ma per contro si può anche sospettare una minor attenzione nel monitoraggio ambientale ed epidemiologico. Basti pensare, ad esempio, che negli Stati Uniti è attivo un sistema di sorveglianza dedicato alle infezioni idrodiffuse, il *Waterborne Disease and Outbreak Surveillance System* (WBD OSS), dal 1971.

Ad oggi, in Italia, giardiasi e criptosporidiosi sono sindromi soggette a notifica obbligatoria, ma solamente in quanto ricadenti nella più che generica categoria di “malattie

infettive non comprese nelle classi precedenti". In Italia vige infatti il Sistema di Notifica Obbligatorio (Simi), regolato dal DM del 15/12/1990 e dal DM 29/07/1998, che prevede la segnalazione al Servizio di Igiene e Sanità Pubblica (SISP) della ULSS locale da parte dei medici di medicina generale delle malattie infettive da loro sospettate o diagnosticate. Il sistema prevede flussi informativi diversificati tra ULSS, Regione e, in alcuni casi, Ministero della Salute, al fine poter attuare tempestivamente eventuali interventi di prevenzione e profilassi a livello locale, nazionale o sovranazionale.

Esistono cinque diverse classi di notifica. Le malattie che rappresentano i rischi maggiori per la salute pubblica, e che sono spesso soggette a notifica internazionale, sono raggruppate nella Classe 1 di notifica, la quale prevede la trasmissione immediata da parte del medico di base alla ULSS. Questa provvede alla trasmissione immediata alla Regione e al Ministero della Salute, e s'incarica poi di condurre le indagini epidemiologiche e gli interventi del caso.

Le infezioni raggruppate nella Classe 2, costituiscono un rischio minore a livello nazionale e/o internazionale: esse richiedono che la trasmissione sia effettuata entro le 48 ore. Anche in questo caso l'ULSS provvederà, se necessario, alle indagini epidemiologiche ed interventi necessari, verificando e trasmettendo la notifica alla sola Regione.

La Classe 3 comprende le sorveglianze speciali di alcune malattie per le quali si ritiene necessario raccogliere specifiche informazioni: AIDS, tubercolosi, micobatteriosi non tubercolari, malaria, lebbra. Le informazioni sono trasmesse dalla ULSS alla Regione, ad eccezione dell'AIDS la cui segnalazione è inviata direttamente dal medico generico alla Regione e all'Istituto Superiore di Sanità.

In Classe 4 sono invece sintetizzate e trasmesse alla Regione le informazioni inerenti a episodi epidemici di una determinata infezione, i cui casi individuali sono invece notificati secondo le modalità previste per ciascuna delle sopracitate Classi di malattia.

Vi è infine la Classe 5, dedicata per l'appunto alle malattie infettive non comprese nelle precedenti Classi, quali ad esempio le zoonosi previste dal Regolamento di Polizia Veterinaria (carbonchio, morva, psittacosi, ecc.) e le parassitosi da protozoi ed elminti, quali giardiasi e criptosporidiosi. Tali casi vengono semplicemente trasmessi in Regione.

Ad ogni modo i bollettini epidemiologici delle ULSS locali o delle Regioni riportano casi sporadici verificatisi nel territorio di competenza, ma nessun evento di carattere comunitario è mai stato notificato (cfr. 8.7).

In assenza di dati ministeriali o comunque di carattere nazionale, le uniche informazioni significative reperibili provengono da studi indipendenti i quali, seppur connotati singolarmente da una valenza locale, suggeriscono che *G. duodenalis* e *C. parvum* siano nel complesso protozoi piuttosto comuni nella popolazione della penisola.

I primi lavori dedicati alla giardiasi risalgono agli anni '60 (Pucci et al., 1967; De Riu et al., 1967), ma mostrano una valenza strettamente locale e/o categorica. Studi di interesse più vasto e trasversale compaiono negli anni '90, mostrando una prevalenza per *Giardia duodenalis* pari al 3.2 % negli adulti (Libanore et al., 1991) e tra lo 0.9 ed il 4.7 % nei bambini in età scolastica (Cevenini et al., 1985; Brandonisio et al., 1996; Caprioli et al. 1996;

Scotti et al. 1996). Altri lavori individuano come soggetti a rischio per la giardiasi sia pazienti psichiatrici che pazienti HIV. La prevalenza tra i primi è stimata pari al 2.5 % in due studi differenti, condotti rispettivamente nel Centro (Giacometti et al., 1997) e nel Nord Italia (Gatti et al., 2000).

Si descrivono anche alcuni casi di giardiasi importata, in riferimento ad una co-infezione con *Entamoeba histolytica*, poi trasmessa orizzontalmente a livello domestico, riguardante alcuni viaggiatori di ritorno da un paese tropicale (De Lalla et al., 1992).

Per quanto concerne la prevalenza della criptosporidiosi, si trova come essa sia generalmente inferiore rispetto a quella della giardiasi, quantomeno in pazienti immunocompetenti (Brandonisio et al., 1996). Il medesimo studio condotto su pazienti psichiatrici del Centro (Giacometti et al., 1997), coerentemente riporta un valore di prevalenza dello 0.84 %. Nei pazienti HIV la prevalenza della criptosporidiosi risulta per contro più elevata, aggirandosi tra l'8.33 e l'11 %, nonostante si osservi un decremento di tali valori in seguito all'introduzione della terapia anti-retrovirale HAART (Brandonisio et al., 1999).

Prove indirette del tasso di esposizione della popolazione italiana a *C. parvum* derivano da alcune indagini di sierologia: nel Centro Italia il 5.3 % della popolazione è risultato presentare anticorpi IgG contro un antigene solubile della parete dell'ooziste protozoaria (Gomez Morales et al., 1992). Per contro, tali dati non corrispondono con quanto trovato in un analogo studio condotto nel Nord, dove circa il 70 % dei volontari ha mostrato una risposta sierologica positiva (Frost et al., 2000). Si suppone che la scelta dell'antigene immunizzante possa aver influito sull'esito dei due studi.

1.6.2 *Giardia e Cryptosporidium nelle risorse idriche*

In Italia né l'acqua potabile erogata, né l'acqua captata vengono monitorate per la ricerca di (oo)cisti protozoarie in quanto tali parametri non sono contemplati dal corpus normativo vigente. I due principali decreti che delineano l'ambito delle risorse idropotabili sono il D. Lgs 31/2001 e s.m., dedicato all'acqua “pubblica”, ovvero distribuita dai sistemi acquedottistici, ed il D. Lgs. 152/2006, noto anche come Testo Unico Ambientale, che disciplina l'interfaccia tra attività antropiche ed ambiente. Nel caso specifico, il D.Lgs. 152/2006 si occupa di stabilire la classe qualitativa delle acque superficiali, enuncia i criteri che ne decretano la possibile potabilizzazione e definisce i trattamenti a cui, di conseguenza, esse devono essere sottoposte prima della distribuzione.

Soltanto a partire dal 2000 iniziano a comparire i primi studi volti alla ricerca ambientale di *Giardia* e *Cryptosporidium*, e precisamente la determinazione dei due protozoi in vari tipi di matrici idriche e nel suolo (Giangaspero et al., 2007). Una buona parte dei campioni prelevati da acque superficiali si è mostrata positiva sia per cisti di *Giardia* che per oocisti di *Cryptosporidium*, mostrando una presenza ubiquitaria di entrambi i protozoi a livello nazionale. Dei campioni analizzati, in media il 31 % è risultato positivo per *Giardia*, mentre il 23 % per *Cryptosporidium* (Brandonisio et al., 2004; Briancesco and Bonadonna, 2005; Di Benedetto et al., 2005; Sacco et al., 2006). Altra considerazione di rilievo è stata la

detezione di concentrazioni di *Giardia* quasi sempre maggiori rispetto a quelle di *Cryptosporidium* (Carraro et al., 2000; Briancesco and Bonadonna, 2005; Di Benedetto et al., 2005). Come verrà discusso in seguito, tale dato è in contrasto con quanto rilevato in altri paesi europei, Regno Unito in primis, nei quali sono le oocisti di *Cryptosporidium* ad essere preponderanti nei campioni prelevati da acque superficiali.

Per quanto riguarda le acque sotterranee, sembra che i pozzi profondi non siano interessati da fenomeni di contaminazione fecale e, pertanto, esenti dalla presenza di (oo)cisti protozoarie. I pozzi superficiali, ovvero che presentano profondità inferiori ai 30 m, per contro, in alcuni studi sono risultati positivi per *Giardia* e da *Cryptosporidium*, oltre che per gli indicatori batteriologici classici di contaminazione fecale (Briancesco and Bonadonna, 2005; Di Benedetto et al., 2005; Lonigro et al., 2006).

Alcuni studi italiani, chiaramente ispirati ad analoghe indagini condotte negli USA, focalizzano poi sul rischio di contrarre giardiasi e/o criptosporidiosi in seguito alla balneazione in acque dolci contaminate. Tali studi non vanno ad investigare le aree balneabili lacustri, forse più vulnerabili ad eventi di contaminazione, ma indagano unicamente la presenza delle (oo)cisti protozoarie in alcune piscine (Bonadonna et al., 2004; Briancesco and Bonadonna, 2005; Oliveri et al., 2006).

Sono stati pubblicati anche alcuni studi condotti su acque reflue: vengono riportate concentrazioni di *Giardia* fino a 108 000 cisti / L, che di nuovo si mostrano in media più elevate rispetto a quelle di *Cryptosporidium* (Carraro et al., 2000; Cacciò et al., 2003; Briancesco and Bonadonna, 2005; Di Benedetto et al., 2005). Concentrazioni elevate di (oo)cisti sono state segnalate anche in seguito ai trattamenti secondari di depurazione, e.g. fanghi attivi e sedimentazione (Bonadonna et al., 2002; Di Benedetto et al., 2005; Lonigro et al., 2006), mentre i trattamenti terziari sembrano ridurre significativamente le cariche protozoarie nei reflui (Brandonisio et al., 2000; Carraro et al., 2000). La disinfezione, operata in coda ai trattamenti depurativi, rappresenta infine un altro passaggio chiave. L'impiego di cloro quale agente disinfettante sembra avere un blando effetto sulle cisti di *Giardia* ed essere praticamente ininfluente nei confronti delle oocisti di *Cryptosporidium* (Brandonisio et al., 2004; Briancesco and Bonadonna, 2005), Notevole i dati a favore dell'inefficacia dei trattamenti di attinizzazione (irraggiamento UV-C) sulla vitalità delle cisti di *Giardia* (Brandonisio et al. 2007).

Si cita infine un'indagine condotta nel Lago di Varano (FO), che ha visto la ricerca di (oo)cisti di *Giardia* e *Cryptosporidium* sia dell'effluente di un vicino depuratore fognario che in alcuni esemplari di vongole veraci (*Ruditapes decussatus*) e di cozze (*Mytilus galloprovincialis*) allevati nello specchio lagunare (Giangaspero, 2009). Nonostante i campioni di bivalvi siano risultati negativi nel suddetto studio, è da rammentare il potenziale utilizzo dei molluschi in qualità di organismi indicatori non solo per la determinazione della qualità chimica delle acque, ma anche per la ricerca di alcuni peculiari microrganismi idrotrasmessi, quali protozoi ed enterovirus (Mesquita et al., 2011).

1.7 Panoramica sui metodi analitici disponibili

Il metodo analitico ideale per la determinazione della qualità microbiologica di un campione d'acqua consisterebbe nell'impiego di un protocollo unico per la ricerca simultanea di tutti i microrganismi d'interesse. Chiaramente una metodica unica non è ad oggi disponibile, in quanto le differenze fisiche, biologiche e biochimiche che caratterizzano i principali gruppi di patogeni, i.e. batteri, protozoi e virus, implicano necessariamente soluzioni tecniche diverse. In altre parole, fattori quali la concentrazione ambientale, la dose infettiva, le dimensioni, il ciclo vitale o ancora le condizioni di crescita e replicazione, richiedono procedimenti analitici differenziali al fine di ottenere un'accurata quantificazione ed identificazione. Se in futuro si dovesse riuscire ad integrare le diverse tecnologie in un metodo di detezione *universale*, ciò rappresenterebbe di sicuro un grande balzo in avanti per la salute pubblica, oltre che per l'analisi qualitativa dell'acqua. Ad ora, la strategia forse più promettente è quella che prevede l'impiego della tecnologia molecolare dei microarray (Straub, 2003; Lee, 2009; Lee et al., 2010).

In linea con quanto esposto, per la detezione delle (oo)cisti dei protozoi *Giardia* e *Cryptosporidium* nelle acque, ci si deve pertanto discostare dalle metodiche impiegate nel controllo qualitativo classico, ovvero previsto dalle normative vigenti, che sono dedicate alla ricerca ed enumerazione di parametri indicatori di natura batteriologica. Le metodiche reperibili in letteratura molto devono ai protocolli della parassitologia clinica, rispetto ai quali esse cercano in primo luogo di ovviare all'enorme differenza di concentrazione che si riscontra tra campioni fecali e campioni ambientali. Si descrivono in seguito sia i principi dei protocolli clinici, che quelli delle metodiche ambientali. Il quadro che ne emerge è quello su cui ci si è basati per la successiva stesura di una nuova metodica per la detezione di (oo)cisti protozoarie nelle acque, denominata metodo della Filtrazione su Cartuccia in Polipropilene (FCP) (cfr. 5.1).

1.7.1 Ricerca delle (oo)cisti in campioni fecali

I casi clinici di giardiasi e criptosporidiosi vengono di norma confermati mediante l'analisi parassitologica delle feci del paziente, nelle quali si procede a ricercare cisti ed oocisti. Se il campione fecale è fresco, talvolta è possibile osservare alcuni trofozoiti di *Giardia* mobili, che però vanno incontro a rapido deperimento (Genchi, 2003). Il recupero delle cisti di *Giardia* è ottimizzato dall'impiego di una metodica di concentrazione generica per uova e cisti di parassiti, detta estrazione con etere-formalina. Di norma si procede con l'analisi di 3 campioni distinti, raccolti in 3 giorni diversi. Cisti ed eventualmente trofozoiti sono riconoscibili in microscopia ottica grazie alla loro tipica morfologia (cfr. 1.3), con l'aiuto della colorazione con iodio di Lugol. Negli ultimi anni si sono resi disponibili sul mercato dei kit rapidi basati sul principio dell'immuno-cromatografia o su saggi immunoenzimatici, e.g. Dip-stick (Fig. 9) o kit ELISA. Essi sono equiparabili alle tecniche di microscopia per quanto riguarda sensibilità e specificità, sono più veloci, ma per contro limitano la ricerca ad un solo tipo di

microrganismo per volta. La detezone tramite PCR e tecniche da essa derivate non è di particolare interesse diagnostico, oltre che essere resa difficoltosa dalla presenza di numerosi fattori inibenti nelle feci. Può per contro essere impiegata qualora si stiano intraprendendo studi di tipizzazione molecolare (Genchi, 2003; Alexander et al., 2013; McHardy et al., 2013).

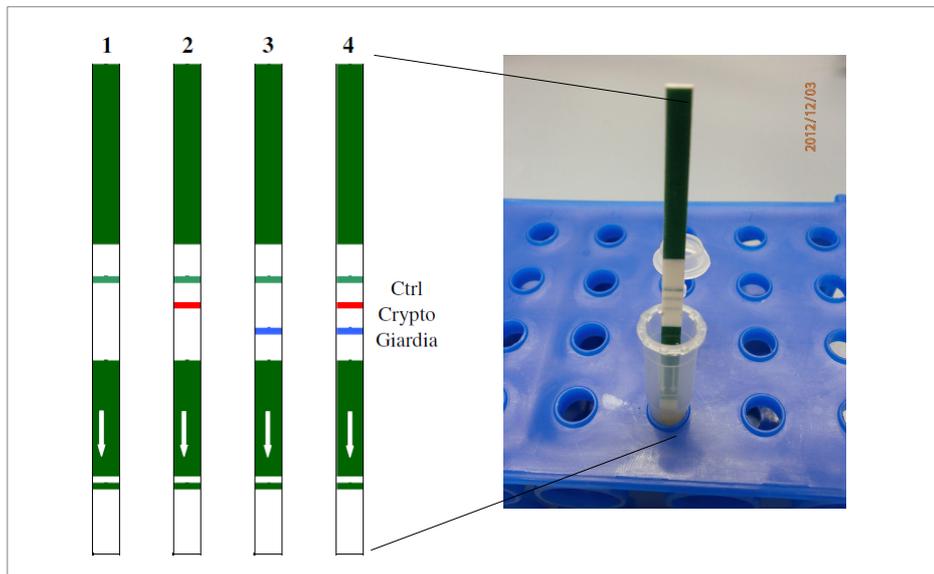


Fig. 9: Kit immunocromatografico Dipstik (Biolife) per la detezone qualitativa di *Giardia* e *Cryptosporidium* nelle feci. Il campione fecale viene posto in una *ependorf* nella quale si posiziona verticalmente la striscia immunocromatografica. Il campione risale per capillarità. Nella parte bianca del supporto assorbente si trovano adesi anticorpi diretti contro antigeni di superficie di *Giardia* e *Cryptosporidium*. Tali anticorpi sono coattati con particelle di lattice che, in caso di positività del campione, si idrolizzano e generano due linee colorate, una per ciascun patogeno (blu = *Giardia*; rosso = *Cryptosporidium*). Se il volume del campione è sufficiente, compare inoltre una banda di controllo di colore verde nella porzione superiore del pad assorbente.

Per quanto concerne *Cryptosporidium*, la situazione rispecchia abbastanza quanto già descritto per *Giardia*. Fino agli anni '80 la diagnosi di criptosporidiosi veniva confermata mediante l'osservazione di preparati biotipici. Oggi si preferisce la ricerca delle oocisti nelle feci. L'estrazione è identica a quanto visto precedentemente per l'altro protozoo, ma cambia il tipo di colorazione richiesta. Per *Cryptosporidium* si ricorre alla colorazione alcool-acido di Ziehl-Nelssen, che va a marcare le oocisti con colore rosso brillante. In alternativa si può impiegare lo staining con auramina. Anche per *Cryptosporidium* esistono dei test rapidi (Fig. 9), ma di nuovo essi forniscono unicamente indicazioni qualitative circa la presenza/assenza del patogeno. La PCR può essere impiegata in caso di infezioni poco intense o qualora il campione sia troppo degradato per procedere con la ricerca parassitologica canonica (Widmer, 1998; Genchi, 2003).

La marcatura delle (oo)cisti con anticorpi fluorescenti, secondo i principi dell'immunofluorescenza, viene talvolta impiegata sui campioni clinici, ma risulta molto più costosa rispetto alle colorazioni standard. Visto l'elevato numero di (oo)cisti che si rivengono nelle feci dei pazienti, l'elevato grado di specificità e sensibilità offerto dalla metodica si può ritenere eccessivo per i campioni fecali (McHardy et al., 2013).

1.7.2 Ricerca delle (oo)cisti nelle matrici ambientali

L'indagine bibliografica condotta ha mostrato come lo sviluppo di metodi per la detezone a livello ambientale di protozoi enteropatogeni idrodiffusi non sia per nulla concertato, ma che esiste piuttosto una vasta gamma di protocolli proposti in maniera indipendente da Istituzioni diverse, in diversi paesi. Una metodica standard di riferimento non è dunque ancora stata selezionata. Il problema principale risiede nel trovare un trade-off tra l'optimum analitico ed i costi di esecuzione (Betancourt, 2002; 2008).

Sinteticamente, si vede come gran parte dei metodi proposti, ciascuno con le sue variazioni sul tema, si basi sulle tre attività cardinali di 1. concentrazione; 2. purificazione e 3. detezone (EPA, 1995; 2001). E' proprio a livello del protocollo di detezone che si possono distinguere due grandi blocchi. Il primo racchiude metodiche che si avvalgono della detezone finale delle (oo)cisti mediante immunofluorescenza, mentre il secondo comprende quelle basate sulla detezone molecolare degli acidi nucleici (Dowd, 1999; Betancourt, 2002; 2008; Cacciò, 2003; Fontaine, 2003; Betancourt et al., 2010; Alonso, 2011; Baque, 2011).

Concentrazione e purificazione seguono dei passaggi concettualmente assimilabili, nonostante il grande numero di versioni proposte: in genere si procede con la filtrazione di grandi volumi d'acqua (da 10 a 1 000 L) su di una matrice filtrante idonea, con porosità variabile, ma chiaramente inferiore alle dimensioni delle (oo)cisti, i.e. $< 4 \mu\text{m}$. A questo punto si recupera il materiale trattenuto dal supporto filtrante (per dissoluzione del filtro o lavaggio) e lo si concentra (centrifugazione), onde poter separare selettivamente le (oo)cisti dai detriti (separazione immunomagnetica o centrifugazione su resine che presentano un gradiente di densità).

La detezone, come accennato, può avvenire per osservazione microscopica, in seguito ad immunostaining con anticorpi fluorescenti ed eventuale marcatura del DNA nucleare con 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI), un intercalante dell'acido nucleico con proprietà di fluorescenza, qualora si voglia evidenziare la vitalità delle (oo)cisti. In alternativa per la detezone si può procedere con tecniche molecolari, che grazie alla loro sensibilità sono adatte alle basse concentrazioni alle quali i due protozoi sono di norma presenti nelle acque. Per ovviare ad una risposta di tipo meramente qualitativo, alcuni studi stanno correntemente valutando l'impiego della real-time PCR, una tecnica quantitativa (Alonso, 2011; McHardy et al., 2013).

2. Analisi del rischio: scopi e principi applicativi

Nell'ottica della gestione integrata delle filiere idriche, un approccio che va a garantire la tutela della qualità delle stesse è rappresentato dalla conduzione di un'accurata analisi del rischio, volta alla tutela preventiva della salute della popolazione servita. L'analisi del rischio (*risk analysis*) nell'ultimo decennio si è sempre più affermata come strumento d'elezione per garantire la sicurezza e la qualità dei processi in molteplici ambiti. Il modello generale su cui essa si basa comprende le tre fasi di: valutazione del rischio (*risk assessment*); gestione del rischio (*risk management*) e comunicazione del rischio (*risk communication*) (CAC, 1999; FAO/WHO 2008a). All'interno del paradigma dell'analisi del rischio, la valutazione del rischio costituisce la componente con maggior denotazione scientifica e fornisce una descrizione sistematica dei potenziali effetti avversi del processo indagato, andandone a chiarificare le ripercussioni finali sulla salute umana. La gestione del rischio, invece, va a valutare le politiche decisionali alternative, seleziona quelle maggiormente idonee e le va a implementare. La comunicazione del rischio, da ultimo, si occupa dell'interscambio di informazioni tra tutti gli attori coinvolti nel processo.

Verso la fine degli anni '90, la Commissione del Codex Alimentarius (CAC), l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e la Food and Agricultural Organization (FAO) hanno delineato un modello di valutazione del rischio applicato alla sicurezza microbiologica degli alimenti, denominato *Microbiological Risk Assessment* (MRA). La MRA viene espressamente definita come strumento da impiegare per fronteggiare preventivamente i rischi rappresentati dai microrganismi patogeni trasmessi mediante l'assunzione di alimenti contaminati ed è tuttora identificata come area di lavoro prioritaria (CAC, 1999; FAO/WHOa; b, 2008). Il modello della MRA contempla un processo che include quattro componenti distinte: l'identificazione dei pericoli (*hazard identification*); la valutazione dell'esposizione (*exposure assessment*); la caratterizzazione del pericoli (*hazard characterization*) ed infine la caratterizzazione del rischio (*risk characterization*) (Fig. 10).

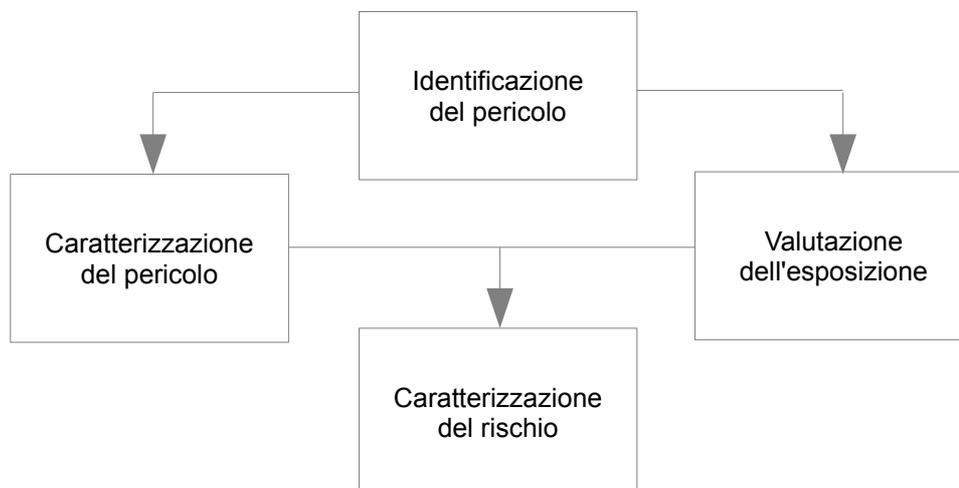


Fig. 10: Le quattro componenti del paradigma della valutazione del rischio (adattato da: FAO & WHO, 2008).

Anche se l'ambito natio di applicazione della MRA è quello dell'industria agroalimentare o, più in generale, della filiera di produzione e trasformazione degli alimenti, i principi che contraddistinguono il modello sono facilmente applicabili anche allo studio delle dinamiche proprie delle filiere idriche. Non va infatti dimenticato che l'acqua, pur non possedendo né calorie né valori nutrizionali, costituisce di fatto l'alimento più importante della dieta umana.

Nel contesto del presente lavoro, si può delineare un'applicazione della MRA all'ambito delle filiere idriche, la quale viene così ad essere indirizzata all'indagine conoscitiva del ruolo e delle dinamiche di contaminazione e persistenza proprie di *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium parvum*. Le quattro componenti della MRA, coerentemente, possono essere così interpretate:

- l'identificazione del pericolo è il processo di selezione e descrizione qualitativa dei pericoli di natura microbiologica. Ad oggi, l'identificazione del pericolo per gran parte dei patogeni emergenti non è ancora stata sviluppata completamente. Per contro, nel caso di *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium parvum*, le numerose ricerche effettuate a livello internazionale e già presentate nella sezione introduttiva del presente lavoro (cfr. 1.) consentono di effettuare una caratterizzazione integrata del loro ciclo vitale, della via di trasmissione, dei fattori di resistenza intrinseci nonché del potenziale epidemiologico dei due protozoi, restituendo a tutti gli effetti non solo un'analisi di identificazione preliminare, ma una caratterizzazione alquanto esauriente del pericolo rappresentato dalla presenza dei due patogeni nelle risorse idropotabili (FAO/WHO, 2003).

- la valutazione dell'esposizione fornisce una misura qualitativa e/o quantitativa di quanto la popolazione sia di fatto esposta ad un determinato agente patogeno come conseguenza dell'assunzione di un determinato alimento o, più coerentemente con l'ambito del presente elaborato, della fruizione di una determinata risorsa idropotabile. La valutazione dell'esposizione deve contemplare una stima sia della probabilità di utilizzare una data risorsa contaminata che del livello, inteso come numerosità o carica, del patogeno di interesse.

- la caratterizzazione del pericolo si concentra poi sulla tipologia degli effetti che l'ingestione del patogeno comporta, ovvero va a descrivere il quadro clinico caratteristico dell'infezione e ne determina l'eventuale dinamica di dose-risposta. Sia la giardiasi che la criptosporidiosi sono state esaustivamente descritte in numerosi studi di carattere clinico, tanto che, ad esempio, la dose infettiva di entrambi i patogeni è già nota (cfr. 1.3.3 eErrore: sorgente del riferimento non trovata).

- la caratterizzazione del rischio consiste nell'integrazione dei tre precedenti elementi e porta all'ottenimento di una stima quantitativa composta dalla probabilità che un dato pericolo si verifichi concretamente e dalla gravità delle ripercussioni che questo ha sulla salute umana (FAO/WHO, 2003; 2008a; 2008b).

Tra le quattro componenti proprie della MRA, la valutazione dell'esposizione è di particolare interesse contestualmente alla contaminazione delle risorse idropotabili da parte di *Giardia* e *Cryptosporidium*. In bibliografia sono pochi e scarni i lavori caratterizzati da un approccio olistico ed interdisciplinare, che risulta necessario per approfondire debitamente l'argomento (Rose et al. 1991; Ryu et al., 2007). Per contro si è riscontrato come siano

molteplici i dati che, opportunamente rielaborati, possono apportare un contributo notevole allo sviluppo del tema. Nello specifico si tratta dei numerosi *case-report* di eventi epidemici di giardiasi e/o criptosporidiosi reperibili che, oltre ai dati di carattere prettamente epidemiologico, riportano informazioni anche circa le condizioni di contorno e gli eventi che hanno portato allo scoppio dell'infezione comunitaria (Karanis, 2007; Baldursson and Karanis, 2011). Una corretta valutazione dell'esposizione deve infatti considerare tutti i principali fattori che comportano un effetto diretto sul livello e la probabilità di esposizione al pericolo, realizzando scenari alternativi per delineare tutte le possibili interazioni e modalità di esposizione (CAC, 1999; (FAO/WHO, 2008a). Nel caso di *Giardia* e *Cryptosporidium* ciò si traduce con l'individuazione e la caratterizzazione dei fattori che determinano le dinamiche di contaminazione protozoaria delle risorse idropotabili, unitamente all'identificazione delle possibili vie di trasmissione. Si è già visto come, per entrambi i protozoi, la via di trasmissione sia esclusivamente quella oro-fecale: le modalità di esposizione sono pertanto riconducibili all'ingestione involontaria di (oo)cisti, o mediante assunzione di acqua ritenuta potabile, o durante la balneazione in acque contaminate. Solitamente, la valutazione dell'esposizione viene condotta con carattere strettamente locale, basandosi su dati geo-specifici che descrivono in modo realistico soltanto areali limitati. Nel caso della contaminazione protozoaria delle risorse idriche, però, possiamo assumere che le dinamiche siano simili anche su scala internazionale, dal momento che le opere di ingegneria sanitaria e le tipologie di trattamento operate sono per lo più standard. Ad ogni modo, dal momento che è abbastanza comune trovarsi di fronte ad un'incompletezza o disomogeneità dell'informazione, per quanto numerosi possano essere i dati disponibili, si può ovviare al problema adottando un *modello di stima* per valutare l'esposizione effettiva e caratterizzare numericamente il rischio di contaminazione delle risorse idriche. Il modello vuole essere una rappresentazione semplificata di un sistema più complesso, capace di esplicitare come il sistema in esame risponda in determinate situazioni. Il vantaggio principale di un modello è quello di poter formulare una predizione di eventi non ancora verificati o osservati. Si possono mettere a punto modelli di stima qualitativi, con funzione prettamente descrittiva, e modelli quantitativi, che prevedono il processamento analitico di variabili numeriche. Sempre in relazione alla tipologia dei dati disponibili, è possibile realizzare anche modelli misti, definiti semi-quantitativi. Per l'implementazione di questi ultimi si rende necessario raccogliere dati appartenenti a due categorie principali. La prima comprende i dati che descrivono i processi biologici, ambientali ed antropici in gioco, mentre la seconda include i dati numerici necessari per stimare quantitativamente l'esposizione. Anche se l'impiego di modelli semi-quantitativi nell'ambito della sicurezza alimentare è piuttosto recente, essi sono guardati con crescente interesse dal momento che forniscono un livello di analisi intermedio tra la valutazione meramente descrittiva di dati qualitativi e la complessa ed esigente indagine analitica di variabili numeriche. Il vantaggio principale di questa tipologia di modello è quello di ovviare al poco rigore scientifico ed alle numerose incertezze che spesso caratterizzano i modelli qualitativi, senza però necessitare di addentrarsi tra complessi calcoli matematici e raccogliere sterminate serie di dati, come richiesto dai modelli puramente quantitativi.

SEZIONE II – Materiali e metodi

3. Il sito sperimentale: la filiera idrica integrata di Padova

Il D. Lgs. 152/2006, recante *Norme in materia ambientale*, definisce il servizio idrico integrato come quel servizio “costituito dall'insieme dei servizi pubblici di captazione, adduzione e distribuzione di acqua ad usi civili, di fognatura e di depurazione delle acque reflue”. Per quanto concerne il Comune di Padova, il servizio idrico integrato è attualmente affidato alla società Acegas-Aps (gruppo Hera), che ne gestisce tutti i sopracitati settori.

La principale fonte di approvvigionamento idrico della città patavina è costituita dal sistema falde sotterranee che riaffiorano nei pressi di Dueville (VI), nella cosiddetta *fascia delle risorgive* dell'Alto Vicentino. Ivi si trovano numerosi pozzi artesiani di attingimento che, con una potenzialità di erogazione complessiva di 1 400 L/s, garantiscono la fornitura del 92% del fabbisogno idrico complessivo dell'area urbana di Padova. Il restante 8% deriva dalla captazione accessoria delle acque superficiali del Canale Brentella. L'allontanamento del refluo civile di Padova è poi garantito da un complesso sistema fognario di tipologia prevalentemente mista che conferisce i liquami al depuratore cittadino, sito in località Ca' Nordio. L'effluente dell'impianto, in seguito al trattamento depurativo, va poi ad immettersi nel fiume Bacchiglione, nel tratto denominato Canale Scaricatore, che abbandona l'area urbana padovana e fluisce in direzione S-SE fino a sfociare nei pressi di Sottomarina (VE), congiuntamente al fiume Brenta.

Nel presente studio si è andati ad indagare la presenza di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. lungo l'intera filiera idrica sopra descritta, con lo scopo di valutare la dinamica di un'eventuale contaminazione e persistenza delle risorse idropotabili da parte dei due protozoi enteropatogeni.

3.1 Il sito di captazione dell'acquedotto padovano: le risorgive di Villaverla

214 m² nel territorio del Comune di Dueville. Dal 1970 esso è stato riconosciuto come area protetta e denominato *Oasi Naturalistica di Villaverla*. All'interno di questa qualsiasi tipo di coltivazione agraria è stato bandito e si sta correntemente cercando di ripristinare l'ecosistema floro-faunistico delle antiche foreste planiziali che un tempo caratterizzavano l'area (Gerometta and Crestani, 2012a; Peruzzo et al., 2012). L'Oasi si colloca nella *fascia delle risorgive* dell'Alto Vicentino, lungo la quale si ha la naturale fuoriuscita dalla falda sotterranea delle portate idriche eccedenti. Queste acque emergenti originano un reticolo superficiale diverso da quello dei corsi d'acqua naturali e contribuiscono alla creazione delle zone umide, di particolare bellezza ed importanza ecologica, come, ad esempio, la sopracitata zona umida del Bosco di Villaverla. La posizione della linea delle risorgive migra stagionalmente in funzione delle variazioni del bilancio idrico, interessando una fascia di larghezza variabile fra 2 e 10 km (Rinaldo et al., 2004).

Il viaggio sotterraneo dell'acqua, dal momento in cui essa cade come precipitazione meteorica nella pedemontana e sui vicini rilievi a quello in cui riaffiora nel territorio dell'Oasi,

dura all'incirca 10 anni. In questo decennio l'acqua, infiltrandosi tra strati di sabbia e ghiaia via via più profondi, subisce un processo di filtrazione mediante il quale le particelle solide più grossolane che essa trasporta vengono rimosse fisicamente dal suolo. Una parte consistente delle particelle più piccole viene invece trattenuta grazie ad effetti chimico-fisici equiparabili ai trattamenti artificiali di coagulazione ed adsorbimento. Ad idonee porosità, la filtrazione operata dal terreno va a trattenere anche i microrganismi eventualmente presenti nelle acque. Basti pensare che il grado di qualità microbiologica dell'acqua che zampilla dalle risorgive è tale da rendere teoricamente non necessario alcun trattamento di disinfezione. La clorazione con ipoclorito di sodio viene comunque operata a scopo cautelativo vista la grande lunghezza delle condotte di adduzione. Il contatto con i ciottoli innesca inoltre un processo di mineralizzazione che arricchisce l'acqua di sostanze inorganiche (Peruzzo et al., 2012).

Gli acquiferi dell'Alta e Media pianura vicentina, oltre ad alimentare la rete acquedottistica padovana (60% dei prelievi), costituiscono la fonte di approvvigionamento idrico anche per la maggior parte del territorio provinciale vicentino (40% dei prelievi). Questa notevole disponibilità idrica ha permesso lo sviluppo di numerose attività industriali che necessitano di elevati volumi d'acqua nel loro ciclo produttivo ed il contemporaneo accrescimento del settore agricolo, strettamente connesso alla fornitura di acqua per scopi irrigui. Il territorio considerato si estende nell'anfiteatro alluvionale disteso a nord di Vicenza, sino alle pendici meridionali dell'Altopiano di Asiago, ed è compreso fra i monti Lessini ad ovest ed il fiume Astico ad est. La zona è attraversata da alcuni corsi d'acqua il cui bacino idrografico è particolarmente esteso, e.g. i fiumi Leogra e Timonchio. All'interno dell'area l'andamento del terreno è sostanzialmente pianeggiante, con pendenze decrescenti da nord-ovest verso sud-est. Uno dei caratteri principali di questa zona è proprio la straordinaria ricchezza delle falde d'acqua sotterranea, derivante sostanzialmente da due fattori: una struttura geologica del sottosuolo particolarmente favorevole e ed il delicato meccanismo che consente la ricarica dell'acquifero esistente (Rinaldo et al., 2004; Boscolo and Mion, 2008).

Da nord verso sud la pianura alluvionale può essere suddivisa in tre zone principali: la zona di ricarica, la fascia delle risorgive e la zona di accumulo (Fig. 11). La zona di ricarica è individuata dal materasso alluvionale dell'alta pianura. L'alta pianura è infatti formata da una serie di conoidi alluvionali di sabbia e ghiaia, sovrapposte ed intersecate fra loro, depositatesi in corrispondenza dello sbocco in valle dei corsi d'acqua. Tale zona, dotata di elevata permeabilità, costituisce un imponente acquifero indifferenziato. Questa zona è caratterizzata dalla presenza di un'unica falda freatica a superficie libera, per altro molto vulnerabile a fenomeni di inquinamento, le cui isofreatiche (linee che congiungono i punti della falda con stessa profondità) si avvicinano, procedendo verso SE, alle quote del piano campagna. In questa zona la falda ha una velocità di scorrimento che può arrivare fino a 12 m al giorno (Mion, 2002).

Nella parte più meridionale della zona di ricarica, ovvero nella media pianura, i depositi sono rappresentati da materiali progressivamente più fini, costituiti da ghiaie e sabbie con digitazioni limose ed argillose le quali diventano sempre più frequenti da monte a valle.

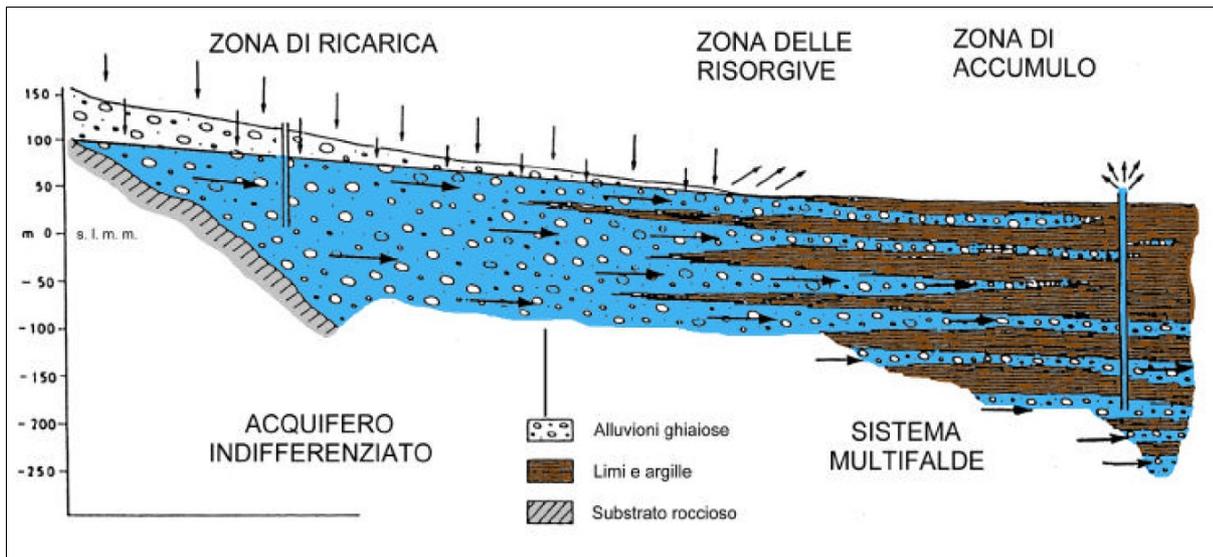


Fig. 11: Rappresentazione schematica di una sezione dell'acquifero dell'Alto Vicentino (Altissimo et al., 1999). Lo spessore del materasso permeabile di sabbia e ghiaia cresce progressivamente con l'allontanamento dalla zona pedemontana, fino ad infraporsi agli strati impermeabili di limo e argilla che forzano la risalita dell'acqua.

L'orizzonte argilloso e discontinuo che compare inizia a separare le falde libere superficiali (*falde freatiche*) dalle falde più profonde e in pressione (*falde artesiane*), che si vengono a localizzare negli strati permeabili intercalati a quelli argillosi, dotati invece di bassissima permeabilità. Il sistema delle falde in pressione è strettamente collegato verso monte all'unica grande falda freatica indifferenziata dalla quale trae alimentazione ed è condizionato dal punto di vista qualitativo (Rinaldo et al., 2004).

La fascia delle risorgive o *fontanili*, è la zona della media pianura in cui si ha l'affioramento spontaneo delle portate eccedenti della falda sotterranea. La falda sotterranea, infatti, fortemente alimentata dalle acque meteoriche e da quelle dei fiumi che si infiltrano nei terreni permeabili dell'alta pianura, ha un notevole carico idrostatico, ma viene ostacolata nel suo deflusso verso Sud dai terreni impermeabili della bassa pianura. Le acque vengono in questo modo forzate ad emergere, formando le risorgive. Da un punto di vista puramente idraulico le risorgive costituiscono il "troppo pieno" del grande acquifero indifferenziato del Vicentino. Le acque affioranti originano un reticolo superficiale diverso da quello dei corsi d'acqua naturali e contribuiscono alla creazione di aree umide di particolare bellezza ed importanza ecologica, come ad esempio l'Oasi di Villaverla. La posizione della linea delle risorgive non è stabile, ma migra stagionalmente in funzione delle variazioni del bilancio idrico, interessando una fascia di larghezza variabile fra i 2 ed i 10 km (Chemello, 2008).

La zona di accumulo, infine, si trova a sud delle risorgive ed è caratterizzata da una netta differenziazione in falde sovrapposte che danno luogo ad un complesso acquifero multistrato, tipico della bassa pianura. I depositi alluvionali ghiaiosi profondi si assottigliano sempre più, fino ad esaurirsi. Qui il sottosuolo è costituito da un'alternanza di materiali a granulometria fine (limi, argille e frazioni intermedie) con sabbie a variabile percentuale di materiali più fini (sabbie limose, sabbie debolmente limose, limi sabbiosi, ecc.). Gli acquiferi

artesiani derivanti da questa struttura geologica sono caratterizzati da bassa permeabilità e contengono falde con bassa potenzialità e ridotta estensione, e.g. gli acquiferi del veneziano (Mion, 2002), le cui acque scorrono a una velocità di 1-10 cm al giorno (Chemello, 2008).

A profondità progressive sono presenti dunque diverse falde acquifere: quella più superficiale (≥ 25 m sotto il piano campagna) è poco utilizzata. Le prime falde artesiane in pressione, rispettivamente collocate tra i 25 e i 60 m e tra i 70 ed i 100 m sotto il piano campagna, sono già discretamente sfruttate. Ad ogni modo, sono le falde più profonde a costituire la più importante fonte di approvvigionamento per gli scopi acquedottistici (Rinaldo et al., 2004).

3.2 La storia idrogeologica dell'acquifero dell'Alto Vicentino

I processi sedimentari avvenuti nel corso delle recenti ere geologiche hanno prodotto una serie di depositi alluvionali nella pianura veneta, tra loro sovrapposti ed intercalati, che costituiscono uno dei più capienti serbatoi d'acqua sotterranea di tutta Europa. La costruzione di tale serbatoio è legata all'intensa attività orogenetica alpina che si è esplicitata in più fasi a partire dal Cretaceo (150 Ma) fino al Pliocene (5 Ma). Nel Cretaceo (Mesozoico) la regione italiana si trovava sommersa da un braccio occidentale della Tetide, l'oceano che si interpose tra i supercontinenti Laurasia e Gondwana lungo l'asse est-ovest in seguito alla rottura della Pangea. I sedimenti marini si accumularono nel tempo assumendo spessori di migliaia di metri e si trasformarono in calcari dolomitici. Nell'era successiva, il Cenozoico, in seguito al movimento della zolla africana contro quella europea, iniziò il corrugamento del fondale marino. Il processo di orogenesi delle Alpi che ne derivò si protrasse fino al tardo la fine del Miocene, ovvero circa 10 Ma or sono (Boscolo and Mion, 2008).

La struttura oro-tettonica risultante, che ora si trova lungo la direttrice Schio-Bassano, apparve estremamente favorevole ai fenomeni idrogeologici successivi: gli strati dolomitici, che nelle zone più elevate andarono a formare i massicci delle Piccole Dolomiti, si trovano flessi verso il basso, creando una fossa tettonica in grado di accogliere i sedimenti erosivi dei periodi geologici seguenti. L'acquifero vero e proprio si andò infatti a costituire durante l'ultimo milione e mezzo di anni, nel Pleistocene. L'ampia insenatura compresa tra le Alpi e l'Appennino Tosco-Emiliano alla fine del Pliocene costituiva il golfo Pliocenico Padano, completamente sommerso da un mare tropicale che arrivava a lambire le Alpi piemontesi. Tra il Pliocene ed il Pleistocene inferiore questa insenatura venne progressivamente riempita da depositi marini, soprattutto nella parte orientale, e da depositi fluviali (Boscolo and Mion, 2008).

L'attuale aspetto della Pianura Padano-Veneta è dovuto all'azione dei ghiacciai e dei fiumi, rispettivamente durante i quattro periodi glaciali (Günz, Mindel, Riss e Würm) della glaciazione quaternaria ed i relativi periodi interglaciali. I ghiacciai che ricoprivano le vallate alpine esercitavano un'intensa attività erosiva i cui prodotti venivano accumulati allo sbocco delle valli in pianura sotto forma di anfiteatri morenici, estremamente permeabili (*conoidi alluvionali* o *di deiezione*). L'ultimo periodo glaciale, il Würm, terminò all'incirca 10 000

mila anni fa ed è a partire da questo momento che i fiumi iniziarono a dare l'assetto attuale alla pianura e a creare le premesse per la formazione delle risorgive. I materiali che i fiumi riprendevano dai depositi morenici, granulometricamente eterogenei, vennero depositati in pianura in un ordine che seguiva la loro dimensione (ghiaie-sabbie-limi-argille). L'ordine segue di fatto la granulometria dei sedimenti, ma non è mai rigido e dipende da diversi fattori, tra cui la portata delle varie fasi di piena e la composizione litologica. In modo congruente, analizzando una sezione NO-SE della pianura veneta si può osservare che le ghiaie dominano verso Nord ed i sedimenti fini prevalgono verso Sud. Tra le due fasce è possibile individuarne una di transizione, con caratteristiche litologiche intermedie, che nel vicentino assume un'ampiezza variabile dai 2 ai 10 km (Zanovello, 2001; Chemello, 2008).

3.3 Il bilancio idrologico

L'imponente serbatoio sotterraneo dell'Alto Vicentino ospita enormi quantità di acqua, la cui provenienza va ricondotta essenzialmente a due diversi fenomeni: le precipitazioni atmosferiche (~1 500 mm/anno) e l'infiltrazione nel terreno ghiaioso delle acque dei fiumi. Il volume efficace dell'acquifero, ovvero la somma degli spazi vuoti, supera i 180 milioni di m³. Il bilancio della riserva idrica disponibile è al momento positivo, ed è caratterizzato da afflussi in entrata, nella zona di ricarica, e deflussi in uscita. Il sistema si mantiene in equilibrio fin tanto che afflussi e deflussi assumono dimensioni simili, pur nella variabilità tipica dei diversi fattori del bilancio (Altissimo et al., 1999). I principali afflussi che determinano la ricarica degli acquiferi sotterranei sono:

- le infiltrazioni delle precipitazioni atmosferiche (20%)
- le dispersioni dei corsi d'acqua (46%)
- le infiltrazioni delle acque irrigue (34%)

Dei diversi contributi alla ricarica della falda, quello della dispersione dall'alveo dei corsi d'acqua, favorito dalla natura ghiaiosa del materasso alluvionale, è il più significativo. Si ha dispersione in alveo quando il pelo libero del corso d'acqua è ad una quota superiore rispetto al livello freatico. In caso contrario è l'acquifero ad alimentare il corso d'acqua. Le dispersioni, entro un certo limite, sono proporzionali alle portate dei corsi d'acqua e quindi agli afflussi meteorici.

Il contributo alla ricarica degli acquiferi costituito dalle precipitazioni meteoriche è favorito dalla componente ghiaiosa del terreno e dalle basse pendenze del suolo, fattori che agevolano il processo di infiltrazione nel sottosuolo. La precipitazione efficace, intesa come contributo meteorico alla ricarica degli acquiferi, può essere assunta come differenza tra le precipitazioni e l'evapo-traspirazione, essendo questa l'unica causa di perdita di risorsa.

L'ultimo fattore da prendere in considerazione per valutare il processo di ricarica degli acquiferi è quello dovuto all'acqua che viene dispersa sul terreno dai sistemi di irrigazione: ciò è molto importante perché buona parte dei terreni irrigui si trova nell'area di ricarica della falda, e consente di affermare che la pressione esercitata sull'ambiente dall'irrigazione è, senza considerare l'aspetto qualitativo, minore rispetto a quella esercitata da prelievi idrici di altro

tipo, pur trattandosi di quantità d'acqua estremamente elevate. I principali deflussi del sistema sono invece:

- le portate uscenti dalle risorgive
- i prelievi artificiali (uso acquedottistico, irriguo, industriale, privato)
- i deflussi sotterranei del sistema in pressione attraverso le frontiere meridionali

Le portate spontaneamente uscenti dalle risorgive possono essere considerate come il *tropo pieno* del sistema idrogeologico sotterraneo, tanto che un'importante fonte di informazione sul regime della falda è rappresentata proprio dal regime uscente delle risorgive. Ad ogni modo l'intervento umano ha parzialmente modificato il loro aspetto creando numerosi punti di emergenza dove le portate sono estratte con opere artificiali per l'uso acquedottistico, agricolo, industriale o privato.

Negli ultimi 20 anni la popolazione delle province di Vicenza e Padova è aumentata di circa un decimo e, conseguentemente, si è registrato un significativo aumento dei prelievi idrici per uso potabile. Ad ogni modo i prelievi d'acqua ad uso potabile interessano solo una piccola porzione della capacità produttiva dell'acquifero e possono essere considerati quasi trascurabili. I prelievi ad uso irriguo sono gestiti dai Consorzi di irrigazione e bonifica, che prelevano le risorse idriche sia da corsi d'acqua superficiale, sia da corpi idrici sotterranei. Nei mesi estivi vengono utilizzati dei pozzi di soccorso, che permettono di garantire anche nei periodi di magra dei corsi d'acqua, l'adeguata irrigazione alle coltivazioni. Per quanto riguarda il settore industriale, le attività che pesano di più in termini di prelievo in provincia di Vicenza sono l'industria della carta, l'industria chimica-farmaceutica, la lavorazione di minerali non metalliferi, l'industria della concia e l'industria alimentare. Si può comunque affermare che, mentre la domanda idrica per unità di prodotto presenta una tendenza alla diminuzione, grazie all'innovazione tecnologica, la domanda idrica totale risulta in crescita sia per l'incremento delle produzioni, sia per una maggiore diffusione di usi impropri dell'acqua stessa. e.g. la necessità di rispettare la qualità dello scarico industriale finale (Rinaldo et al., 2004; Boscolo and Mion, 2008).

La grande facilità di reperimento di acqua nel sottosuolo, soprattutto nei comuni ubicati immediatamente a valle della fascia delle risorgive, ha favorito lo sfruttamento diretto ad uso privato delle acque sotterranee prelevate da falde in pressione ad erogazione spontanea, poste a debole profondità. Tale circostanza ha determinato, in alcuni comuni, la totale assenza di acquedotti pubblici (Dueville e Pozzoleone) o un loro parziale sviluppo (Schiavon, Bressanvido, Bolzano Vicentino). Due censimenti, effettuati dall'Università di Padova (1992-1995) e dal Centro Idrico di Novoledo (1997-1998) hanno individuato la presenza di circa 3300 pozzi artesiani in un territorio di 17 comuni (11 in provincia di Vicenza, 6 in provincia di Padova). A questi pozzi vanno aggiunti quelli freatici che, sebbene in numero più elevato (circa 5000), generalmente si alimentano da falde di scarso interesse sotto il profilo qualitativo e quantitativo e con portate estratte che risultano inferiori di almeno un ordine di grandezza. Verrà discussa in seguito un'attività preliminare che ha visto il campionamento di alcuni pozzi, sia superficiali che profondi, dislocati nel territorio del Comune di Dueville, sia come test operativo sul campo per il collaudo delle metodica

analitica per la detezone di *Giardia* e *Cryptosporidium*, che per una valutazione della qualità microbiologica della falda acquifera dell'Alto Vicentino (cfr. 4.1).

3.4 La storia dell'acquedotto di Padova

Sebbene in epoca romana l'antica *Patavium* fosse dotata di un acquedotto civico, dal periodo alto-medievale fino al XIX secolo la città sfruttò per il proprio approvvigionamento idrico unicamente dei pozzi di raccolta delle acque meteoriche e/o delle acque superficiali del Bacchiglione. La storia del moderno acquedotto di Padova inizia infatti nella seconda metà del '800 (Zanovello, 2001), quando il fenomeno dell'urbanesimo comportò un rapido accrescimento dell'area urbana, l'incremento della popolazione residente e lo sviluppo delle attività industriali. I pozzi cittadini iniziarono pertanto a non costituire più una fonte di approvvigionamento sufficiente ma soprattutto sicura. Vista l'assenza di un sistema fognario che drenasse i reflui in modo appropriato, i pozzi iniziarono infatti a raccogliere anche gli scarichi, sia domestici che industriali, che percolavano nel terreno o che venivano riversati nel Bacchiglione. La situazione sanitaria di Padova si fece critica, con il verificarsi di numerosi casi di febbre tifoide e perfino di epidemie di colera (Berselli, 1868; Romano, 2001).

Di fronte alla pressante esigenza di risolvere la criticità della situazione sanitaria, nel 1875 il Comune istituì una Commissione *scientifica* incaricata di realizzare uno studio preliminare per la realizzazione congiunta di un acquedotto e del sistema fognario. A distanza di due anni, nel 1877, non avendo ancora ottenuto alcun risultato, venne eletta una seconda Commissione che si dedicò allo studio esclusivo dell'acquedotto. Come verrà discusso in seguito, il problema dell'assenza di fognature verrà invece ripreso soltanto a distanza di vent'anni (cfr. 3.6). La nuova Commissione si trovò innanzitutto a dover individuare la fonte più adatta per l'approvvigionamento idrico di Padova. Per la prima volta si parlò di captare le acque di *risorgiva*, molto più protette dalla contaminazione sia rispetto ai pozzi cittadini che alle acque superficiali dei fiumi limitrofi. Nello specifico, furono prese in considerazione le risorgive presenti nelle aree di Fontaniva (PD), Oliero (VI), Camisino (VI) e dell'area di Dueville-Villaverla-Povolara, nell'Alto Vicentino. La maggiore causa di perplessità consisteva però nella grande distanza (>30 km) che intercorreva tra tutte queste aree di risorgiva e la città, a differenza dei vicini fiumi Brenta e Bacchiglione. Ad ogni modo, vista la qualità nettamente superiore delle acque sotterranee, indicate come fonti da preferire anche dagli igienisti dell'epoca, e la sicurezza di avere a disposizione un approvvigionamento continuo ed indipendente dalla stagionalità, ben presto si abbandonò l'idea di rifornire Padova con acque superficiali (Maffei, 2001).

I progetti alternativi che vennero valutati dalla Commissione furono numerosi e soltanto nel 1885 venne scelto ed approvato il progetto definitivo. Tale progetto fu quello presentato dall'Ing. Vincenzo Stefano Breda, presidente della *Società Veneta per Imprese e Costruzioni Pubbliche*. Il progetto finale, secondo le prescrizioni della stessa Commissione, avrebbe previsto la captazione delle acque provenienti dalle risorgive di Villaverla, la costruzione di una condotta libera per l'adduzione nonché la realizzazione di una rete di

distribuzione cittadina in tubi di ghisa. La Società Veneta, che già aveva costruito gli acquedotti di Venezia, Verona e Napoli, si appaltò così l'esecuzione dei lavori e l'anno successivo iniziò a scavare i primi pozzi nell'Alto Vicentino, mediante l'infissione nel terreno di pozzi Norton o *pozzi a tubi battuti*. Vennero scavati un totale di 131 pozzi, ad una profondità compresa tra gli 8 ed i 25 m. L'acqua zampillante dai pozzi sarebbe confluita in una galleria di presa coperta, che la avrebbe poi convogliata in due vasche di raccolta, punto di partenza della lunga condotta di adduzione (Gerometta and Crestani, 2012a).

I lavori della linea di adduzione vennero terminati nel 1890, con il completamento di una canaletta in calcestruzzo a sezione trapezoidale lunga più di 40 km, nota come “Canaletta a pelo libero”. Dall'edificio della galleria di presa di Villaverla, la canaletta partiva verso il territorio urbano di Padova, seguendo un percorso sotterraneo snodato dapprima parallelamente alla ferrovia Vicenza-Schio e poi lungo il tracciato della strada provinciale Vicenza-Padova (Fig. 12; Fig. 13). Il tragitto gravimetrico dell'acqua da Villaverla a Padova, con una velocità media di circa 1 m/s, durava all'incirca 10 ore e quotidianamente venivano trasportati 40 milioni di litri d'acqua, pari a circa 15 miliardi di litri l'anno (Maffei, 2001; Gerometta and Crestani, 2012a).

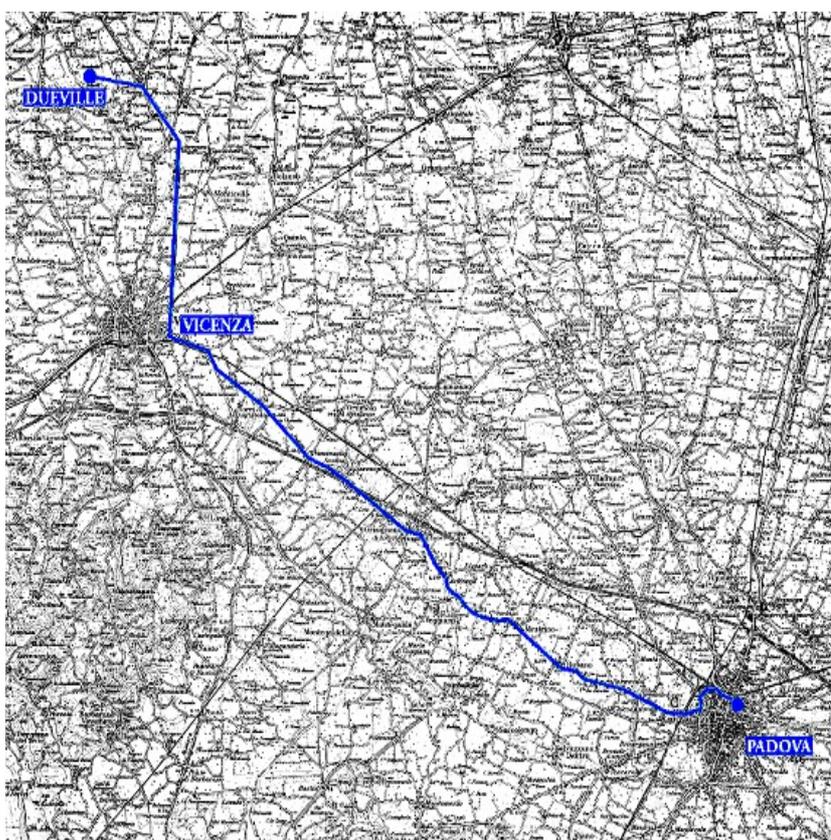


Fig. 12: Il percorso sotterraneo della linea di adduzione dell'acquedotto padovano più antica, la Canaletta a pelo libero, ultimata nel 1890.

Nelle scelte operate dalla Società Veneta, sicuramente era individuabile l'intenzione di progettare e realizzare un acquedotto che, con una sola condotta, potesse rifornire non solo

Padova, ma anche Vicenza e, in parte, Venezia. A testimonianza di ciò, vi è la realizzazione del Partitore, un piccolo edificio realizzato a Vicenza per dividere l'acqua destinata a Padova da quella eventualmente messa a disposizione della città berica. L'obiettivo della Società Veneta, però, non si concretizzò e, nel 1891, una pesante crisi economica costrinse la Società a vendere l'acquedotto allo stesso comune patavino (Maffei, 2001).

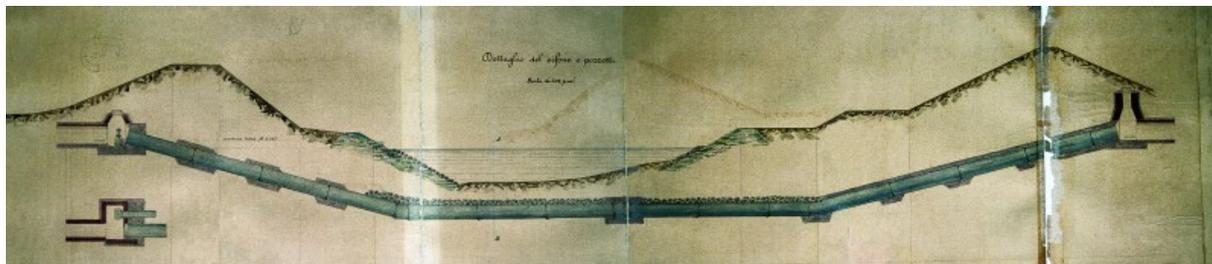


Fig. 13: La Canaletta a pelo libero si trovò a dover superare alcuni corsi d'acqua (Tesina, Tesinella, Ceresone, Brentella) che scorrevano trasversalmente al suo percorso sotterraneo. A questo scopo vennero realizzate delle strutture apposite, dette sifoni, che permettono di oltrepassare tali corsi d'acqua, passando sotto al loro letto. Per resistere alla forte pressione esercitata dall'acqua sulle pareti del condotto in calcestruzzo, in questi tratti si utilizzarono dei tubi di ghisa.

3.5 L'acquedotto moderno

Il cuore storico dell'acquedotto di Padova è tutt'ora in funzione: i pozzi di Villaverla continuano ad erogare acqua di ottima qualità, la quale viene ancora convogliata e trasportata fino a Padova dalla Canaletta a pelo libero. Pur tuttavia l'acquedotto padovano, per far fronte al sempre crescente fabbisogno idrico, nel mentre è stato potenziato. Nel 1958, ovvero circa 70 anni dopo la realizzazione della Canaletta a pelo libero, venne infatti costruita una seconda linea di adduzione idrica in cemento, del diametro di 900 mm. La condotta da 900 mm è in grado di trasportare fino a 75 milioni di litri d'acqua al giorno, pari a 27 miliardi di litri l'anno. Anche questa seconda linea recapita a Padova acqua captata da pozzi nell'Alto Vicentino (Gerometta and Crestani, 2012a).

Nel 2000 è stata realizzata una terza linea di adduzione, che si compone di una moderna condotta in acciaio del diametro di 1 300 mm. All'interno della nuova condotta l'acqua non scorre più per semplice gravità, ma in pressione, accorciando così notevolmente i tempi di percorrenza e limitando al contempo il rischio di contaminazione da infiltrazioni. La nuova linea di adduzione è in grado di trasportare da sola 150 milioni di litri d'acqua al giorno. La nuova condotta in acciaio non parte da Villaverla, ma dall'impianto a carboni attivi di Saviabona, posto una decina di chilometri più a Sud rispetto alle risorgive classiche, per poi raggiungere il padovano seguendo un percorso parallelo a quello della condotta da 900 mm. Nei pressi della Centrale di Saviabona sono stati inoltre messi in funzione 20 nuovi pozzi profondi di attingimento.

Ad oggi l'acquedotto di Padova si compone dunque di tre linee di adduzione (Fig. 14): la Canaletta a pelo libero, la condotta da 900 mm e la condotta da 1 300 mm. Esse, complessivamente, soddisfano il fabbisogno idrico di circa 300 000 utenti, garantendo una

fornitura annua complessiva di più di 44 milioni di m³ di acqua potabile (Tab. 2) (Gerometta and Crestani, 2012a). Le infrastrutture che complementano il moderno sistema acquedottistico di Padova si possono dividere per classi di funzionalità in: centrali di potabilizzazione, stazioni di sollevamento, serbatoi di stoccaggio.

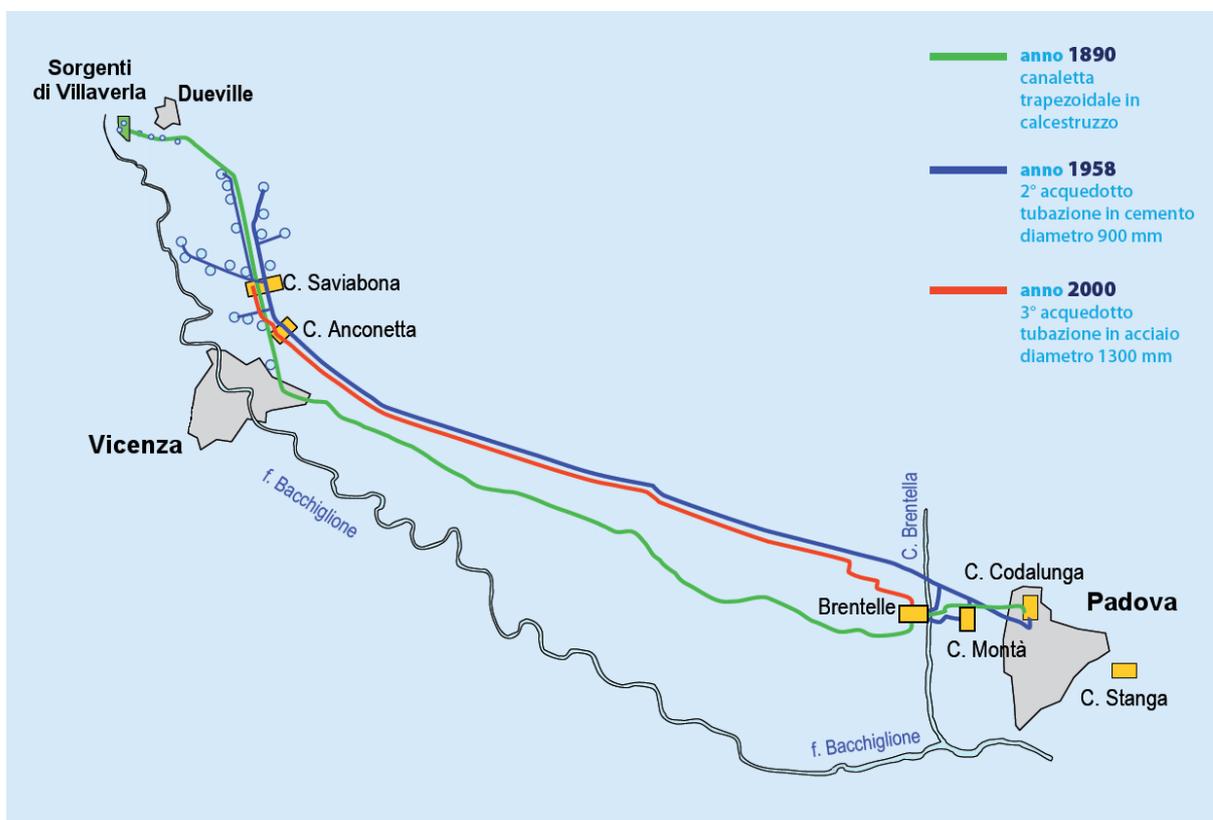


Fig. 14: Schema dell'infrastruttura acquedottistica moderna. La figura riporta i centri urbani di riferimento (Dueville, Vicenza e Padova) ed il percorso delle tre linee di adduzione: la Canaletta a pelo libero (verde), la condotta in cemento del 1958 (blu) e la tubazione in acciaio inaugurata nel 2000 (rosso).

Abitanti serviti	n.	301 201
UtENZE TOTALI	n.	142 706
famiglie		117 660
utenze non domestiche		25 046
Acqua addotta	m ³	44 142 939
da falda sotterranea	%	92
superficiale	%	8
Lunghezza rete	km	2 058
Tot. linee di adduzione	km	175
Tot. rete di distribuzione	km	1 883

Tab. 2: Il servizio acquedottistico di Padova in cifre (dati aggiornati al 01.01.2011).

Dal punto di vista impiantistico, l'acquedotto di Padova è dotato di 4 centrali polifunzionali che assolvono i compiti sopra elencati in punti diversi della filiera idrica: la *centrale di Saviabona* (VI), il *Centro Idrico Brentelle* (PD), la *Centrale di Montà* (PD) ed il *Centro Idrico Stanga* (PD).

La *Centrale di Saviabona* è un moderno impianto di trattamento con tecnologia a carboni attivi GAC 1240 che processa l'acqua proveniente da pozzi dell'Alto Vicentino particolarmente esposti al rischio di contaminazione da parte di solventi clorurati. Nel complesso essa tratta di circa un terzo dell'acqua totale prelevata dalla falda. Saviabona opera anche la pre-clorazione dell'acqua con ipoclorito di sodio, come trattamento preventivo di disinfezione. Presso la centrale di Saviabona ha poi origine la condotta di adduzione da 1 300 mm. Il *Centro Idrico Brentelle* (CIB), costruito nel 1971, costituisce il punto di arrivo in città della vecchia Canaletta a pelo libero ed è un impianto polifunzionale che provvede alla disinfezione dell'acqua da immettere in rete, al sollevamento in rete della stessa ed infine all'accumulo dell'acqua non assorbita dalla rete stessa. Per la post-clorazione finale dell'acqua in arrivo da Villaverla, subito prima dell'immissione nella rete cittadina, viene impiegato nuovamente l'ipoclorito. L'accumulo avviene in tre serbatoi cilindrici della capacità di 25 000 m³ e dell'altezza di 18 m. Un torrino centrale, con funzioni fondamentali di assorbimento delle oscillazioni idriche e di sconnettitore idraulico tra rete e serbatoio, serve da appoggio alla copertura. Il funzionamento dei gruppi di pompaggio è comandato a distanza dalla sala controllo, a seconda delle esigenze di esercizio legate all'avvicendamento stagionale. A seconda delle necessità, è consentito dunque sia l'invaso dei serbatoi di accumulo del Centro, utilizzando parte della quantità d'acqua trasportata dalla Canaletta a pelo libero, sia il pompaggio diretto della stessa in rete di distribuzione. Com'è facile intuire, i serbatoi di accumulo, costruiti in questo e negli altri Centri, servono da indispensabile riserva per sopperire alle punte di richiesta, che nei periodi di massimo consumo superano abbondantemente la quantità complessivamente prodotta. Nell'area del CIB si trova anche un impianto accessorio di attingimento di acqua dalle falde golenali del Canale Brentella, che però provvede alla captazione soltanto in caso di effettiva necessità. L'impianto di captazione in frangia al canale Brentella è essenzialmente costituito da una cortina di micropozzi golenali, collegati con un sistema di estrazione, i quali a loro volta sono raccordati con l'impianto di trattamento di Brentelle sud. Vista la minor qualità delle acque captate dai pozzi golenali rispetto alle acque di risorgiva, su queste acque oltre alla clorazione vengono operati anche i trattamenti di filtrazione rapida a sabbia, carboni attivi, deferrizzazione e demanganizzazione.

La *Centrale di Montà* costituisce un altro importante anello della filiera di distribuzione idrica padovana, presso il quale convergono la condotta da 900 mm e parte dei flussi addotti da quella da 1 300 mm e dalla Canaletta pelo libero. La potenzialità massima di pompaggio della centrale raggiunge i 1 200 L/s. Nella centrale di Montà è presente un impianto dosatore di ipoclorito, a funzionamento completamente automatico, per la disinfezione dell'acqua.

Il *Centro Idrico della Stanga* è stato progettato con caratteristiche costruttive molto

simili a quello delle Brentelle: è pure esso costituito da una centrale automatica di sollevamento e da un serbatoio di accumulo. La sua funzione è solo quella di regolazione e di compensazione: infatti il volume d'acqua immagazzinato nei periodi di minor consumo viene poi restituito nei momenti di maggiore richiesta. La sua importanza nella gestione del settore Est della città, nel quale è inserita anche la Zona Industriale, si è rilevata fondamentale. Nel suo grande serbatoio (30 000 m³ di volume per 25 m di altezza) nel periodo notturno viene immagazzinata l'acqua non assorbita dalla rete di distribuzione. Un impianto di sollevamento, con pompe a giri fissi e variabili, provvede poi a reimmettere in rete l'acqua necessaria nei periodi di massimo consumo.

3.6 Il sistema fognario e la depurazione

Un sistema fognario moderno comprende la raccolta, l'allontanamento e la depurazione delle acque reflue e va ad inserirsi come parte irrinunciabile del servizio idrico integrato, in un'ottica di gestione olistica di utilizzo e recupero delle risorse idriche.

Per quanto riguarda il passato, si presume che la Padova medievale fosse dotata in alcuni quartieri di una rete fognaria rudimentale, la quale molto probabilmente ricalcava quella precedentemente edificata dagli ingegneri di epoca romana. Tuttavia nulla si sa per certo di fognature sotterranee fino al XVII-XVIII secolo, quando compaiono i primi documenti che citano esplicitamente degli *acquedotti sotterranei*. La situazione rimase pressoché immutata fino alla fine del XIX secolo, quando si giunse ad una situazione igienico-sanitaria critica. Il problema principale era rappresentato dal fatto che i tratti esistenti di fognatura convogliavano i liquami urbani nei canali che attraversavano e circondavano la città. Tali canali erano dotati sì di una notevole capacità autodepurativa, ma erano vincolati nell'efficienza ad una bassa numerosità di popolazione, fattore che venne a mancare con l'avvento dell'urbanesimo (Caravello, 1997).

La questione fognaria di Padova cominciò dunque ad essere indagata e risolta in modo scientifico e razionale soltanto in tempi recenti. La commissione eletta nel 1875 risultò incapace di fornire un piano risolutivo e si dovette attendere il 1895 per il primo progetto concreto. Esso prevedeva l'eliminazione dei pozzi a perdere a favore dell'installazione di fosse biologiche e la separazione delle acque meteoriche. Pur mantenendo lo scarico nei canali cittadini. Il progetto si rivelò ben presto inefficace perché, in seguito al concomitante arrivo dell'acqua potabile nelle case e l'adozione dei *gabinetti a cacciata d'acqua*, i volumi dei reflui domestici aumentarono spropositatamente tanto che gli sfioratori delle fogne a livello della tombinatura stradale tracimavano (Caravello, 1997).

La realizzazione e la gestione di un adeguato sistema di raccolta e trattamento delle acque reflue in un territorio densamente popolato come quello di Padova rappresentarono un problema sicuramente complesso, che implicò lo studio di soluzioni da sviluppare in risposta ad un intenso quanto confuso sviluppo urbanistico. Tra il 1902 ed il 1910 vennero presentati alcuni progetti per fognature a canalizzazione unitaria e/o separata, che però vennero bocciati in quanto prevedevano tutti il prosciugamento dei canali interni. Nel 1920, 1936 e 1938

vennero presentati altri progetti che tenevano in considerazione la futura espansione dell'area urbana. Il progetto del 1938, in particolare, portava la firma dell'Ing. Francesco Marzolo (Padova, 2 febbraio 1892 - 2 settembre 1982) e, anche se finalmente approvato, venne interrotto sul nascere dalle vicende belliche. Nel secondo dopoguerra si ripresero i lavori ma ci rese ben presto conto che il progetto era ormai datato e inadeguato: esso non riusciva a far fronte alla nuova espansione urbana ed industriale dell'area patavina. Il progetto, se realizzato senza apportarvi alcuna modifica, avrebbe addotto delle pesanti modifiche a carico del drenaggio urbano e, più in generale, dell'assetto idraulico del territorio. La drastica diminuzione degli invasi disponibili per eliminare gli eventi di piena, congiuntamente alla progressiva pavimentazione del suolo cittadino, il quale diventava così sempre più impermeabile, andò a modificare i tempi di deflusso delle acque verso le inadeguate canalizzazioni esistenti. La rete fognaria fu dunque costruita soltanto nelle zone principali del centro storico, mentre nelle periferie si continuò ad utilizzare fossi e canali consortili, originando estesi bacini di acque cosiddette miste. Gli aspetti negativi quindi si intrecciarono, aumentando la già precaria situazione: peggiorò il deflusso degli eventi di piena, con frequenti allagamenti, e aumentarono i problemi igienici causati dal diffuso inquinamento derivato dagli scarichi fognari a cielo aperto (Gerometta and Crestani, 2012b).

Fu solamente nel 1976 che venne redatto ed approvato il piano Mascellani-Pretner, il quale costituisce la base dell'attuale assetto infrastrutturale della parte Centro-Nord della città. Per quanto riguarda la parte Sud di Padova, il piano di assetto fognario è invece ancora più recente e risale al 1985 (Caravello, 1997).

Ad oggi la rete fognaria di Padova si compone dunque di più progettazioni sviluppate indipendentemente nel corso del '900 (Fig. 15). Come discusso, la zona del Centro storico fu la prima ad essere servita da un sistema di fognatura pubblica, sul progetto generale del Marzolo del 1938. Tale progetto ha visto la realizzazione di una rete con *canalizzazione separata* all'interno delle mura cinquecentesche e nell'area compresa tra via Crescini e via Canestrini che ha come asse longitudinale via Facciolati. L'allontanamento del refluo prevedeva il recapito gravimetrico presso il sito dell'odierno depuratore di Ca' Nordio. Si vedrà come in base al suo funzionamento attuale sia più opportuno definire la rete fognaria di tipologia *mista*, piuttosto che separata.

Nel 1996 è stata collegata alla rete del centro storico anche la zona Quattro Martiri, esclusa dalla progettazione originale degli anni '70. I quartieri che ad oggi sono allacciati alla rete del centro storico sono: Centro Storico propriamente detto, Crescini (S. Osvaldo), Forcellini e Terranegra (Bonollo Srl, 2006).

Il progetto per la rete fognaria della Zona Industriale (ZIP) di Padova risale invece al 1975, ad opera degli Ingg. Luciano Mascellani e Mario Iannelli e ha visto la progettazione di una rete *separata*, comprensiva anche dei nuclei abitati di Noventa Padovana, Camin e Saonara. Ad oggi la rete della ZIP, grazie all'impianto di sollevamento di Corso Stati Uniti, conferisce il refluo direttamente a Ca' Nordio, ma vedremo come, anche in questo caso, non vi sia di fatto in uso una canalizzazione realmente dedicata alle acque nere, quanto piuttosto di tipo misto.

La zona a nord del Canale Scaricatore, che comprende tutto il territorio urbano ad esclusione della Zona Centro Storico, venne annessa al sistema fognario verso la fine degli anni '70. Il progetto originale venne presentato nel 1976 dai già citati Ingg. Mascellani e Pretner e prevedeva la costruzione di una *rete mista*, con significativo utilizzo di parte dei canali consortili, per i quartieri Forcellini, Terranegra, Arcella e San Carlo. Il recapito, anche in questo caso, è al depuratore di Ca' Nordio. Nel 2004 sono state definitivamente integrate alla rete anche le zone di Montà, Brusegana e Sacra Famiglia.

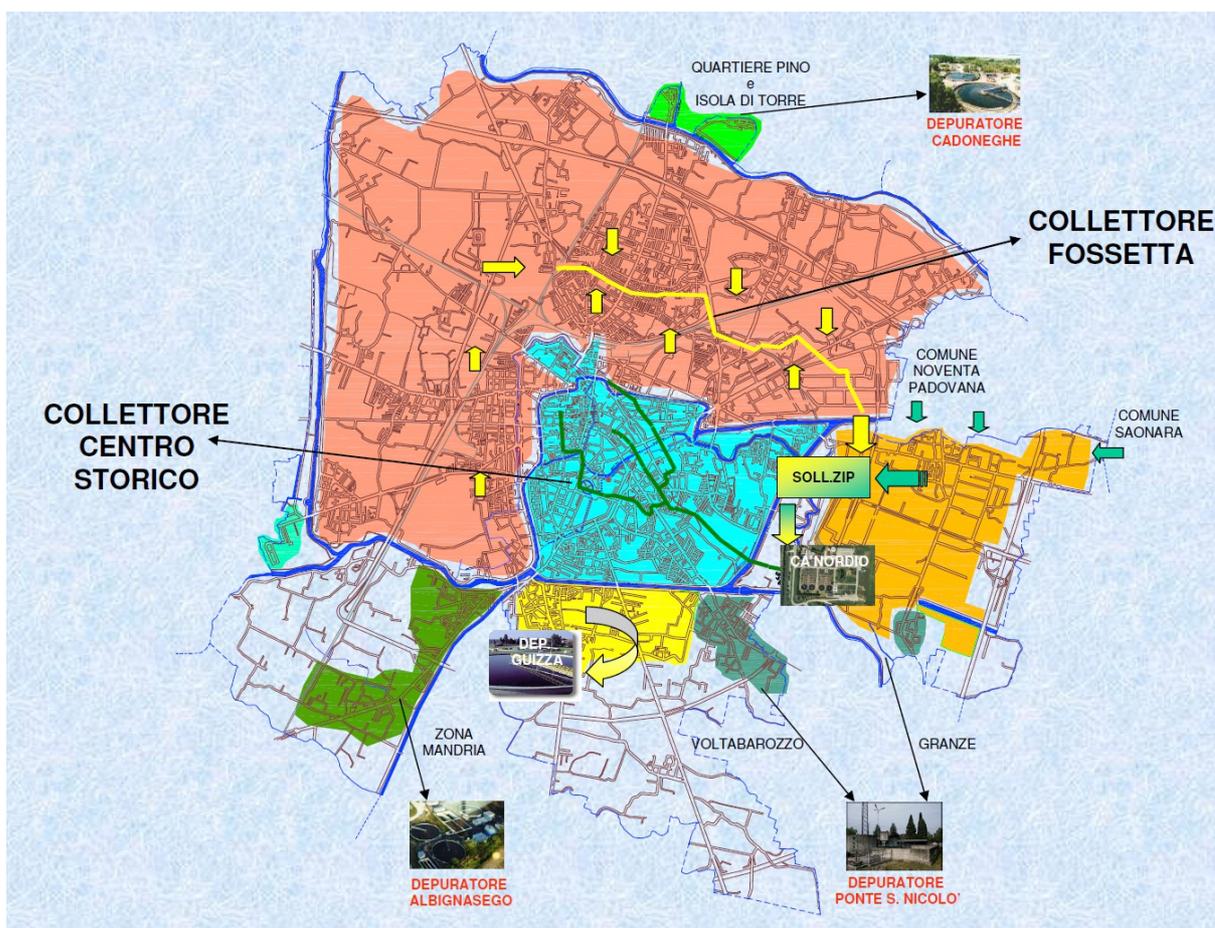


Fig. 15: La figura illustra schematicamente la suddivisione del territorio urbano di Padova secondo quanto esposto nei precedenti paragrafi. L'area evidenziata in azzurro corrisponde al Centro Storico ed è la prima ad essere stata dotata di una rete fognaria vera e propria. Il collettore principale di tale area, segnato con una linea verde, conferisce il refluo presso Ca' Nordio mediante un ingresso dedicato. L'area rossa è quella della zona denominata a nord del canale scaricatore, che di fatto serve anche tutti i quartieri della zona ovest. Il collettore unico di quest'area, segnato in giallo, è il Fossetta, che in origine altro non era che uno scolo consortile parzialmente tombinato. Anch'esso convoglia le proprie acque miste a Ca' Nordio, congiungendosi però, poco più a monte del depuratore, con la rete proveniente dalla ZIP. La zona della ZIP in figura è evidenziata in arancio. Si noti come nella sua rete fognaria vengano adottati anche i reflui di alcuni comuni limitrofi (Saonara, Noventa Padovana, Camin). La ZIP si riunisce con il Fossetta all'altezza di C.so Stati Uniti, presso un impianto di sollevamento che inoltra poi il refluo a Ca' Nordio, sito poco più a sud. La zona a sud dello Scaricatore (Mandria, Guizza e Voltabarozzo), non conferisce il refluo presso Ca' Nordio, ma si avvale dei depuratori minori di Albignasego, Guizza e Ponte San Nicolo'.

Come già accennato, la zona a sud del Canale Scaricatore (Voltabrusegana, Mandria, Guizza) è rimasta sprovvista di un sistema fognario fino al 1985. La situazione attuale vede la

presenza di una *rete separata*, con l'utilizzo non di Ca' Nordio come impianto di conferimento, ma del depuratore comunale Guizza, che viene eventualmente coadiuvato dai depuratori dei due Comuni contermini di Albignasego e Ponte San Nicolò (Bonollo Srl, 2006). A questo punto si rende opportuno esplicitare una considerazione circa il livello di efficienza strutturale della rete fognaria esistente. Essa, costruita in buona parte negli anni '50 e '60 con il largo impiego di materiali scadenti e un dimensionamento delle canalizzazioni oggi non più rispondente ai mutati consumi idrici, accusa un grave problema funzionale.

L'elemento critico riguarda principalmente la commistione, a volte obbligata, tra le acque nere, quelle meteoriche e quelle irrigue, queste ultime provenienti dalle immissioni dei canali consortili. Si sono rilevate infatti alcune derivazioni attive del Canale Brentella e del Bacchiglione che vengono immesse negli scoli consortili di deflusso/irrigazione. Questi ultimi, una volta entrati nel tessuto urbano, confluiscono o vengono utilizzati come collettori fognari. Tali collettori sono generalmente dotati nella loro sezione terminale di un impianto di modulazione per l'invio al depuratore delle sole acque nere in tempo asciutto, e per l'invio delle acque miste sino ad un prefissato grado di diluizione in caso di pioggia.

Corso d'acqua	portata (l/s)	Rogge o scoli	Rete fognaria	Depuratore accettore
Canale Brentella (Ponterotto)	600	Governo, Montà, Due Palazzi, Basse, Limenella, Fossetta	Montà, Due Palazzi, Porta Trento, Arcella	Ca' Nordio
Canale Brentella (Sette Martiri)	300	Pelosa, San Benedetto, Manicomio, Cimitero Maggiore	Brusegana, Chiesanuova	Ca' Nordio
Fiume Bacchiglione (Brusegana)	300	Brusegana, Fossa Bastioni	Brusegana, Chiesanuova, Sacra Famiglia	Ca' Nordio
Fiume Bacchiglione (Basso Isonzo)	250	Boschette, Fossa Bastioni	Sacra Famiglia	Ca' Nordio
Canale Scaricatore (Guasti)	300	Guasti, Bembo, Amolari	Guizza, Salboro	Guizza

Tab. 3: Portate irrigue derivanti dai corsi d'acqua della rete idrografica di Padova che interessano la rete fognaria (adattata da: Bonollo et al., 2006).

A causa delle suddette immissioni irrigue, però, risulta che, anche in condizione di tempo asciutto, non è possibile selezionare le sole acque nere: le acque dei collettori risultano sempre diluite in una certa misura dalle acque dei canali consortili, con risvolti che fanno ad inficiare parzialmente gli stessi processi di depurazione. La tabella inserita poco oltre riporta le portate relative all'immissione di acque irrigue nel sistema fognario di Padova ed è rappresentativa del quadro generale di tale situazione (Tab. 3). In realtà anche le zone inizialmente destinate alla canalizzazione separata di acque nere ed acque bianche soffrono di una significativa

condizione di promiscuità, come conseguenza di un incompleto livello di attuazione delle infrastrutture, che ha indotto a utilizzare provvisoriamente le vecchie condotte di rete bianca come collettori di rete mista. Ciò si verifica ad esempio nel Centro Storico e nella ZIP, che teoricamente dovrebbero essere zone dotate di un'apposita rete per il condottamento delle acque nere, ma che a conti fatti si trova a raccogliere anche quelle provenienti dai cosiddetti manufatti deviatori degli scolii. Ne consegue che, anche in caso di precipitazioni meteoriche non eccezionali, si riscontra un notevole afflusso di acque bianche nelle condotte di rete nera, molte delle quali non erano state progettate per questo fine e quindi sono sovente soggette a sovrappressioni e malfunzionamenti simili a quelli delle reti miste.

3.6.1 *Il depuratore di Ca' Nordio*

L'impianto di depurazione di Ca' Nordio, ovvero il depuratore principale che serve l'area urbana di Padova, si compone di tre linee per la depurazione dei reflui ed ha una potenzialità 147 000 *abitanti equivalenti* (AE). L'AE è l'unità di misura usata per esprimere la potenzialità di trattamento degli impianti di depurazione ed è espressa come il carico totale delle sostanze organiche biodegradabili prodotte in 24h da un certo numero di persone, ma anche da attività industriali, in rapporto al carico totale prodotto da una sola persona nello stesso arco di tempo. Per praticità, il D. Lgs. 152/2006, art. 74 – comma 1, pone una singola unità pari a 60 g al giorno, per la richiesta biochimica di ossigeno a 5 giorni (BOD₅).

Ca' Nordio è un impianto basato su un sistema di ossidazione biologica a fanghi attivi dei liquami, con trattamento terziario denitrificante e attinizzazione (irraggiamento con raggi UV-C) finale del refluo. Nel trattamento biologico a fanghi attivi si realizza nelle vasche un sistema aerobico controllato mediante l'aerazione dei liquami. Per *fanghi attivi* si intende nello specifico una sospensione in acqua di biomassa attiva composta da batteri saprofiti, alghe, protozoi, amebe, rotiferi ed altri microrganismi. Il sistema riproduce artificialmente gli stessi meccanismi biologici che avvengono in natura e che vanno ad abbattere gli inquinanti e le sostanze organiche biodegradabili presenti nelle acque di scarico. In altre parole, si ricrea lo stesso processo di autodepurazione che avviene in natura, ma con velocità delle reazioni accelerata e in uno spazio minore. Il vantaggio del trattamento a fanghi attivi rispetto alla depurazione naturale è che la flora microbica utilizzata per trattare i reflui, non rimane dispersa nell'effluente trattato, ma tende ad agglomerarsi formando dei fiocchi che tendono a sedimentare e possono quindi essere separati con facilità dai liquami chiarificati.

Ca' Nordio è inoltre dotato di una linea per il trattamento dei fanghi derivanti dai reflui civili, che consente la stabilizzazione degli stessi tramite digestione anaerobica mesofila e successiva disidratazione mediante centrifugazione con decanter. Tale trattamento permette il riutilizzo dei fanghi come ammendanti per lo spandimento agricolo. Lo scarico dell'impianto recapita nel Canale Roncajette il refluo depurato. Nel depuratore di Ca' Nordio vengono trattati anche i bottini raccolti dalle fosse settiche installate nelle nuove lottizzazioni, in attesa di una futura estensione della rete. La zona a Sud dello Scaricatore è invece servita da un depuratore locale, il *depuratore Guizza*, della capacità di 13 000 AE di tipo biologico a fanghi

attivi, con recapito finale nello Scolo Amolari. Sono previsti per il prossimo futuro degli interventi sia di bonifica che di miglioramento e potenziamento delle reti. Di particolare rilievo il progetto per la realizzazione di una nuova linea di trattamento, oltre alle tre già esistenti, per il depuratore di Ca' Nordio, che ne porterà la potenzialità complessiva a 200 000 AE (Gerometta and Crestani, 2012b).

3.7 Il corpo idrico recettore: il fiume Bacchiglione

Il Bacchiglione rappresenta uno dei sistemi idrografici di maggiore rilevanza per le province di Vicenza e Padova (Fig. 16). Con i suoi 119 km di lunghezza, esso si colloca al 29 posto nella classifica dei maggiori corsi d'acqua italiani. Il bacino di raccolta del fiume Bacchiglione si estende per circa 1400 km² sul territorio montuoso compreso tra il Brenta ed il sistema Agno-Guà-Frassine (Mazzetti and Suman, 1994). Nello specifico, il Bacchiglione si origina grazie al contributo congiunto di due sistemi idrografici distinti e di diversa natura. Il primo è costituito dal sistema delle risorgive di Dueville (VI), le quali, zampillando e confluendo in numerosi rivi e rogge, danno origine al corso d'acqua Bacchiglioncello. Quest'ultimo, nei pressi di Vivaro (VI), riceve poi le acque dei torrenti prealpini Igna e Leogra-Timonchio che ne vanno ad aumentare in modo cospicuo la portata e cambia definitivamente il proprio nome in Bacchiglione. L'incontro dei due diversi sistemi idrografici comporta un regime idrologico misto per il Bacchiglione, caratterizzato da rapide transizioni di portata. I periodi di massima portata del fiume sono quelli primaverili ed autunnali, mentre i valori minimi si registrano nei mesi di Dicembre e Agosto (Grandis, 1983).

Il corso del Bacchiglione si indirizza verso Vicenza, snodando il proprio alveo, qui ancora basso e con fondo ghiaioso, tra i paesi di Caldogno, Cresole e Polegge. Il fiume entra nella città di Vicenza presso Porta S.ta Croce; all'altezza di Ponte Pusterla e Borgo Berga riceve poi rispettivamente l'Astichello ed il Retrone. Uscito da Vicenza, il Bacchiglione si dirige verso Padova seguendo una traiettoria sud-est. La confluenza con il Tesina presso la località Longare va ad aumentare nuovamente la portata del fiume, mentre la diramazione del canale Bisatto presso Col de Ruga ne sottrae una parte minore, convogliandola verso Este e Monselice. Da qui in poi il Bacchiglione segue un andamento meandriforme tra campi intensamente coltivati. In questa zona, gli argini erbosi corrono ad una distanza di circa 200 m dall'alveo di magra e la golena viene coltivata a cereali, prato o a pioppeto (Mazzetti and Suman, 1994; Provincia di Padova, 2006).

Il Bacchiglione entra nella provincia di Padova nel Comune di Cervarese Santa Croce. All'altezza di Trambacche esso riceve le acque del Ceresone (o Tesina Padovano), per poi bagnare Saccolongo e Selvazzano Dentro. Il fiume raggiunge in seguito Padova: la città è caratterizzata da un'intricata rete di canali artificiali che rappresenta uno dei più complessi sistemi idrografici urbani di tutta Italia (Fig. 17). In primo luogo, un articolato snodo regolativo consente la comunicazione tra le acque del Bacchiglione e quelle del Brenta. Presso Brusegana il Bacchiglione vede confluire il canale artificiale Brentella, foriero delle acque del Brenta.



Fig. 16: Schema semplificato del corso fluviale del fiume Bacchiglione (azzurro) e dell'estesa rete di canali e deviazioni artificiali che caratterizza l'area del bacino scolante in laguna.

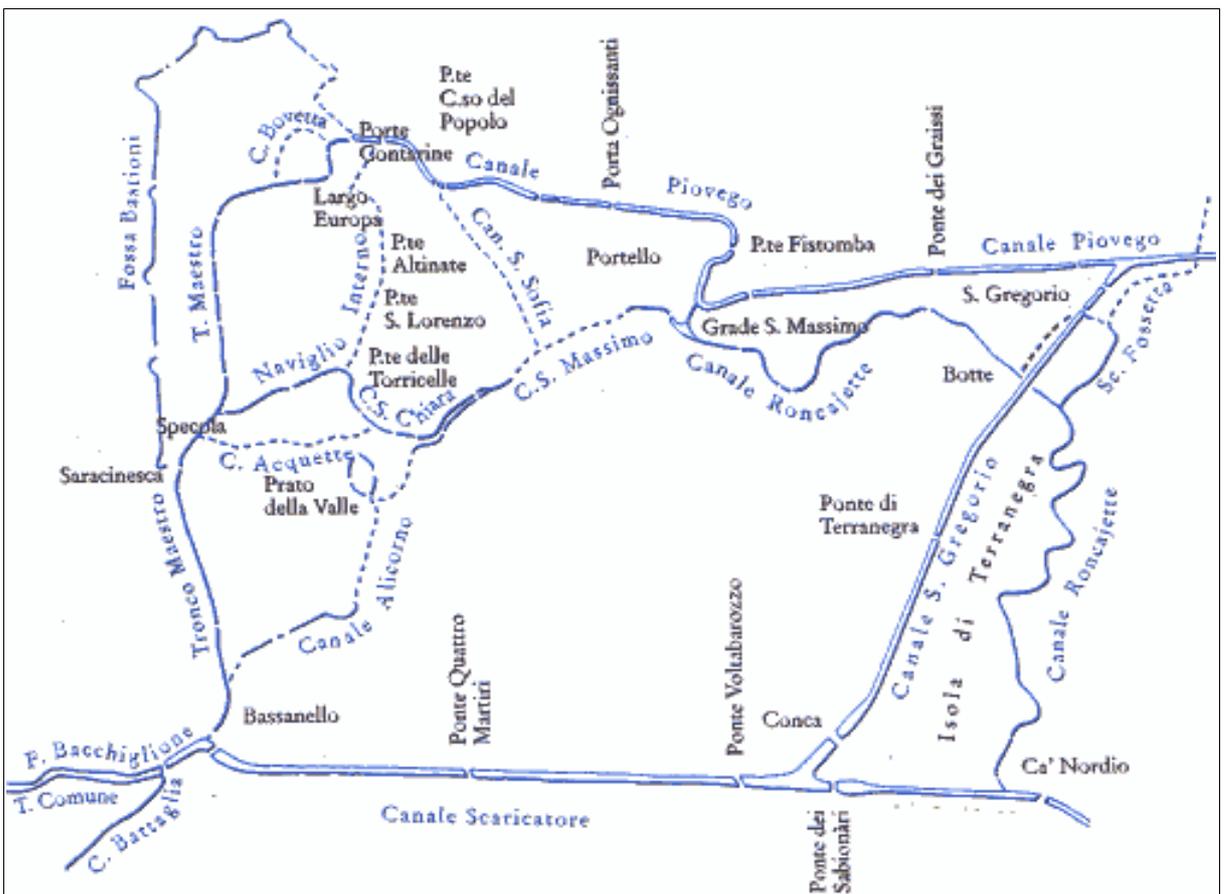


Fig. 17: La complessa rete idrografica di Padova si compone di un intricato sistema di navigli e canali interni.

Il Brentella si diparte dai Colmelloni di Limena, manufatto idraulico del XIV secolo costruito per fronteggiare le carenze idriche della città patavina, e si snoda per circa 11 km in direzione sud. Giunto alla zona del Bassanello, il Bacchiglione si divide poi in tre rami: il canale Battaglia che si dirige immediatamente verso sud, il Tronco Maestro che entra in città, e il canale Scaricatore, che convoglia la maggior portata nel Roncajette. Il canale Battaglia, scavato tra il 1189 ed il 1201, ha il suo incile presso Ponte Isonzo e connette Padova con Monselice (Mazzetti and Suman, 1994; Provincia di Padova, 2006).

Il Tronco Maestro originariamente alimentava un pittoresco reticolo di canali e navigli che si andava a snodare nel centro storico patavino. Tali canali vennero in parte interrati nel '900, sia per questioni igieniche che di adeguamento della viabilità stradale. Rimane ancora visibile il tratto principale del Tronco Maestro, che dal Bassanello si dirige verso nord, nella Fossa Bastioni, lungo il perimetro occidentale della cinta muraria rinascimentale. Esso raggiunge in seguito la Specola e ivi gira per Riviera Paleocapa, fino a raggiungere Ponte Molino. Presso le Porte Contarine inizia poi il Piovego, scavato nel 1209 come idrovia per la laguna veneta, e un tempo connesso al Naviglio Interno grazie alle paratie delle stesse Porte. Il circuito idrografico principale si chiude con il Canale San Gregorio, scavato sul lato est di Padova verso la fine degli anni '30, che connette nuovamente il Piovego allo Scaricatore (Fig.2).

Il canale Scaricatore, terminato nel 1836, scorre dal Ponte dei Cavai fino allo sbarramento del Ponte dei Sabbionari. Presso tale Ponte, esso si allarga in un bacino chiuso, o Conca, nel quale confluisce anche il Canale San Gregorio, che chiude il circuito Brenta-Bacchiglione iniziato col Brentella. L'acqua dello Scaricatore oltrepassa le paratoie del Ponte dei Sabbionari con un salto di 5 m e, prendendo il nome di Roncajette, incontra lo scarico del depuratore di Ca' Nordio nonché, poco dopo, l'arrivo dello scolo Fossetta (cfr. 2.1.2). Il tratto del fiume a sud di Padova è stato teatro di numerose rettificazioni ottocentesche che ne hanno modificato il tracciato naturale.

Dopo Ponte San Nicolò il Bacchiglione-Roncajette devia verso mezzogiorno e prosegue il suo cammino per 15 km, in linea pressoché retta, fino al paese di Bovolenta. Nei pressi di Ponte San Nicolò il corso d'acqua è largo circa 30 metri: entrambi gli argini sono percorsi da strette vie carrozzabili e sono orlati da un folto bosco ripario che si compone di salice bianco, salice da ceste, pioppo nero, robinia, ontano, acero americano, platano ibrido ed altre specie arbustive, sia autoctone che alloctone (Provincia di Padova, 2006). La sommità degli argini offre un'ottima visuale sul panorama agricolo circostante, che si presenta nel complesso alquanto monotono e poco abitato, con caratteri derivanti dalle sistemazioni agrarie del passato.

A Bovolenta, presso la cosiddetta Pontara, si incontra la confluenza nel Bacchiglione-Roncajette del Canale Cagnola, che ha origine a Battaglia Terme. In questo punto il corso del Bacchiglione, qui anche chiamato Canale Pontelongo o Bacchiglione Vecchio, devia nettamente e si dirige verso est sud-est. Da Bovolenta a valle il corso fluviale si presenta rettilineo e attraversa il paesaggio agricolo della bassa padovana, caratterizzato da poche siepi alberate e numerosi campi coltivati a orzo, barbabietola, mais, grano e sporadici vigneti. Il

Bacchiglione bagna Pontelongo, Ca' Bianca e prosegue parallelo al taglio artificiale del Brenta, che fluisce qualche centinaio di metri più a nord. Giunto all'altezza di Ca' Pasqua, il Bacchiglione riversa le proprie acque nel Brenta, in un paesaggio palustre tipico dell'ambiente salmastro. Verso Brondolo si incontra la confluenza con il Canale Gorzone ed il Canale di Valle, che mette in comunicazione l'Adige con la laguna. L'ultimo tratto, segnato da folti canneti e alberate di salici e pioppi, raggiunge il litorale a sud di Sottomarina, dove le acque del Brenta-Bacchiglione sfociano congiunte nell'Adriatico.

4. Il monitoraggio della filiera idrica integrata: i siti di campionamento

Per valutare la presenza e le interconnesse dinamiche di contaminazione e persistenza di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. lungo la filiera idrica integrata di Padova, si sono selezionati dei siti di campionamento strategici che ne consentono il monitoraggio, successivamente ad un'accurata analisi delle infrastrutture e dei flussi idrici. Nel suo complesso la rete di monitoraggio si compone di 28 siti: 10 siti sono costituiti da pozzi artesiani di attingimento dislocati nel territorio comunale di Dueville; 5 sono relativi alla sotto-filiera di approvvigionamento dell'acqua potabile; 6 appartengono al sistema fognario; 5 vanno ad estendere l'indagine a livello del corpo idrico accettore, il fiume Bacchiglione, ed infine 2 siti sono stati posti presso l'area marino-costiera a ridosso della foce fluviale, dichiarata balneabile. Il monitoraggio di tali siti è stato possibile grazie ad una collaborazione con il Comune di Dueville e la società AcegasAps, che hanno autorizzato l'accesso periodico alle proprie strutture ed impianti per i fini della presente ricerca. L'attività di monitoraggio è stata condotta tra il mese di Luglio 2011 ed il mese di Agosto 2013: i campionamenti presso i siti selezionati sono stati effettuati con cadenza pressoché mensile, vincolatamente alla disponibilità del personale responsabile.

Si fornisce in seguito la descrizione di ciascun sito campionato, approfondendone le caratteristiche infrastrutturali ed il significato strategico quale componente della rete di monitoraggio della filiera idrica integrata.

4.1 Acquifero dell'Alto Vicentino

Partendo a monte della filiera idrica, si è effettuata un'indagine preliminare per valutare la qualità microbiologica della falda dell'Alto Vicentino, a cui attinge l'acquedotto di Padova. A tale scopo si sono selezionati alcuni pozzi nel territorio comunale di Dueville (VI), adiacente alle risorgive dell'Oasi di Villaverla (cfr. 3.1). Nei mesi di Maggio, Giugno e Luglio 2011 si sono eseguiti 3 cicli di campionamento su un totale di 10 pozzi che prelevano a tre distinte fasce di profondità: superficiale <20 m; intermedia 20<60 m e profonda >60 m (Tab. 4; Fig. 18). Tali pozzi, pur non essendo gli stessi che garantiscono l'approvvigionamento dell'acquedotto padovano, attingono però dallo stesso acquifero sotterraneo e sono significativi sia per la determinazione del profilo qualitativo medio delle acque telluriche captate nella zona delle risorgive, che per evidenziare le eventuali dinamiche di contaminazione delle acque di falda.

Diversi articoli riportano infatti casi di giardiasi o criptosporidiosi contratte per assunzione di acqua di pozzo contaminata (Bridgman et al., 1995; Dworkin et al., 1996; Solo-Gabriele and Neumeister, 1996; Furtado et al., 1998; Barwick et al., 2000; Lee et al., 2002; Liang et al., 2006; Yoder et al., 2008; Persson et al., 2007; Craun, 2006; Craun et al., 2010), anche se in tali lavori non viene specificata la natura del pozzo, ovvero se esso è di tipo freatico, artesiano, golenale o quant'altro.

ID	Tipologia edificio servito	Ubicazione	Profondità pozzo (m)	Fascia di attingimento
1	Scuola elementare 1	Via del Bersagliere	32	I
2	Area verde	Via I Maggio	50	I
3	Villino	Via Roma	13	S
4	Scuola media	Via Rossi	40	I
5	Scuola elementare 2	Via Adige	50	I
6	Impianti sportivi 1	Viale dello Sport	90	P
7	Impianti sportivi 2	Via Malaparte	100	P
8	Villino	Via Molinetto	15	S
9	Scuola materna	Via Redentore	70	P
10	Impianti sportivi 3	Via S.Pio X	37	I

Tab. 4: In tabella si riportano i dati che descrivono i 10 pozzi campionati nel territorio comunale di Dueville. Per ciascuno si indica la tipologia di edificio servito, la posizione toponomastica, la profondità e la relativa fascia batimetrica di appartenenza (S = superficiale; I = intermedia; P = profonda).

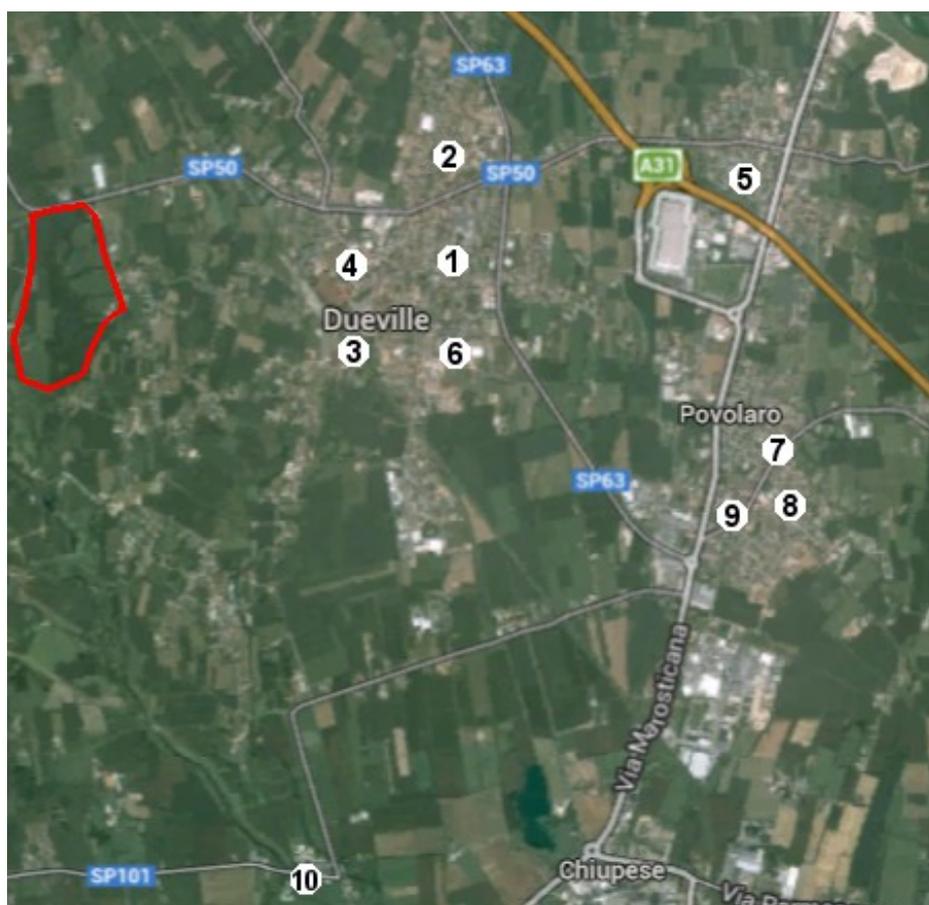


Fig. 18: Mappa dei 10 pozzi di attingimento campionati nel territorio comunale di Dueville (VI). In rosso l'area che corrisponde all'Oasi di Villaverla, all'interno della quale si trovano i pozzi di captazione dell'acquedotto padovano.

Per quanto riguarda la vulnerabilità microbiologica degli acquiferi profondi, essa è infatti maggiore negli strati superficiali di terreno, vale a dire durante l'ultimo tratto di risalita dell'acqua, in quanto aumenta la probabilità che si verifichino episodi di contaminazione legati al percolamento nel terreno di eventuali microrganismi contaminanti. Se, come verrà esposto, i pozzi di captazione dell'acquedotto di Villaverla si trovano in un'area protetta e zampillano all'interno di un'apposita galleria di presa, i pozzi di Dueville, presi in analisi durante l'indagine preliminare del 2011, si trovano per contro in un contesto che vede un utilizzo del suolo misto, dal residenziale al verde urbano, talvolta privo di particolari strutture protettive. Il Comune di Dueville non è per altro servito da alcun acquedotto pubblico, dal momento che la peculiare ricchezza idrica del sottosuolo consente lo scavo di numerosi pozzi di attingimento, sia pubblici che privati, che provvedono al fabbisogno idrico dell'area. Da qui l'importanza di un'attenta valutazione della qualità dell'acqua attinta dai singoli pozzi.

4.2 Filiera di approvvigionamento dell'acqua potabile

Per quanto riguarda il monitoraggio del sistema di approvvigionamento dell'acqua potabile, che ha il suo sito di captazione presso l'Oasi di Villaverla e adduce l'acqua all'area urbana di Padova mediante tre condotte sotterranee, sono stati selezionati 5 siti (Tab. 5; Fig. 19).

Nell'insieme essi consentono di monitorare la qualità dell'acqua all'origine, ovvero a livello del sito di captazione, lungo la chilometrica linea di adduzione sotterranea ed infine presso l'impianto cittadino di distribuzione, il Centro Idrico Brentelle. In aggiunta viene monitorato anche lo stesso Canale Brentella, il quale, come verrà illustrato poco oltre, funge da sito di captazione addizionale (acqua superficiale) nell'eventualità di un'emergenza idrica.

ID	Sito	Funzione	Luogo
1	Sala Sorgenti	punto di captazione dell'acquedotto	Villaverla
2	Partitore	accesso intermedio alla Canaletta	Vicenza
3	Canaletta a pelo libero	termine della condotta di adduzione	CIB
4	Nodo pre-distribuzione	acqua mista* di rete	CIB
5	Canale Brentella	punto di captazione accessorio	CIB

Tab. 5: I siti che consentono il monitoraggio dell'approvvigionamento idrico di Padova.

* Con il termine *mista* si intende una miscela dell'acqua addotta dalle tre linee che compongono l'acquedotto.



Fig. 20: La Sala Sorgenti di Villaverla. Nelle due vasche laterali viene raccolta l'acqua che, zampillando dai numerosi pozzi, riempiono la galleria di presa, visibile in secondo piano. A Villaverla 52 pozzi, i più antichi e anche superficiali (profondità tra gli 8 ed i 25 m), zampillano spontaneamente nella galleria di presa, mentre altri 80, di scavo più recente e più profondi sono collocati nei terreni vicini. Anche i pozzi profondi vengono fatti convogliare all'interno della galleria di presa, che conduce l'acqua in due vasche di raccolta dalle quali essa passa, infine, alla canaletta adduttrice.

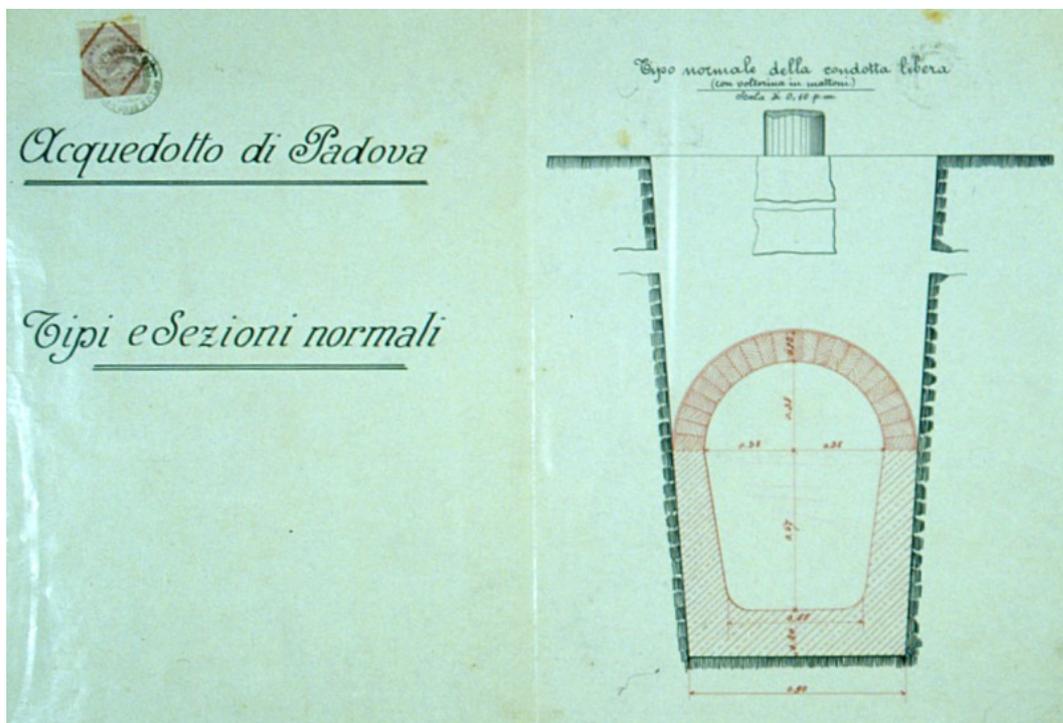


Fig. 21: Rappresentazione grafica della sezione della prima condotta adduttrice, costruita nel 1890, denominata Canaletta a pelo libero.

4.2.1 *Sala Sorgenti*

La *Sala Sorgenti* (Fig. 20) si trova all'interno del perimetro dell'Oasi di Villaverla e più precisamente in un edificio in muratura che ospita la galleria di presa dei pozzi che alimentano l'acquedotto padovano. Nella galleria di presa si raccolgono le acque del fontanile che riunisce i pozzi di attingimento. Le acque si accumulano temporaneamente in due grandi vasche, una che raccoglie le acque dei pozzi profondi e l'altra quelle dei pozzi più superficiali, dalle quali si diparte poi la vecchia linea di adduzione ottocentesca, la Canaletta a pelo libero (Fig. 21). Il campionamento viene eseguito a valle delle due vasche, in modo da disporre di una miscela dell'acqua proveniente sia dai pozzi profondi che da quelli superficiali, e subito a monte dell'inizio della Canaletta. Da questo punto di campionamento, fino al Partitore di Vicenza, l'acqua scorre nella canaletta sotterranea senza soluzione di continuità.

4.2.2 *Partitore*

Il Partitore (Fig. 22) è un piccolo edificio sito nella zona a SE di Vicenza, in prossimità della ferrovia Vicenza-Schio. Esso costituisce l'unico punto di accesso intermedio tra Villaverla e Padova alla Canaletta adduttrice. Il Partitore venne costruito contestualmente alla linea di adduzione originale per ripartire la portata della Canaletta tra le città di Padova e Vicenza. Come già esposto nel capitolo precedente (cfr. 3.4), l'intento iniziale della Società Veneta, costruttrice dell'acquedotto, era quello di vendere l'acqua delle risorgive sia alla città patavina che a quella berica. Ad oggi il Partitore serve in maniera esclusiva l'acquedotto di Padova e costituisce un comodo punto di prelievo intermedio, lungo i 42 km di tragitto sotterraneo compiuti dalla storica Canaletta. A differenza dell'acqua campionata presso il sito precedente, la Sala Sorgenti, quella del Partitore differisce in quanto ha subito un trattamento di pre-clorazione presso la centrale di Saviabona, posta qualche chilometro più a nord del sito.

4.2.3 *Canaletta a pelo libero*

Il terzo sito monitorato coincide con il punto di arrivo della Canaletta a pelo libero in territorio padovano (Fig. 23). Il punto preciso si colloca presso il CIB. Si ricorda che l'acqua scorre per gravimetria da Villaverla fino all'uscita della canaletta, ad una velocità di circa 1 m/s: il tempo di percorrenza dell'intero tragitto è di circa 10 ore. Il campionamento viene effettuato a monte della post-clorazione che viene operata presso il Centro Idrico Brentelle prima dell'immissione in rete. Il monitoraggio presso questo sito consente di evidenziare i potenziali eventi di contaminazione intercorsi nel tratto sotterraneo tra Vicenza e Padova. Tra le tre linee sotterranee di adduzione, la Canaletta è la più esposta al rischio di contaminazione in quanto è l'unica a non essere in pressione. Eventuali crepe o microfratture strutturali potrebbero pertanto essere causa di infiltrazioni esterne, con conseguente alterazione della qualità dell'acqua addotta.



Fig. 22: L'interno del Partitore di Vicenza. La vasca che si intravede ripartisce l'acqua della Canaletta tra Padova ed uno scarico laterale, che in origine avrebbe dovuto consentire anche l'approvvigionamento idrico della città berica.



Fig. 23: La Canaletta a pelo libero, costruita nel 1890, è ancora oggi in funzione e adduce per gravimetria l'acqua dai pozzi di Villaverla fino al Centro Idrico Brentelle, nella periferia ovest di Padova.



Fig. 24: L'ultimo sito di campionamento accessibile prima dell'immissione dell'acqua nella rete di distribuzione cittadina vera e propria. In figura è visibile il rubinetto da cui si effettua il prelievo: si tratta dello stesso snodo utilizzato anche per controlli sanitari.



Fig. 25: Il Canale Brentella. Nel perimetro del CIB si trova un impianto ausiliario per la captazione idrica dell'acqua superficiale del canale. Nella foto la piattaforma idrovora e la condotta dei pozzi golenali.

4.2.4 *Nodo pre-distribuzione*

Sito ubicato sempre all'interno del CIB (Fig. 24), si trova a valle dell'impianto di post-clorazione e del serbatoio di miscelazione dell'acqua della Canaletta a pelo libero con quella che proviene dalle altre due linee adduttrici, ovvero la condotta in cemento da 900 mm e quella in acciaio da 1 300 mm. Come già esposto, l'attenzione si è focalizzata sul percorso della Canaletta piuttosto che su quello delle altre due linee di adduzione in quanto essa è la più esposta al rischio di contaminazione. Essa, infatti, oltre che ad essere molto più vecchia, a differenza delle altre due trasporta l'acqua per semplice gravimetria e non in pressione: eventuali crepe o microfratture presenti nella sua struttura possono quindi rappresentare dei punti di ingresso per infiltrazioni e/o di contatto con il terreno. Ad ogni modo, l'inserimento del presente punto di campionamento nella rete di monitoraggio consente di controllare anche l'acqua addotta dalle altre linee, in quanto viene qui miscelata prima dell'immissione nella rete cittadina di distribuzione.

Per quanto riguarda il trattamento di clorazione, il dosaggio viene regolato sulla massima concentrazione di cloro residuo in condotta ammissibile per legge, ovvero pari a 0.2 ppm o mg/l. Dati tecnici forniti da AcegasAPS indicano un set-point effettivo di 0.15 ppm.

4.2.5 *Canale Brentella*

Il Brentella (Fig. 25) è un canale artificiale scavato nel XIV secolo che collega i fiumi Brenta e Bacchiglione. Il Brentella venne costruito per garantire l'approvvigionamento idrico di Padova dal momento che le frequenti dispute con la vicina città di Vicenza avevano indotto i berici a deviare più di una volta il corso del Bacchiglione, all'epoca usato come fonte di approvvigionamento idrico, per lasciare la città patavina senza acqua (Zanetti, 2002).

Il Brentella rappresenta l'unico punto di captazione idrico alternativo alle risorgive, anche se vi si ricorre solamente in periodi di grave emergenza idrica. Presso il CIB si trova una batteria di pozzi golenali caricati dalle acque del canale, capace di fornire fino a 200 l/s di acqua. Va precisato che, da quando l'attività di monitoraggio ha avuto inizio, l'impianto di captazione del Brentella non è mai entrato in funzione.

4.3 **Sistema fognario**

Per monitorare la rete fognaria si è scelto un approccio che semplifica la complessità strutturale che caratterizza la fognatura di Padova. Dal momento che risulta impossibile campionare singole fosse settiche o singoli accessi tombinati, si è ritenuto opportuno concentrare l'attenzione sulle infrastrutture maggiori, ovvero collettori zonali e depuratore principale. I collettori costituiscono le condotte fognarie con diametro maggiore e fungono da recettori del refluo, allontanato in un primo momento da dotte minori. Il depuratore principale, sito in località Ca' Nordio, tratta più dell'80% del refluo civile proveniente dall'area urbana di Padova ed è stato dunque ritenuto significativo al punto di poter trascurare i depuratori minori

di Cadoneghe, Guizza e Ponte San Nicolo'. Coerentemente a quanto esposto, si sono dunque selezionati 6 siti per il monitoraggio della rete fognaria (Tab. 6; Fig. 26).

Mentre lo scarico del refluo depurato si avvale di un'uscita comune, le linee in ingresso del depuratore di Ca' Nordio sono separate.

ID	Sito	Funzione	Luogo
1	Intervento 10	collettore fognario	Lungargine Scaricatore
2	Forcellini	collettore fognario	Via Forcellini
3	ZIP	collettore fognario	C.so Stati Uniti
4	Fossetta	collettore fognario / canale consortile	C.so Stati Uniti
5	Ca' Nordio : ingresso	ingresso del depuratore	loc. Ca' Nordio
6	Ca' Nordio : effluente	scarico del depuratore	loc. Ca' Nordio

Tab. 6: I siti relativi al monitoraggio del sistema fognario di Padova.

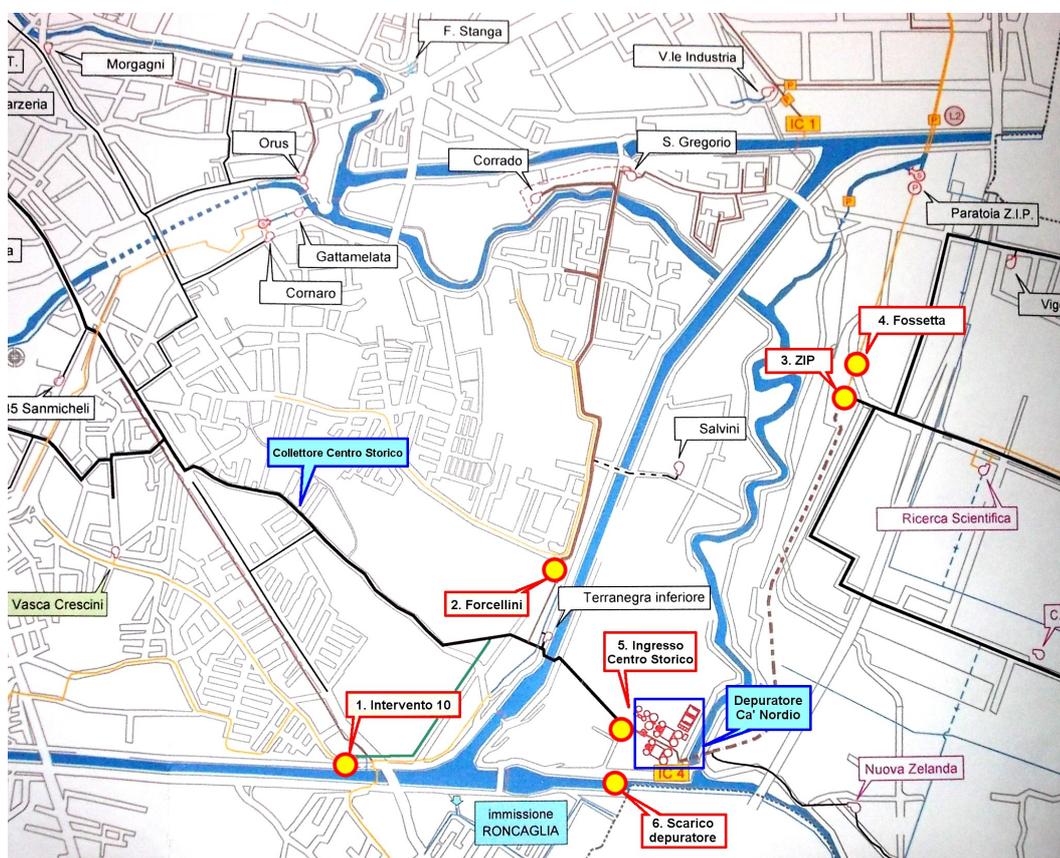


Fig. 26: Dettaglio della zona sud-est di Padova, in cui sono riportati i 5 punti di campionamento rappresentativi del sistema fognario: 1. Collettore Intervento 10; 2. Collettore Forcellini; 3. Collettore Zip; 4. Collettore Fossetta; 5. Ingresso Centro Storico del depuratore di Ca' Nordio; 6. Scarico del depuratore.

Una linea proviene dal Centro Storico, mentre l'altra si compone delle acque miste conferite unitamente dalla rete ZIP e dal collettore Fossetta. L'ingresso costituito dalla linea che proviene dal Centro Storico è agevolmente accessibile presso l'impianto di Ca' Nordio stesso,

mentre per il campionamento dell'altra linea afferente è necessario recarsi presso l'impianto di sollevamento della ZIP. Presso tale sito è altresì possibile effettuare il campionamento separato del refluo della ZIP e del Fossetta. Per quanto riguarda l'ingresso della linea proveniente dal Centro Storico, è stato possibile accedere ad altri due siti, posti a monte dell'arrivo al depuratore, che convogliano i reflui fognari dei quartieri Crescini e Forcellini nel tratto distale del collettore principale che arriva dal Centro Storico propriamente detto. E' stato così possibile analizzare il contributo dei singoli recapiti fognari ad una risoluzione maggiore rispetto a quella che il monitoraggio della sola uscita comune del depuratore avrebbe potuto offrire.

4.3.1 *Collettore Intervento 10*

Per *Intervento 10* si intende il collettore che serve l'area compresa tra via Facciolati e via Crescini, accessibile nei pressi del Ponte di Voltabarozzo (Fig. 27). Esso riceve anche il refluo della zona Quattro Martiri, annessa nel 1996, per poi immettersi, all'altezza di via Canestrini, nel collettore che proviene dal Centro Storico.

4.3.2 *Collettore Forcellini*

Il collettore Forcellini si trova nella parte sud dell'omonima via, all'incrocio con via Gerardo Pietro (Fig. 28). Esso fa confluire i reflui del quartiere, congiuntamente a quelli di S. Osvaldo e Terranegra, nel collettore del Centro Storico. L'immissione avviene poco più a valle della giunzione tra il collettore Intervento 10, della zona Crescini, ed il collettore Centro Storico, che indicativamente avviene in prossimità di via Canestrini.

4.3.3 *Collettore ZIP*

Una vasca scoperta consente di accedere al collettore della ZIP (Fig. 29), permettendo di campionare il refluo proveniente dalla vicina zona industriale e i centri abitati di Noventa Padovana e Saonara. La portata media, in tempo asciutto, è di circa 100 l/s. Da segnalare che il campionamento si è inaspettatamente rivelato alquanto problematico a causa di una spessa crosta di materiale oleoso, di rapida formazione, che va ad occludere l'intera superficie dell'area accessibile, rendendo poco agevole il prelievo del campione da filtrare.

4.3.4 *Collettore Fossetta*

Dopo un lungo tragitto, il collettore Fossetta, che in alcuni tratti mantiene la sua natura originale di scolo tombinato, recapita presso l'impianto di sollevamento della zona industriale le acque miste delle zone nord ed ovest di Padova (Sacra Famiglia, Brusegana, Chiesanuova, Montà, Arcella, San Carlo, Torre, Mortise, Zona Industriale nord) (Fig. 30). Qui il Fossetta va a riunirsi con il collettore ZIP, assieme al quale raggiunge infine il depuratore di Ca' Nordio. In realtà, nei pressi dell'incrocio tra il lungargine Rovetta e Corso Argentina, il Fossetta, dopo

aver superato il Piovego mediante un sifone, subisce una partizione della propria portata complessiva, che è di circa 900 l/s. Di essa, infatti, soltanto 200 l/s proseguono in direzione del sollevamento ZIP e quindi verso Ca' Nordio. Il resto del flusso si immette nel Piovego e seguita alla volta del Brenta. Nel complesso, una volta che il collettore ZIP ed il Fossetta si sono riuniti, conferiscono a Ca' Nordio una portata media di 300 l/s.



Fig. 27: L'accesso tombinato al collettore denominato Intervento 10, nei pressi del Ponte di Voltabarozzo, accessibile dal lungargine del Canale Scaricatore.



Fig. 28: L'area di accesso al collettore Forcellini. Si noti la vite di grigliatura in secondo piano, sulla sinistra dell'immagine.



Fig. 29: La vasca di accesso al collettore della Zona Industriale. Da notare la massa galleggiante, costituita di componenti grasso-oleose, che si accumula con notevole velocità presso questo sito di campionamento. Al momento dello scatto gran parte del tappo lipidico era appena stato rimosso da un'autobotte aspirante.



Fig. 30: Una vasca verticale, analoga a quella del collettore ZIP, consente di campionare il collettore Fossetta. Poco più a valle delle due vasche i due collettori si riuniscono, subiscono un trattamento preliminare di grigliatura e si dipartono verso il depuratore di Ca' Nordio.



Fig. 31: L'ingresso del depuratore di Ca' Nordio, che conferisce i reflui di Centro Storico, Intervento 10 e Collettore Forcellini.



Fig. 32: Lo scarico del depuratore fognario di Ca' Nordio. L'impianto si serve di un uscita comune per il refluo trattato. La piattaforma visibile nella foto si trova subito a valle delle lampade UV-C.

4.3.5 *Depuratore Ca' Nordio: ingresso*

La linea *Centro Storico* costituisce in realtà solamente uno dei due ingressi del depuratore di Ca' Nordio (Fig. 31). Essa di fatto conferisce un refluo di tipo misto, che possiamo considerare costituito prevalentemente da acque nere soltanto dopo una prolungata condizione di tempo asciutto. La portata media della linea è di 350 l/s, ma può raggiungere eccezionalmente gli 850 l/s in caso di piogge intense. Il campione viene prelevato a monte della vite di sollevamento che innalza poi il refluo a livello della griglia posta in testa all'impianto di depurazione. Il refluo, tuttavia, nel punto di prelievo ha già subito una pregrigliatura a livello dei singoli collettori cittadini e risulta pertanto libero da corpi macroscopici. Si ricorda che l'ingresso denominato *Centro Storico* si compone dei reflui provenienti dal Centro Storico propriamente detto (Quartiere 1) e quelli conferiti dall'Intervento 10 e dal Collettore Forcellini.

4.3.6 *Depuratore Ca' Nordio: effluente*

Si è scelto di campionare l'effluente dell'impianto di Ca' Nordio (Fig. 32) presso il punto di immissione del refluo depurato nel canale Roncajette. Il punto di campionamento si trova a valle dell'intero impianto, in coda alla postazione finale di disinfezione con UV-C (mod. Trojan UV 3000 Plus). Le caratteristiche tecniche dell'impianto di attinizzazione vedono la presenza di due set modulari composti in totale da 176 lampade UV, poste parallelamente al flusso dell'acqua in uscita. Ciascuna lampada possiede una potenza complessiva di 250 W, per una potenza germicida totale a $\lambda = 254$ nm di 28 kW. In condizioni standard, ove la concentrazione di solidi sospesi è < 10 mg/l, il limite massimo di disinfezione prevede l'abbattimento di 5 000 UFC/100 ml di *E. coli*. L'acqua prelevata è una miscela del refluo derivante dalle tre linee di depurazione presenti a Ca' Nordio, nelle quali vengono ripartiti, già mescolati, i reflui provenienti dalla linea Centro Storico e dall'impianto di sollevamento della zona industriale.

4.4 **Corpo idrico recettore**

Si è ritenuto opportuno estendere il monitoraggio anche al corpo idrico che va a ricevere l'effluente del depuratore di Ca' Nordio, ovvero il fiume Bacchiglione (cfr. 3.7). Nel complesso si sono selezionati 5 punti di campionamento (Tab. 7; Fig. 33). La criticità rappresentata dalla presenza di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nel fiume, come conseguenza dell'eventuale contributo contaminante dello scarico di Ca' Nordio, è connessa alla presenza di aree balneabili nei pressi della foce dello stesso Bacchiglione (cfr. 4.5), nonché all'eventualità che le sue acque vengano utilizzate a scopo irriguo. In bibliografia si riporta infatti come sussista il rischio di contaminare con (oo)cisti protozoarie le produzioni agricole, qualora si vadano a riutilizzare acque grezze per l'irrigazione delle colture. Il rischio diventa importante nel caso di verdure a foglia larga o comunque di ortaggi da consumare crudi (Chaidez et al., 2006; Amoros et al., 2010; El Said Said, 2012).

ID	Sito	Posizione	Luogo
1	Ponte dei Sabbionari	a monte dello scarico di Ca' Nordio	Padova
2	Lungargine Donati	a valle dello scarico di Ca' Nordio	Ponte San Nicolo' (PD)
3	Ponte di Bovolenta	intermedio tra Padova e la foce	Bovolenta (PD)
4	Ponte di Ca' Bianca	a monte della confluenza con il Brenta	Ca' Bianca (VE)
5	Foce	foce congiunta di Brenta & Bacchiglione	Sottomarina (VE)

Tab. 7: I siti relativi al monitoraggio del Bacchiglione, corpo idrico recettore dell'effluente depurato di Ca' Nordio.

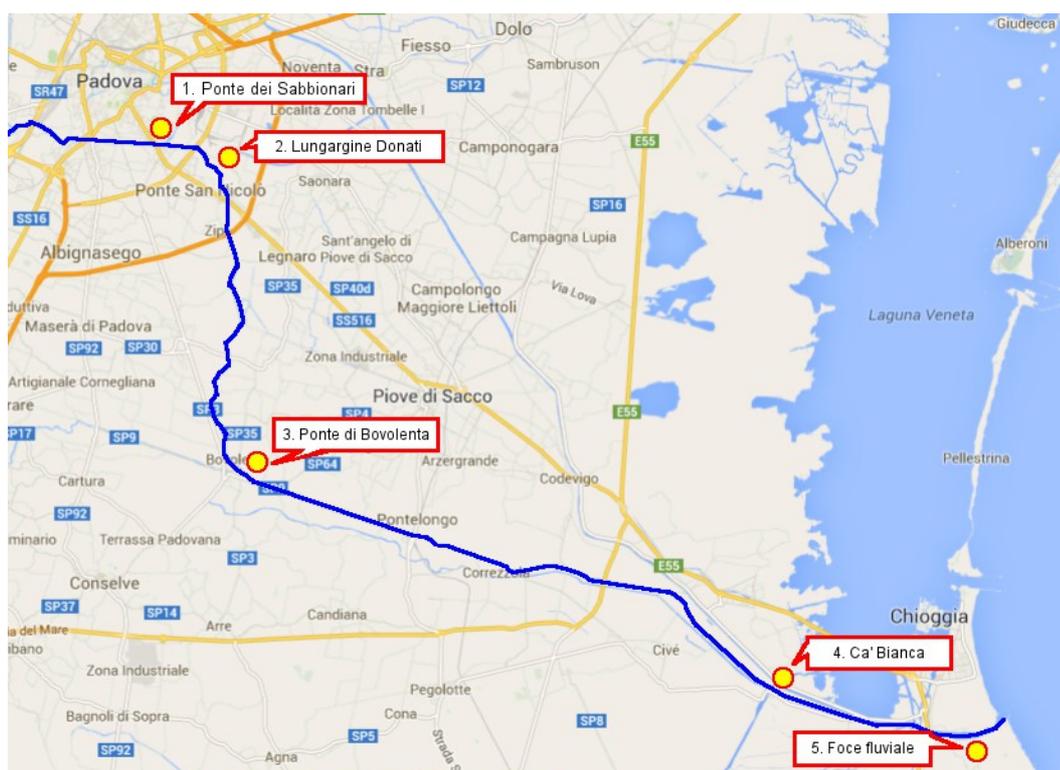


Fig. 33: I 5 siti di monitoraggio dislocati lungo il basso corso del Bacchiglione. In figura l'alveo fluviale è evidenziato in colore blu.

4.4.1 Ponte dei Sabbionari

Il Ponte dei Sabbionari (Fig. 34) sbarra il canale Scaricatore a est del ponte di Voltabarozzo e va a creare un bacino di raccolta in cui confluisce anche il Canale San Gregorio. Un sistema costituito da 4 paratie mobili regola il deflusso delle acque nel sottostante Canale Roncayette. Il Ponte si trova circa 500 metri a monte di Ca' Nordio. Si è scelto di inserire questo sito nella rete di monitoraggio per disporre di un campione di riferimento, rappresentativo del profilo di base del corpo idrico, con cui comparare i siti dislocati a valle del depuratore.

Il punto esatto di prelievo è collocato presso una scaletta intagliata nell'argine sinistro che consente una comoda discesa fino all'alveo.

4.4.2 *Lungargine Donati*

Il Lungargine Donati (Fig. 35) è il tratto di strada carrozzabile che percorre l'argine sinistro del Roncajette dalla confluenza del Fossetta fino a Ponte San Nicolò. Campionando nel primo tratto di tale argine è possibile controllare il profilo dell'acqua subito a valle dello scarico di Ca' Nordio. L'uscita del depuratore (cfr. 4.3.6) rappresenta il punto di monitoraggio intermedio tra il Ponte dei Sabbionari ed il Lungargine Donati. Dal Lungargine si accede al fiume grazie ad alcuni gradini di pietra posti vicino allo sbocco dello scolo Fossetta.

4.4.3 *Bovolenta*

La cittadina di Bovolenta si trova a 13 km in linea d'aria a sud di Ca' Nordio e circa a metà strada fra Padova ed il punto di commistione di Bacchiglione e Brenta. Si effettua il campionamento dal ponte del paese (Fig. 36), posizionandosi sul basamento di cemento di uno dei piloni. Da segnalare il contributo di un canale agricolo proveniente da ovest, dalla zona di Due Carrare.

4.4.4 *Ca' Bianca*

La località Ca' Bianca si colloca nei pressi del tratto terminale del fiume Bacchiglione, pochi chilometri a monte della sua confluenza con il Brenta, che avviene nei pressi di Ca' Pasqua. Durante i campionamenti svolti, si è sempre riscontrato un flusso retrogrado delle acque, probabilmente dovuto al cuneo salino nel tratto terminale del fiume. Come verrà discusso in seguito, tale supposizione è suffragata, oltre che dall'odore tipicamente salmastro, anche da un repentino innalzamento dei valori di conducibilità presso questo sito. Il campionamento viene effettuato sull'argine sinistro, da una piccola piattaforma che si protende nel fiume, nei pressi del ponte principale (Fig. 37).

4.4.5 *Foce del Brenta-Bacchiglione*

I fiumi Brenta e Bacchiglione, dopo essersi riuniti a Ca' Pasqua, sfociano unitamente nell'Adriatico con una classica foce ad estuario. Il campionamento presso questo sito avviene sull'argine destro, 2 km prima della linea costiera (Fig. 38). Da notare che, poco più a monte, si immette nella laguna, comunicante con il sistema fluviale mediante un canale, lo scarico del depuratore di Val da Rio, ovvero l'impianto di depurazione da 160 000 AE che serve il Comune di Chioggia.



Fig. 34: Ponte dei Sabbionari. La fotografia, scattata dal Ponte, mostra la scala di discesa all'alveo dello Scaricatore, al termine della quale ci si è posizionati per filtrare i campioni d'acqua.



Fig. 35: Lungargine Donati. Il sito si trova a valle dello scarico del depuratore di Ca' Nordio. Da segnalare l'immissione della porzione non tombinata dello scolo Fossetta.



Fig. 36: Ponte di Bovolenta. Il campionamento viene effettuato da uno dei basamenti del Ponte sul Bacchiglione.



Fig. 37: Località Ca' Bianca. Il sito di campionamento è collocato sull'argine sinistro del fiume Bacchiglione. La confluenza con il Brenta si trova pochi chilometri più a valle.



Fig. 38: Foce del Bacchiglione-Brenta. L'ultimo sito di monitoraggio del corpo idrico recettore è collocato in prossimità della foce fluviale, sull'argine destro.

4.5 Aree balneabili marino-costiere

Ad ora, in letteratura, sono stati riportati casi di giardiasi e/o criptosporidiosi correlati unicamente alla balneazione in acque dolci (Karanis, 2007; Baldursson and Karanis, 2011), ma pur tuttavia, essendo ancora poco investigata la capacità delle (oo)cisti protozoarie di sopravvivere nell'acqua di mare e data la costante positività, sia per *Giardia* che per *Cryptosporidium*, dei campioni prelevati presso lo scarico del depuratore di Ca' Nordio, per completezza sperimentale si è deciso di monitorare anche il litorale balneabile sito nei pressi della foce, onde evidenziare l'esistenza di un'eventuale rischio di infezione per i bagnanti. A tale scopo, durante il periodo estivo sono stati monitorati due siti (Tab. 8; Fig. 39), al fine di valutare l'eventuale rischio per la balneazione nelle spiagge a ridosso della foce unica del sistema fluviale Brenta-Bacchiglione, nei pressi di Chioggia-Sottomarina (VE). A tal proposito si rammenta che la legislazione vigente in materia di balneazione nelle acque marino-costiere (D.M. Salute del 30 marzo 2010) contempla l'analisi di due parametri batteriologici, ovvero *Escherichia coli* e gli enterococchi fecali, ma non la ricerca parassitologica.

ID	Sito	Posizione	Luogo
1	Spiaggia di Isolaverde	a Sud della foce	Sottomarina (VE)
2	Spiaggia di Brondolo	a Nord della foce	Isolaverde (VE)

Tab. 8: Siti relativi al monitoraggio delle aree marino-costiere adibite alla balneazione che si trovano a nord e a sud della foce del Brenta-Bacchiglione.

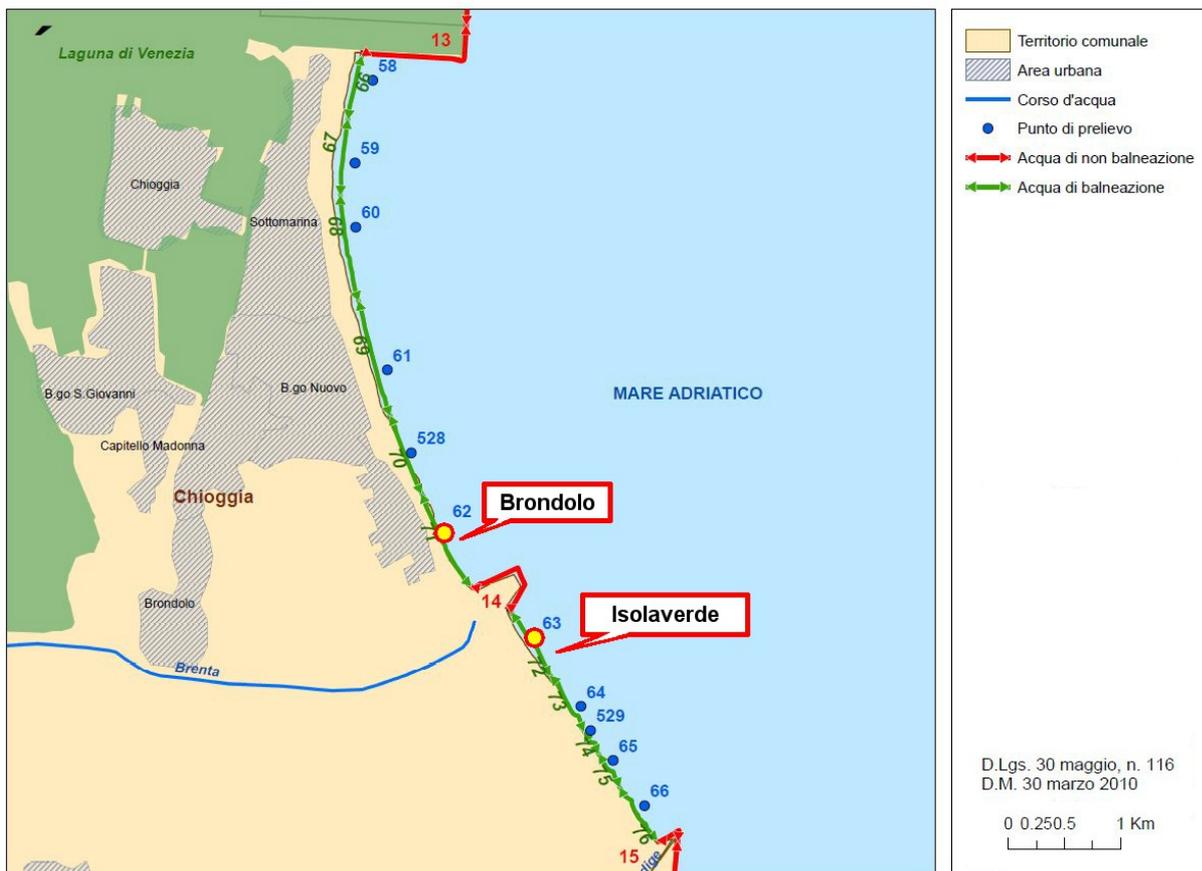


Fig. 39: Aree di balneazione del Comune di Chioggia. La numerazione in uso in figura è quella impiegata da Arpav per il monitoraggio della qualità delle acque balneabili del litorale veneto. Il sito di Brondolo corrisponde al punto di monitoraggio Arpav n. 62 e la spiaggia di Isolaverde al n. 63 (adattata da: Arpav, 2012).

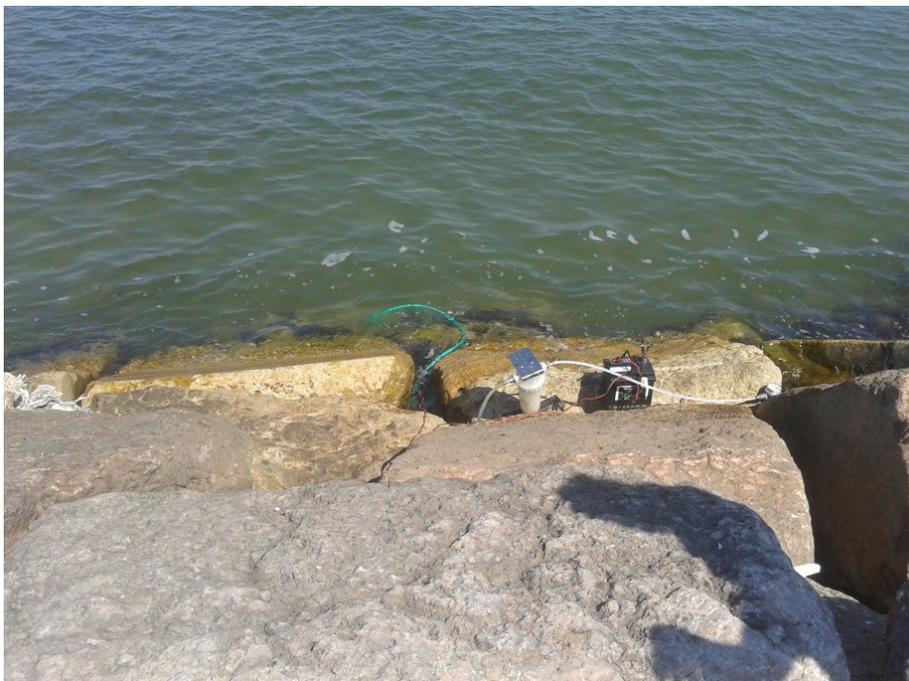


Fig. 40: Acque marino-costiere adibite alla balneazione. La filtrazione dell'acqua di mare viene eseguita dalle due dighe che fiancheggiano rispettivamente la spiaggia di Isolaverde e di Brondolo.

4.5.1 *Spiaggia di Isolaverde*

La foce del sistema fluviale Brenta-Bacchiglione si apre nel mare Adriatico guidata da due lunghe dighe che, per altro, delimitano l'unico tratto di acque non balneabili della zona. Presso la spiaggia di Isolaverde, posta a sud della foce, si è stabilito il primo punto di monitoraggio marino-costiero (Fig. 40).

4.5.2 *Spiaggia di Brondolo*

Il presente sito è il corrispettivo settentrionale di Isolaverde, ovvero l'area di balneazione che si trova a nord della foce di Brenta e Bacchiglione. Il campione viene prelevato dalla diga della spiaggia privata di un campeggio che occupa l'area (Fig. 40).

5. Metodiche analitiche

5.1 Protocolli analitici sperimentali: prove di laboratorio

A livello analitico, lo scopo principale da perseguire è consistito nella messa a punto di una metodica per la detezione di *Giardia* spp. e di *C.* spp. nelle acque, capace di massimizzare gli irrinunciabili requisiti di specificità, sensibilità, efficienza di recupero e, possibilmente, di economicità. In seguito ad un'approfondita ricerca bibliografica (cfr. 31), si è riusciti ad individuare i limiti dei metodi ad ora proposti i quali, complessivamente, sono risultati ancora incompatibili la ricerca routinaria dei due protozoi nelle matrici ambientali.

Si sono pertanto selezionati alcuni lavori di particolare interesse analitico (Aldom and Chagla, 1995; Alonso, 2011; Baque, 2011; Betancourt, 2002; 2008; USEPA 1995; 2001) e se ne sono rielaborati i protocolli di riferimento, cercando di ovviare ai loro difetti e di migliorarne complessivamente il design procedurale. Come risultato si sono realizzati due protocolli preliminari, denominati rispettivamente *metodo della Filtrazione su Cartuccia in Polipropilene (FCP)* e *metodo di Filtrazione su Membrana in Nitrocellulosa (FMN)*. Entrambi i protocolli sono stati poi testati per determinarne l'efficienza di recupero (ER) e individuarne eventuali limiti sperimentali. A tal fine si è proceduto effettuando delle prove preliminari in laboratorio, che hanno consentito di stabilire la percentuale di (oo)cisti protozoarie che le metodiche recuperano da un campione, e successivamente delle prove su campo, che hanno evidenziato alcuni difetti operativi, soprattutto in relazione alla tipologia di acqua filtrata.

Entrambe le metodiche, la FCP e la FMN, si basano su degli step concettuali comuni, eseguiti però mediante soluzioni differenziali. Tali passaggi consistono in: filtrazione di un grande volume d'acqua (~100 L), eluizione e concentrazione del campione, detezione microscopica mediante immunofluorescenza diretta.

Aprioristicamente, il metodo FCP è sembrato sufficientemente versatile ed idoneo alla filtrazione di grandi volumi di acqua; pur tuttavia si è considerata l'eventualità che, filtrando l'acqua attraverso una matrice tridimensionale quale quella cilindrica della cartuccia, si possano creare dei *percorsi preferenziali* e che di conseguenza il volume effettivamente filtrato sia di fatto inferiore a quello stimato. Per contro, il metodo FMN va ad ovviare la creazione di percorsi preferenziali in quanto il passaggio dell'acqua viene forzato attraverso una matrice filtrante virtualmente bidimensionale: si può sostenere che tutta l'acqua in entrata passi attraverso la membrana. Inoltre si è supposto che il metodo FMN consenta un recupero delle (oo)cisti dalla matrice filtrante più agevole, in quanto non è necessario lavare il supporto di ritenzione, ma si può semplicemente dissolvere la membrana in acetone.

Si descrivono in seguito entrambi i protocolli, nella loro versione originale che è stata sottoposta alle prove preliminari di verifica. Si sottolinea come non sia mai stata utilizzata strumentazione in vetro, onde evitare che le (oo)cisti - elettronegative - vengano sequestrate per effetto elettrostatico.

5.1.1 Filtrazione su Cartuccia in Polipropilene (FCP)

Step 1: Semina del controllo positivo

Si riempie un vascone in polietilene con un volume esatto di 100 L di acqua di rubinetto. Vi si inocula un controllo positivo costituito da 100 cisti di *G. lamblia* e 100 oocisti di *C. parvum*, inattivate e marcate in modo permanente con colorante fluorescente Texas Red (λ eccitazione = 595 nm, λ emissione = 615 nm), legato in modo covalente alla superficie delle (oo)cisti. Il controllo positivo è reperibile in commercio con il nome di Color Seed™ (BTF Ltd.).

Le (oo)cisti, enumerate mediante citofluorimetria dal produttore, vengono fornite in una fiala contenente 1 mL di buffer salino di sospensione. Per accertarsi che tutto il contenuto venga rimossa dalla fiala e seminato nel vascone, si aggiungono 2 mL di Tween-20 allo 0.05% nella fiala e si è vortexa per 20". Il contenuto viene versato nel vascone e si effettuano due ulteriori lavaggi della fiala con altri 3 mL di soluzione di lavaggio, accoppiati a 20" di vortex.

Step 2: Filtrazione del campione

Si è predisposto un supporto cilindrico ermetico per la cartuccia in polipropilene, contrassegnato da un foro di ingresso ed uno di uscita: l'acqua viene prelevata dal vascone mediante una pompa, che ne forza il passaggio all'interno del supporto e attraverso gli strati porosi della cartuccia. La cartuccia filtrante (h = 25 cm, \varnothing = 6 cm) è composta da strati sovrapposti di fibre di polipropilene (PP) finemente intrecciate ed è dotata di una porosità nominale di 1.2 μ m, sufficiente a bloccare meccanicamente sia cisti che oocisti. Prima di procedere con la filtrazione del controllo positivo è opportuno avvinare la cartuccia mediante il passaggio di 5 L di acqua.

La filtrazione dei 100 L di acqua contenenti il controllo positivo avviene mediante l'impiego di una pompa che garantisce un flusso costante di 3 L/s. E' opportuno che la velocità di filtrazione non sia troppo elevata (< 8 L/s) onde evitare un passaggio scorretto dei flussi d'acqua all'interno del supporto ed una conseguente ritenzione non ottimale delle (oo)cisti negli strati filtranti. La filtrazione dell'intero volume richiede circa 30'.

Step 3: Lavaggio della cartuccia in PP

Al termine della filtrazione si seziona la cartuccia in 4 parti con seghetto a mano, per favorire lo sfaldamento degli strati concentrici di PP. I pezzi della cartuccia vengono lavati due a due in un barattolo contenente 800 mL di un buffer di eluizione, con temperatura di 25°C. Il buffer di eluizione (EB) è composto da Phosphate Buffer Saline (PBS) 1x, con l'aggiunta di detergente Tween-20 0.1% e sodio-dodecil-solfato (SDS) allo 0.1%. Il lavaggio si effettua ponendo il barattolo in agitazione per 30' con i primi due pezzi. Si utilizzano poi lo stesso barattolo e lo stesso EB per il lavaggio degli altri due pezzi.

Step 4: Concentrazione del campione

L'EB viene ripartito in tubi da centrifuga a fondo conico Falcon da 50 ml e sottoposto a cicli di centrifugazione alle seguenti condizioni: T = 4°C, t = 10', v = 1500 G. La centrifuga in

dotazione consente di utilizzare 8 Falcon (400 mL totali) per ciclo, così da completare la concentrazione del retentato con due cicli di centrifuga ($t = 20'$). Al termine di ogni ciclo si elimina il surnatante con pipettatore automatico o a mano, avendo cura di non smuovere il pellet dal fondo del tubo Falcon. Al termine dei 2 cicli di centrifuga si riuniscono i vari pellet in un unico tubo. Il pellet totale viene poi risospeso mediante leggero vortexamento in 5 mL di EB fresco e, al bisogno, può essere lasciato over-night a 4°C.

Step 5: Osservazione del preparato

Si preparano 3 vetrini per campione, prelevando 50 μ L dal pellet totale, opportunamente risospeso con vortex, e depositandoli su di un vetrino portaoggetto con incavo. Ci si aiuta con il puntale della micropipetta per distribuire uniformemente l'aliquota nella concavità del vetrino. I vetrini vengono fatti essiccare a 37 °C per un massimo di 60' e quindi si aggiungono 5 μ l di *mounting medium*. Si copre con vetrino coprioggetto e si osserva con microscopio a fluorescenza a ingrandimento 400x.

Step 6: Determinazione dell'efficienza di recupero

L'efficienza di recupero (RE) delle (oo)cisti per la metodica FCP viene calcolata come percentuale di (oo)cisti recuperate sulle 100 (oo)cisti marcate, precedentemente seminate come controllo positivo. Si contano dunque le (oo)cisti di ciascun vetrino e si mediano i tre valori ottenuti. Questi vengono poi rapportati al volume del pellet finale (5 mL), ottenuto dalla filtrazione dei 100 L di acqua contenuti nel vascone, e si applica la formula:

$$RE\%_{FCP} = (\text{oo)cisti Texas Red contate} / (\text{oo)cisti seminate nel controllo positivo} \times 100$$

5.1.2 *Filtrazione su Membrana in Nitrocellulosa (FMN)*

Step 1: Semina del controllo positivo

Si riempie un vascone in polietilene (PET) con un volume esatto di 100 L di acqua di rubinetto. Viene seminato un controllo positivo costituito da 100 cisti di *G. lamblia* e 100 oocisti di *C. parvum*, inattivate e marcate in modo permanente con colorante fluorescente Texas Red (λ eccitazione = 595 nm, λ emissione = 615 nm), legato in modo covalente alla superficie delle (oo)cisti. Il controllo positivo è reperibile in commercio con il nome di Color Seed™ (BTF Ltd). Le 100 (oo)cisti marcate, enumerate mediante citofluorimetria dal produttore, vengono fornite in una fiala contenente 1 mL di buffer di sospensione: per accertarsi che tutto il contenuto venga rimossa dalla fiala e seminato di fatto nel vascone, si aggiungono 2 mL di soluzione Tween-20 allo 0.05% nella fiala e la si vortexa per 20". Il contenuto viene versato nel vascone. Si effettuano due ulteriori lavaggi della fiala con 3 mL di soluzione detergente di Tween-20, accoppiati a 20" di vortex.

Step 2: Filtrazione del campione

Come mezzo filtrante si impiega una membrana in nitrato di cellulosa con porosità nominale di 1.2 µm e diametro di 12 cm. La porosità è identica a quella della cartuccia in PP, ma la superficie filtrante, anziché cilindrica, è bidimensionale. La membrana viene alloggiata in un apposito supporto in acciaio inox per *ultrafiltrazione cross-flow* (Millipore). Mediante l'impiego di una pompa, si preleva l'acqua seminata con il controllo positivo dal vascone e la si filtra nel suddetto supporto. In questo caso la velocità di flusso risulta meno critica rispetto al protocollo FCP, in quanto *tutta* l'acqua in entrata è forzata nell'attraversare la membrana filtrante. L'unica attenzione va posta nel non esercitare pressioni in ingresso tali da forare o lacerare la membrana.

Step 3: Dissoluzione della membrana

Al termine della filtrazione, la membrana viene ripiegata su se stessa e posta in un piccolo beaker di plastica. Si procede con l'aggiunta di 100 mL di acetone al 90%. Così facendo si sfrutta la capacità dell'acetone di idrolizzare i legami esterei della nitrocellulosa, andando a causare la dissoluzione delle fibre della membrana. Si pone il beaker sotto agitazione magnetica per 10' o comunque fino a completa dissoluzione della membrana.

Step 4: Concentrazione del campione

Si travasa il campione in 2 tubi Falcon da 50 mL e si centrifuga per 10' a 1500 G e a 4°C. Si elimina il surnatante (acetone) e si risospende il pellet di ciascun tubo in 50 mL di acetone pulito, mediante vortex. A questo punto si centrifuga nuovamente per 10', 1500 G, 4°C. Si elimina il surnatante e si effettua un lavaggio con EB, sempre secondo lo schema che prevede risospensione, centrifugazione, eliminazione del surnatante. Con l'ultimo ciclo di centrifuga si riuniscono i pellet in 5 mL di EB finali.

Step 5: Osservazione del preparato

Si preparano 3 vetrini prelevando 50 µL dal pellet totale, opportunamente risospeso con vortex, e depositandoli su di un vetrino portaoggetto con incavo. Ci si aiuta con il puntale della micropipetta per distribuire omogeneamente l'aliquota nella concavità del vetrino. Si lasciano essiccare i vetrini a 37 °C per un t massimo di 60' e quindi si aggiungono 5 µL di *mounting medium*. Si copre con vetrino coprioggetto e si osserva in fluorescenza a 400x.

Step 6: Determinazione dell'efficienza di recupero

L'efficienza di recupero (RE) delle (oo)cisti per la metodica FMN viene calcolata come percentuale di (oo)cisti recuperate sulle 100 (oo)cisti marcate, precedentemente seminate come controllo positivo. Si contano dunque le (oo)cisti di ciascun vetrino e si mediano i tre valori ottenuti. Questi vengono poi rapportati al volume del pellet finale (5 mL) e si applica la formula:

$$RE\%_{FMN} = (\text{oo})\text{cisti Texas Red contate} / (\text{oo})\text{cisti seminate nel controllo positivo} \times 100$$

5.2 Protocolli analitici sperimentali: prove sul campo

La quasi totalità dei protocolli per la detezione di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nelle acque descritti in bibliografia presentava una pesante lacuna sperimentale, ovvero l'esecuzione degli stessi esclusivamente su campioni d'acqua di rubinetto e non su acque di altra tipologia. Le metodiche FCP e FMN sono dunque state sottoposte, oltre che alle prove di laboratorio con acqua potabile, ad una serie di test sul campo volti ad identificarne eventuali limiti sperimentali, in relazione alla diversa tipologia di acqua filtrata.

Le metodiche sono state testate sulle seguenti tipologie di acque: acque superficiali (fiumi Adige, Po, canale Piovego, canale Brentella), acque di risorgiva (pozzi comunali di Dueville), reflui civili (ingresso post-grigliatura dell'impianto di biotattamento di Vigonza) e reflui depurati (decantatori dell'impianto di biotattamento di Vigonza). Le informazioni emerse dalle prove su campo hanno tracciato i limiti di applicabilità del metodo FCP e del metodo FMN, soprattutto in relazione ad un parametro, ovvero i litri di campione filtrabili in rapporto alla torbidità dell'acqua da campionare.

5.3 Metodiche operative

Il protocollo operativo definitivo, impiegato per il monitoraggio della filiera idrica integrata di Padova, verrà presentato in seguito (cfr. 7.4), in quanto considerato risultato integrante dell'attività di ricerca svolta. Contestualmente, verrà discussa anche una variante della metodica operativa FCP (cfr. 7.5), denominata FCPsed, che è stata impiegata per l'analisi dei reflui civili, caratterizzati da torbidità nettamente superiori rispetto alle altre matrici idriche campionate.

5.4 Protocollo di immunostaining

Le prove di laboratorio per la determinazione dell'ER delle metodiche FCP e FMN si sono avvalse di un controllo positivo di (oo)cisti già pre-marcate dal produttore, con colorante fluorescente Texas Red. Per quanto riguarda i campioni effettuati sia durante le prove preliminari su campo che il monitoraggio vero e proprio della filiera idrica di Padova, ci si è invece avvalsi di un protocollo di immunofluorescenza diretta per la marcatura e detezione delle (oo)cisti *wild-type*. Lo staining dei vetrini viene dunque eseguito con il seguente protocollo:

- Si preleva un'aliquota di 50 μ L dal pellet, opportunamente risospeso con vortex, la quale viene posta su di un vetrino portaoggetto concavo. Ci si aiuta con il puntale della micropipetta per una distribuzione omogenea dell'aliquota sulla superficie dell'incavo.
- Il vetrino viene fatto essiccare a 37°C, per un tempo massimo di asciugatura di 60'. Quando il preparato è asciutto, si aggiungono 50 μ L di *staining solution*, ovvero una soluzione composta da PBS sterile a cui viene addizionata una mix di anticorpi monoclonali (mAb) di classe IgG1, sviluppati in topo e diretti contro antigeni di

superficie delle (oo)cisti di *Giardia* e di *Cryptosporidium* (Genetex), con concentrazione finale pari a 1:20 (5 µg/ml). Gli anticorpi sono coniugati con fluoroforo FITC.

- Si incuba a 37 °C per 15', ponendo i vetrini in un vassoio di supporto in cui è adagiato un panno umido, per impedire che la staining solution si essicchi. Al termine del periodo di incubazione, si rimuove l'anticorpo in eccesso inclinando il vetrino o, se necessario, con della carta assorbente, avendo cura di non smuovere il preparato dall'incavo del vetrino.
- Successivamente si aggiungono 200 µL di *fixing buffer* (BTF Ltd.), che prima dell'uso viene tenuto in ghiaccio per almeno 10". Si lascia riposare per 2'. Si rimuove poi delicatamente il fixing buffer in eccesso.
- Da ultimo, si aggiungono 5 µL di *anti-fading mounting medium* (BTF Ltd.) e si copre il preparato con vetrino coprioggetto tondo.

5.5 Analisi integrative

Per quanto riguarda i campionamenti effettuati sul campo, si è ritenuto opportuno eseguire saltuariamente, come attività analitica di supporto, anche la determinazione di alcuni parametri indicatori batteriologici, in base alla normativa di riferimento vigente (D.Lgs. 31/2001 e D.Lgs. 152/2006), la quale, si ricorda, non contempla per altro la ricerca parassitologica. Si è altresì proceduto con la tipizzazione molecolare di alcuni campioni prelevati lungo il sistema fognario mediante PCR, onde delucidare l'effettiva provenienza delle (oo)cisti rinvenute.

5.5.1 Parametri e metodi microbiologici

La metodica utilizzata per le analisi microbiologiche è la classica tecnica della filtrazione su membrana (MF). Nella MF si utilizzano delle membrane filtranti sterili in acetato di cellulosa, con porosità nominale di 0.45 µm: le membrane sono in grado di trattenere meccanicamente i batteri presenti in sospensione nel campione d'acqua, che viene filtrato attraverso la membrana stessa. Si pone la membrana alla base di un apposito imbuto in acciaio, collegato ad una pompa a vuoto che consente il risucchio del campione attraverso la membrana. La tecnica è estremamente semplice e veloce: i batteri presenti nel campione rimangono intrappolati sulla superficie della membrana. Dopo la filtrazione, ogni membrana viene posizionata in una piastra petri contenente uno specifico terreno di coltura agarizzato che, congiuntamente ad opportune condizioni di incubazione, consente la crescita delle specie batteriche ricercate (Tab. 9). Dopo l'incubazione si procede con la conta delle Unità Formanti Colonia (UFC) cresciute sulla membrana, ciascuna derivante dalla riproduzione di ogni singola cellula microbica depositatasi sulla superficie della membrana durante la filtrazione. Dalla conta delle UFC è possibile dunque calcolare la concentrazione iniziale dei microrganismi nel campione d'acqua, rapportando il numero di UFC al volume di riferimento.

Per un più affidabile procedimento analitico, inoltre, tutte le analisi vengono effettuate in doppio.

Terreno agar	Organismo/i isolato/i	Condizioni di crescita
Plate Count Agar (PCA)	Carica microbica totale mesofila	24h a 37°C
Plate Count Agar (PCA)	Carica microbica totale psicofila	48h a 22°C
Endo	Coliformi totali	24h a 37°C
m-FC	Coliformi fecali (<i>E. coli</i>)	24 h a 44°C
Maltose Azide Agar (KF)	Enterococchi fecali	48 h a 37°C
Sulphite Polymixin Sulphadiazine (SPS)	Clostridi solfito-riduttori	24 h a 37°C ¹
Cetrimide	<i>Pseudomonaceae</i>	24 h a 37°C ²

Tab. 9: Parametri indicatori propri della batteriologia classica, comunemente ricercati per l'analisi qualitativa delle acque. La tabella riporta il terreno agarizzato impiegato per l'isolamento di ciascun gruppo o specie batterica e le relative condizioni di incubazione, necessarie per la crescita microbica. ¹ I clostridi, batteri strettamente anaerobi, vengono incubati in condizioni di anaerobiosi in un'apposita giara ermetica. ² Il terreno Cetrimide, seppur selettivo, consente la crescita di diverse specie appartenenti alla famiglia delle Pseudomonaceae. *P. aeruginosa* viene distinto osservando le piastre di coltura con lampada di Wood a raggi UV, i quali vanno ad eccitare alcuni pigmenti endogeni del batterio (piocianina e pioverdina) che emettono una caratteristica fluorescenza.

Dal momento che il monitoraggio della filiera idrica integrata ha visto il campionamento di matrici idriche diverse tra loro, si è fatto riferimento alle specifiche normative che disciplinano le differenti tipologie di acqua. Segue una breve descrizione del significato di ciascun parametro indagato.

Per *Carica Microbica Totale* (CMT) si intende il numero di microrganismi che formano colonie visibili su terreno di coltura non selettivo Plate Count Agar (PCA), rispettivamente alle temperature di 22 ±1 °C e di 37 ±1°C, dopo un opportuno periodo di incubazione (48h a 22 °C e 24h a 37 °C). Il controllo della CMT nelle acque permette non solo di definire un profilo generale di qualità microbiologica dell'acqua, ma fornisce anche indicazioni sull'efficienza dei processi di trattamento e disinfezione eventualmente effettuati. La CMT a 22 °C consente di evidenziare approssimativamente, sotto il profilo quantitativo, le specie microbiche psicofile, abbondanti negli strati superficiali del suolo e nell'aria e facilmente adattabili all'ambiente idrico. La CMT a 37 °C è costituita per lo più da batteri appartenenti alla flora mesofila di derivazione umana e animale, oltre che provenienti dagli strati superficiali del terreno.

I *coliformi* totali, batteri bastoncellari Gram-negativi, appartengono alla famiglia delle enterobacteriaceae. Essi includono specie batteriche sia di provenienza ambientale che fecale. Sono comunemente diffusi nel suolo e negli ecosistemi idrici, nei quali la loro presenza suggerisce una probabile contaminazione organica.

I *coliformi fecali*, detti anche termotolleranti, sono strettamente correlati al tratto intestinale dei mammiferi e dell'uomo. *Escherichia coli* ne è il rappresentante per eccellenza. *E. coli* costituisce un eccellente indicatore di contaminazione fecale recente e anticipa quindi

la possibile co-presenza di altre specie biochimicamente simili, ma patogene.

Anche gli *enterococchi fecali* si trovano nella flora batterica intestinale dei mammiferi, anche se in numero inferiore rispetto all'*E. coli*. Sono cocchi Gram-positivi, asporigeni, caratterizzati da una capacità di sopravvivenza nell'ambiente nettamente maggiore rispetto a quella dei coliformi. Essi, nello specifico, risultano inoltre alquanto resistenti all'essiccamento e alla clorazione, e pertanto vengono considerati indicatori di un inquinamento fecale più remoto.

La maggior parte dei *clostridi solfito-riduttori*, e.g. *Clostridium perfringens*, è di norma saprofito e vive negli strati superficiali di suolo e sedimenti, anche se alcune specie possono essere rinvenute come commensali nell'intestino di alcuni animali, compreso l'uomo. Si tratta di batteri bastoncellari Gram-positivi, sporigeni ed anaerobi. Sono presenti nelle acque in caso di episodi di contaminazione fecale non recente, poiché sono in grado di dare origine ad una forma di resistenza ambientale (spora), in maniera simile a quanto accade per *Giardia* e *Cryptosporidium*, altamente termoresistente e stabile.

Pseudomonas aeruginosa è un coccobacillo Gram-negativo aerobio, caratterizzato da un'elevata capacità di adattamento. È un microrganismo ambientale frequentemente rilevabile anche nelle acque potabili, o quantomeno all'interno delle tubature di distribuzione. Presenta un'elevata resistenza ai comuni trattamenti per la potabilizzazione, quali la clorazione. La sua presenza è indice di un trattamento di disinfezione dell'acqua troppo blando.

I parametri microbiologici considerati per le *acque superficiali* (D. Lgs. 152/2006), inerenti all'individuazione di specie o di gruppi microbici significativi, sono:

- Carica Microbica Totale a 22°C
- Carica microbica Totale a 37°C
- Coliformi totali
- *Escherichia coli*
- Enterococchi fecali
- Clostridi solfito-riduttori

Per le *acque di mare adibite alla balneazione* (cfr. 4.5 e 8.6), normate dalla Direttiva 2006/7/CE, si sono considerati i medesimi parametri delle acque superficiali, nonostante quelli effettivamente previsti dalla normativa siano soltanto gli enterococchi fecali e l'*E. Coli* (Tab. 10).

ACQUE COSTIERE E ACQUE DI TRANSIZIONE

	A	B	C	D	E
	Parametro	Qualità eccellente	Qualità buona	Qualità sufficiente	Metodi di riferimento dell'analisi
1	Enterococchi intestinali espressi in ufc/100 ml	100 (*)	200 (*)	185 (**)	ISO 7899-1 o ISO 7899-2
2	Escherichia coli espressi in ufc/100 ml	250 (*)	500 (*)	500 (**)	ISO 9308-3 o ISO 9308-1

(*) Basato sulla valutazione del 95° percentile. Cfr. allegato II.

(**) Basato sulla valutazione del 90° percentile. Cfr. allegato II.

Tab. 10: Direttiva 2006/7/CE: tabella di riferimento per le classi qualitative delle acque di balneazione.

Per le *acque di falda* e le *acque potabili* (D. Lgs. 31/2001 e s.m.), captate per l'approvvigionamento pubblico ed eventualmente distribuite da acquedotto (cfr. 4.1 e 4.2), si sono considerati i seguenti parametri:

- Carica Microbica Totale a 22 °C
- Carica Microbica Totale a 37 °C
- Coliformi totali
- *Escherichia coli*
- Enterococchi fecali
- *Pseudomonas aeruginosa*

5.5.2 *Metodi molecolari*

La metodica di PCR impiegata è specifica per l'identificazione a livello di specie di *Giardia duodenalis* e di *Cryptosporidium parvum*. Si tratta di una nested PCR, protocollo in grado di fornire un'informazione qualitativa, ovvero di presenza/assenza dei patogeni, ma non quantitativa. Al momento non si dispone di una metodica di rtq-PCR in grado di quantificare i protozoi di interesse. Per gentile concessione del Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, presso il quale è stata condotta l'indagine molecolare, si riporta il protocollo operativo di PCR relativo alla tipizzazione di *Giardia duodenalis*:

Estrazione del DNA dai campioni:

I campioni, ovvero i pellet derivanti dall'eluizione del retentato ottenuto mediante filtrazione, sono stati pretrattati per purificare e concentrare le cisti in essi presenti. Da ciascun pellet totale, in seguito a risospensione, sono stati prelevati 500 µl di materiale, poi sottoposto a 3 cicli consecutivi di congelamento (T = -80°C; t = 5 min) e scongelamento in termoblocco (T = 70°C), per favorire la rottura della parete delle (oo)cisti. Si è quindi proceduto all'estrazione del DNA utilizzando il kit commerciale QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN®).

Amplificazione del DNA :

La reazione di amplificazione consiste in una nested PCR che utilizza i primer RH11-RH4 (Hopkins *et al.*, 1997) per la prima reazione ed i primer GIAR-F GIAR-R (Read *et al.*, 2002) per la seconda. Il sequenziamento del prodotto di amplificazione così ottenuto, di lunghezza pari a 175 bp consente l'identificazione univoca di *Giardia duodenalis*.

6. Valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio di contaminazione protozoaria

Considerando quanto esposto in precedenza (cfr. Cap. 2.), si è realizzato un modello semi-quantitativo che consente di caratterizzare numericamente il rischio di contaminazione delle risorse idropotabili e di fornire quindi indirettamente una stima predittiva della probabilità che, in un dato contesto, si verifichi un evento epidemico di giardiasi e/o criptosporidiosi. Il modello si propone di coprire per entrambi i patogeni due scenari alternativi, ovvero quelli che contemplano l'ingestione di (oo)cisti o mediante assunzione di acqua ritenuta potabile o in seguito a balneazione in acque contaminate. Ciascuno scenario prevede l'interazione di diverse variabili, come ad esempio la tipologia della matrice idrica captata o i trattamenti di potabilizzazione attuati.

6.1 Database delle epidemie di giardiasi e criptosporidiosi

Per quanto riguarda la valutazione dell'esposizione, avendo constatato che in letteratura sono numerosi i lavori di tipologia *case-report* che descrivono epidemie comunitarie di giardiasi e di criptosporidiosi, si è innanzitutto provveduto a creare un database elettronico, mediante impiego di foglio elettronico Excel (vedi cd-rom allegato), per la catalogazione sistematica degli eventi. Lo scopo principale di tale database, denominato Giardiasis & Cryptosporidiosis Database (GCDB), è quello di raccogliere e, per quanto possibile, di uniformare le informazioni contenute nei diversi lavori.

Per quanto riguarda la compilazione del GCDB, ci si è basati sul modello di due review antologiche (Karanis, 2007; Baldursson and Karanis, 2011), organizzate come elencazione di numerosi outbreak epidemici di giardiasi e criptosporidiosi verificatisi a livello mondiale tra il 1954 ed il 2007. Il GCDB è stato poi aggiornato al 2012, anno dell'ultimo studio pubblicato, mediante l'inserimento di report analoghi, rinvenuti grazie ad un'intensiva attività di ricerca bibliografica mirata che si è avvalsa del portale AIRE, dei report annuali del Center for Disease Control e di PubMed. Si riferisce come, tra il verificarsi di un evento epidemico e la sua relativa pubblicazione ufficiale, trascorra in media un periodo di almeno due anni.

I dati estrapolati dai lavori di riferimento ed inseriti nel GCDB sono innanzitutto stati ripartiti nelle due categorie *Drinking Water Outbreaks* (DWO) e *Recreational Waters Outbreaks* (RWO), in relazione ai due possibili scenari epidemici. Per ciascun evento si sono catalogate le seguenti informazioni, se disponibili:

- anno e mese di esordio dell'evento
- sito geografico (località, stato, nazione, continente)
- numero di casi registrati, fonte di approvvigionamento idrico (acqua superficiale, acqua tellurica, etc.)
- destinazione di utilizzo del suolo nei pressi del sito di captazione (urbano, rurale,

naturale)

- trattamenti di disinfezione operati (clorazione, filtrazione, etc.)
- cause note di contaminazione (contaminazione a livello della fonte di approvvigionamento, disinfezione condotta scorrettamente, etc.)
- fattori peggiorativi (elevata piovosità, presenza di animali, etc.)
- riferimento bibliografico

Tali informazioni sono state rielaborate realizzando alcune schede riassuntive relative alla distribuzione geografica degli outbreak, al pattern stagionale degli eventi ed infine all'analisi strutturale ed ambientale delle condizioni di contorno. In ciascuna scheda, per ciascuno dei fattori considerati, si riporta la percentuale di eventi verificatisi ed un grafico riassuntivo. Sia i conteggi che le rappresentazioni grafiche sono soggette ad aggiornamento automatico in caso di inserzione di nuovi eventi nel database.

6.2 Indice di Rischio Contaminazione Protozoaria delle Risorse Idropotabili

Grazie ai dati inseriti nel GCDB, è possibile anche l'esecuzione di un'analisi più fine, volta alla caratterizzazione del rischio di contaminazione, ovvero ad una stima predittiva della probabilità che un evento epidemico di giardiasi e/o criptosporidiosi comunitaria si verifichi in un determinato contesto. L'elaborazione dei dati del GCDB consente dunque l'implementazione di un semplice modello predittivo che è in grado di restituire un valore numerico, denominato Indice di Rischio di Contaminazione Protozoaria delle Risorse Idropotabili (IRCPRI) o, con terminologia anglosassone, Water Resources Protozoa Contamination Index (WRPCI).

Per quanto concerne i DWO, l'IRCPRI si basa sull'individuazione aprioristica di quattro categorie di fattori:

1. tipologia di acqua captata (*water source*)
2. livello di manutenzione infrastrutturale (*operation & maintenance*)
3. utilizzo del suolo (*land use*)
4. fattori peggiorativi (*detrimental factors*)

Ciascuna categoria rappresenta un insieme di elementi affini capaci di influenzare la probabilità di scoppio di un'epidemia comunitaria di giardiasi e/o criptosporidiosi. A ciascuna categoria viene assegnato un peso che ne stabilisce il grado di influenza (C_n). Ad esempio, la tipologia di acqua captata, e quindi la qualità idrica di partenza, è un fattore che riveste un'importanza maggiore rispetto alla sola determinazione della presenza/assenza di animali nei pressi del sito indagato. Si avrà dunque l'assegnazione di un coefficiente di peso maggiore alla categoria "acqua captata", rispetto a quella "presenza di animali".

Ciascuna categoria contiene poi delle variabili minori, e.g. se la tipologia di acqua captata è "acqua superficiale", essa potrà a sua volta essere di tipo lacustre, fluviale o ancora appartenente ad un vaso artificiale. Di nuovo, a ciascuna variabile si assegnano dei coefficienti che ne sanciscono la rilevanza (c_n). Il criterio di assegnazione di tali coefficienti si basa sull'estrapolazione dal GCDB della percentuale di eventi che si sono verificati sotto le

medesime condizioni.

Per ciascuna delle quattro categorie considerate si ottiene dunque un fattore specifico dato dalla moltiplicazione dei singoli coefficienti per la somma dei coefficienti delle sottocategorie. L'IRCPRI viene calcolato come somma dei quattro fattori specifici, secondo la formula:

$$\text{IRCPRI} = C_1 \cdot c_n + C_2 \cdot \sum c_n + C_3 \cdot \sum c_n + C_4 \cdot \sum c_n$$

Per quanto riguarda i RWO, il calcolo dell'IRCPRI è del tutto analogo a quanto già visto per i DWO. L'unica differenza sta nel numero di categorie considerate che risultano essere solamente tre:

1. sito di balneazione (*recreational water site*)
2. livello di manutenzione infrastrutturale (*operation and maintenance*)
3. fattori peggiorativi (*detrimental factors*)

E' stato posto che il campo di valori assumibili dall'IRCPRI vada da 0 a 10: più è elevato il valore di indice restituito dal modello, più è alto il rischio di contaminazione delle risorse idropotabili e, di conseguenza, la probabilità di innesco di un evento epidemico a livello della comunità. Per la calibrazione del campo valori dell'IRCPRI, si è calcolato il valore massimo (I_{\max}) assumibile dallo stesso indice, scegliendo per ciascuna categoria i coefficienti con valore maggiore e ponendo tale valore massimo pari a 10. I punteggi ottenuti con tutte le altre combinazioni di variabili (i) che il modello consente di selezionare risultano sempre inferiori a tale valore ed assumono un valore proporzionale secondo la seguente equazione, con x pari ad un numero compreso tra 0 e 10:

$$I_{\max} / 10 = i / x$$

SEZIONE III – Risultati e discussione

7. Risultati I – Metodiche analitiche

7.1 Efficienza di recupero del protocollo FCP

Per determinare l'ER per cisti ed oocisti protozoarie dei due protocolli sperimentali, l'FCP e l'FMN, è stata eseguita una serie di prove di laboratorio, secondo quanto descritto precedentemente (cfr. 5.1).

Per quanto concerne la metodica FCP, si sono eseguite 5 diverse prove, per un totale di 17 preparati visionati al microscopio. Le condizioni sperimentali sono rimaste sostanzialmente invariate tra una prova e l'altra, tranne la numerosità del controllo positivo che, mentre nelle prove 1, 2 e 3 consiste in 100 cisti di *Giardia* e 100 oocisti di *Cryptosporidium*, nelle prove 4 e 5 è composto rispettivamente da 200 cisti e 200 oocisti. I risultati delle singole prove sono riportati a seguire (Tab. 11).

Prova FCP	Pellet (mL)	n. vetrini	G / 50 µl	G / pellet	G / 100 L	G RE% _{FCP}	C / 50 µl	C / pellet	C / 100 L	C RE% _{FCP}
1	0,5	5	7,0	70,0	70,0	70,0	6,8	68,0	68,0	68,0
2	5,0	3	0,7	66,7	66,7	66,7	0,7	66,7	66,7	66,7
3	2,0	3	1,7	66,7	66,7	66,7	1,3	53,3	53,3	53,3
4	2,0	3	3,0	120,0	120,0	60,0	3,7	146,7	146,7	73,3
5	2,0	3	3,7	146,7	146,7	73,3	3,3	133,3	133,3	66,7

Tab. 11: Prove di laboratorio per la determinazione dell'efficienza di recupero (RE) della metodica FCP. La tabella riporta il numero progressivo della prova; il volume di sospensione finale del pellet, espresso in mL; il numero di vetrini osservati in epifluorescenza per ciascuna prova; la media delle cisti di *Giardia* contate nei vetrini (ciascun vetrino equivale ad un'aliquota di pellet da 50 µL); il numero di cisti rapportate al volume di sospensione del pellet; il numero di cisti che si stima essere stato recuperato sui 100 L nei quali è stato seminato il controllo positivo ed infine l'ER percentuale. In modo analogo sono riportati i dati relativi alle oocisti di *Cryptosporidium*.

Si è dunque calcolata l'ER media della metodica FCP, sia per il recupero delle cisti di *Giardia* che delle oocisti di *Cryptosporidium*, mediando le ER percentuali delle singole prove:

$$\begin{array}{l}
 \frac{\sum_1^n (\text{efficienza recupero prova } n)}{n^{\circ} \text{ prove}} = 67.3 \% \quad \text{per } \textit{Giardia} \\
 \phantom{\frac{\sum_1^n (\text{efficienza recupero prova } n)}{n^{\circ} \text{ prove}}} = 65.6 \% \quad \text{per } \textit{Cryptosporidium}
 \end{array}$$

Per le cisti di *Giardia* si sono riscontrati valori di ER sempre superiori al 60%, mentre per le oocisti di *Cryptosporidium* si sono ottenuti valori caratterizzati da una maggior variabilità, che vanno dal valore minimo registrato nella terza prova (53.3 %) a quello massimo della quarta (73,3 %).

7.2 Efficienza di recupero del protocollo FMN

Le prove programmate per la determinazione dell'ER del protocollo FMN (Tab. 12) era inizialmente 5, al pari di quelle eseguite per l'FCP. Ad ogni modo, difficoltà analitiche emerse durante le prime tre prove hanno portato ad una modifica precoce del protocollo, utilizzato nella sua nuova versione per la prova 4.

Prova FMN	Pellet (mL)	n. vetrini	G / 50 µl	G / pellet	G / 100 L	G RE% _{FMN}	C / 50 µl	C / pellet	C / 100 L	C RE% _{FMN}
1	5	5	0,8	80,0	80,0	80,0	0,6	60	60,0	60,0
2	5	3	0,7	66,7	66,7	66,7	0,7	66,7	66,7	66,7
3	2	3	1,3	53,3	53,3	53,3	3,33	133,3	133,3	66,7
4*	2	3	1,0	40,0	40,0	40,0	0,67	26,7	26,7	26,7

Tab. 12: Prove di laboratorio per la determinazione dell'ER della metodica FMN. La tabella riporta il numero progressivo delle prove da 1 a 4; il volume di sospensione finale del pellet ottenuto, espresso in mL; il numero di vetrini osservati per ciascuna prova; il numero medio di cisti di *Giardia* contate nei vetrini (un vetrino equivale ad un'aliquota di campione da 50 µL); il numero di cisti rapportate al volume di sospensione del pellet; il numero di cisti che si stima essere stato recuperato sui 100 L ed infine l'ER percentuale. In modo analogo sono riportati i dati relativi alle oocisti di *Cryptosporidium*.

Se si considerano unicamente i valori di ER ottenuti sia per *Giardia* che per *Cryptosporidium* nelle prove 1, 2 e 3, il protocollo FMN sembra fornire delle buone prestazioni, sicuramente competitive con quelle della FCP. Si ottengono infatti delle ER rispettivamente di:

$$\frac{\sum_{1}^n (\text{efficienza recupero prova } n)}{n^{\circ} \text{ prove}} = 66.7\% \quad \text{per } \textit{Giardia}$$

$$= 64.4\% \quad \text{per } \textit{Cryptosporidium}$$

I dati mascherano però diversi problemi tecnici intercorsi durante l'esecuzione delle prove della FMN, tanto che la conduzione delle prime tre prove è stata sufficiente per suggerire una modifica in corso d'opera del design originale della metodica.

L'ostacolo principale è consistito nella difficoltà di dissolvere idoneamente la membrana con l'acetone. Al termine dei 10' di agitazione magnetica si riscontravano ancora dei frammenti grossolani di membrana, seppur facilmente rimovibili mediante setacciatura con maglia da 65 µm. Pur tuttavia, nonostante la membrana sembrasse a questo punto interamente dissolta, nel momento in cui l'acetone veniva rimosso dal tubo Falcon e si procedeva con l'aggiunta di EB, in soluzione acquosa, le fibre di cellulosa tendevano a ricomporsi. Alla fine dei cicli di concentrazione mediante centrifuga ci si è trovati ad avere un pellet totale per lo più composto da fibre di cellulosa che si sono riaggregate dopo la rimozione dell'acetone che fungeva da solvente. D'altra parte non è stato ritenuto opportuno lasciare a lungo il campione in acetone, dal momento che il solvente avrebbe potuto danneggiare le (oo)cisti, andando a compromettere l'esito del successivo step di immunostaining. Gli aggregati cellulosici inoltre, al momento dell'osservazione microscopica,

rendevano alquanto difficoltosa la visione dei preparati, andando a creare un fastidioso rumore di fondo e presentando anche una parziale autofluorescenza.

In corso d'opera è così stato modificato il protocollo MFN (prova 4), optando per un recupero del retentato mediante lavaggio della membrana tramite retroflusso con EB. La membrana è stata dunque posta nuovamente sul supporto di filtrazione, ma invertita. Si è utilizzato 1 L di EB, che però non si è dimostrato un volume sufficiente per ottenere un idoneo lavaggio, come testimoniato dall'efficienza di recupero che per la prova 4 è nettamente inferiore (40.0% per le cisti di *Giardia* e 26.7% per le oocisti di *Cryptosporidium*).

In conclusione, stando alle sole prove di laboratorio, otteniamo valori di RE confrontabili tra metodo FCP e metodo FMN, anche se quest'ultimo si rivela più problematico e in grado di fornire un pellet di qualità inferiore. Da considerare anche la difficoltà aggiuntiva che l'operatore si trova a dover affrontare durante l'osservazione al microscopio dei preparati.

7.3 Risultati delle prove su campo

I protocolli FCP e FMN (cfr. 5.1) sono stati testati sul campo, per non presentare lo stesso tipo di lacuna sperimentale frequentemente rilevato nei lavori reperibili in bibliografia, ovvero il collaudo delle metodiche con la sola acqua di rubinetto. Avendo come obiettivo quello di creare dei protocolli per la detezione delle (oo)cisti di *Giardia* e *Cryptosporidium* nelle acque, a livello ambientale, sono pertanto stati selezionati alcuni siti sperimentali che potessero fornire diverse tipologie di matrici idriche (acque di falda, acque superficiali, reflui civili trattati e non) per testare gli eventuali limiti operativi delle metodiche sperimentali.

In generale, il volume d'acqua filtrabile è risultato correlato negativamente alla quantità di materiale sospeso (torbidità) presente nell'acqua campionata presso ciascun sito. Per quanto riguarda la metodica FCP, si sono combinati i dati ottenuti dalla filtrazione sperimentale di acque superficiali con dati disponibili in letteratura (Pall, 1996) per ricavare un grafico che correla la torbidità dell'acqua, espressa in *nephelometric turbidity units* (NTU), al volume che è possibile filtrare con cartucce cilindriche di porosità nominale pari a 1.2 μm (Fig. 41). Come si evince dal grafico, nel quale si è posto come *end-point* un volume di 100 L, fino a valori di torbidità ≤ 60 NTU la filtrazione non risente in modo sensibile della torbidità, mentre per valori > 60 NTU il volume filtrabile decresce rapidamente fino ad arrivare ad appena 6 L per valori di torbidità che si attestano attorno alle 500 NTU.

Per quanto riguarda il metodo FMN, questo si è dimostrato meno robusto del precedente nei confronti della torbidità dell'acqua da campionare. Intuitivamente, andando a filtrare il campione tramite una superficie bidimensionale quale quella della membrana in nitrocellulosa, nel complesso di gran lunga inferiore a quella della cartuccia, ci si trova ad intasare completamente la superficie filtrante anche a bassi valori di NTU (Fig. 42). In un primo momento si è provato ad effettuare una pre-filtrazione con una membrana a porosità maggiore (3 μm). Così facendo, si è reso però necessario processare anche la membrana di pre-filtrazione, dal momento che le cisti di *Giardia*, più grandi rispetto alle oocisti di

Cryptosporidium, avrebbero potuto essere bloccate già dal pre-filtro.

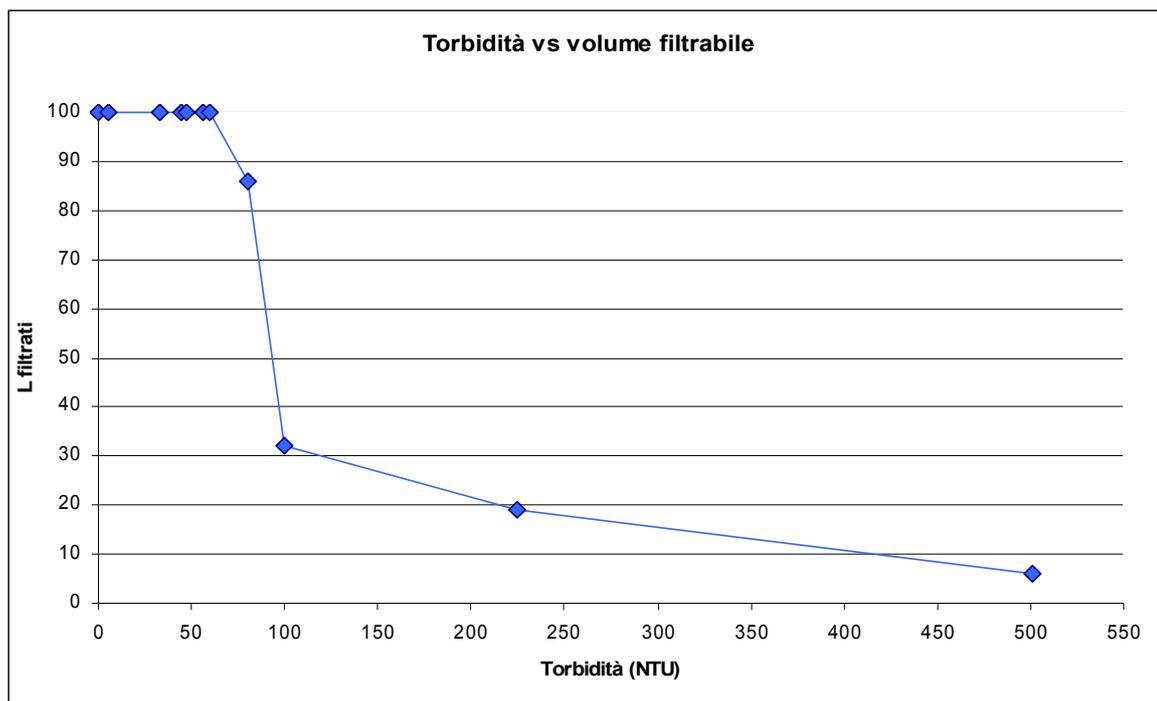


Fig. 41: Il grafico illustra la correlazione che sussiste tra la torbidità dell'acqua, espressa in NTU, ed i litri filtrabili con una cartuccia cilindrica in polipropilene, di porosità pari a 1.2 micron.

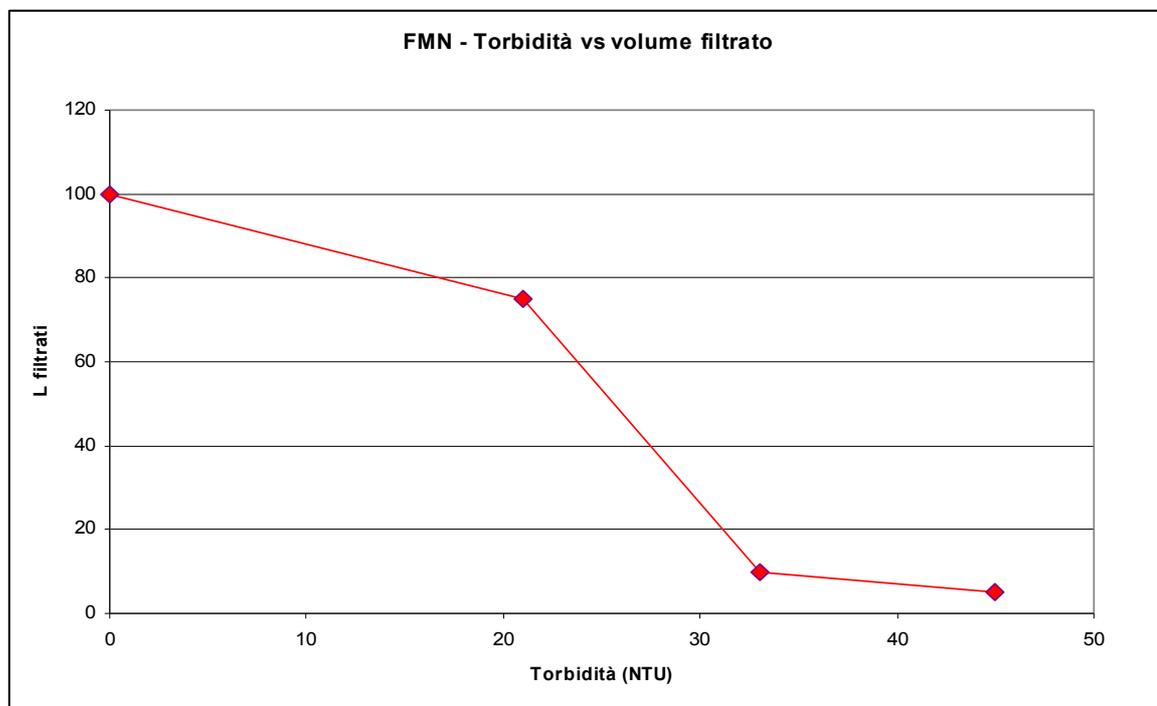


Fig. 42: Correlazione tra torbidità dell'acqua, espressa in NTU, e i litri filtrabili con membrana in cellulosa-nitrato, sempre di porosità pari a 1.2 micron.

A questo punto, come già descritto nel precedente paragrafo, il pellet totale avrebbe contenuto un quantità ancora maggiore di residui cellulósici, rendendo pressoché impossibile un'agevole osservazione al microscopio. Anche il lavaggio mediante retroflusso di EB risulta inapplicabile, in quanto il volume di buffer da centrifugare risulterebbe troppo elevato (2 L).

7.4 Metodica operativa FCP per la detezione di *Giardia* e *Cryptosporidium*

Considerando quanto descritto nei paragrafi precedenti, è stato ritenuto opportuno adottare per l'attività di monitoraggio della filiera idrica integrata di Padova la metodica FCP. A parità di costo e con ER comparabili tra le due metodiche, la FCP si è dimostrata più versatile, più veloce, più semplice, soprattutto nella fase di detezione microscopica, e quindi complessivamente preferibile. Rispetto al protocollo originale (cfr. 5.1.1) sono state apportate delle piccole modifiche, che vengono riportate qui sotto nel protocollo analitico operativo attualmente in uso:

Step 1: Campionamento e trasporto

Si monta la cartuccia in polipropilene all'interno di un apposito alloggiamento ermetico. Si connettono la pompa (flusso = 5 L/min) ed il contatore di flusso, rispettivamente in entrata ed in uscita dell'apparato. Si procede con la filtrazione di un volume pari a 100 L, se possibile. Sul luogo di campionamento si devono registrare i seguenti dati: data, ora, condizioni meteorologiche, temperatura dell'acqua, pH, torbidità, conducibilità, litri filtrati.

Al termine della filtrazione si ripone la cartuccia in un contenitore pulito, non necessariamente sterile, che viene riposto in un frigorifero da campo e mantenuto ad una temperatura di 4 °C durante il trasporto. Qualora risulti impossibile procedere immediatamente con le analisi, si può conservare il campione in cella frigorifera (T = 4°C) fino a 2 settimane.

Step 2: Lavaggio della cartuccia

Si seziona la cartuccia in 4 parti con un seghetto manuale, per favorire la sfaldatura ed il lavaggio degli strati concentrici in PP. I pezzi della cartuccia vengono lavati due a due in un barattolo contenente 800 mL di un buffer di eluizione (EB) tiepido (T = 20-25 °C). L'EB è composto da PBS 1x, con l'aggiunta di Tween-20 allo 0.1% e di SDS allo 0.1%. Il lavaggio si effettua ponendo il barattolo in agitazione meccanica su carrellino agitatore per 30', con i primi due pezzi. Si utilizzano poi lo stesso barattolo e lo stesso EB per il lavaggio degli altri due pezzi di cartuccia.

Step 3: Concentrazione del campione

L'EB viene ripartito in tubi da centrifuga a fondo conico Falcon da 50 ml e sottoposto a centrifugazione alle seguenti condizioni: T = 4°C, t = 10', v = 1500 G. Si utilizzano 8 Falcon (400 mL totali) per ciclo, così da completare lo step di concentrazione in due cicli di centrifuga (t_{tot} = 20').

Al termine di ogni ciclo di centrifuga si elimina il surnatante con pipettatore automatico o a mano. Al termine dei 2 cicli di centrifuga si riuniscono i vari pellet in una Falcon unica. Il pellet totale viene poi risospeso mediante vortexamento in 5 mL di EB pulito e, al bisogno, conservato over-night a 4°C (se non si procede immediatamente con l'analisi, è tuttavia preferibile conservare i campioni nelle cartucce).

Step 4: Immunostaining

Si preparano 3 vetrini per campione, prelevando 50 µL dal pellet totale, opportunamente risospeso con vortex, e depositandoli su di un vetrino portaoggetto con incavo. Ci si aiuta con il puntale della micropipetta per distribuire l'aliquota nella cavità. Si lasciano essiccare i vetrini a 37 °C per un massimo di 60'.

Quando il preparato è completamente asciutto, si aggiungono 50 µL di una soluzione composta da una mix di mAb mouse di classe IgG1 anti-giardia e anti-cryptosporidium (Genetex), con concentrazione immunoglobulinica pari a 5 µg/ml (soluzione 1:15). Gli anticorpi sono coniugati con fluoroforo FITC, per una detezione in immunofluorescenza primaria. Si incuba a 37 °C per 15', avendo l'accortezza di porre nel vassoietto di supporto un panno umido, per impedire che la soluzione marcante evapori. Si rimuove l'anticorpo in eccesso con della carta assorbente, avendo cura di non smuovere il preparato dall'incavo del vetrino. Si aggiungono 200 µL di *fixing buffer* (BTF), il quale viene mantenuto in ghiaccio fino a prima dell'uso. Si lascia riposare per 2'. Si rimuove delicatamente il fixing buffer in eccesso. Si aggiungono 5 µL di *anti-fading mounting medium* (BTF) e si copre con vetrino coprioggetto, facendo attenzione a non formare bolle tra preparato e coprioggetto. Si osserva il vetrino con microscopio ad epifluorescenza ad ingrandimento 400x (Fig. 43; Fig. 44; Fig. 45).

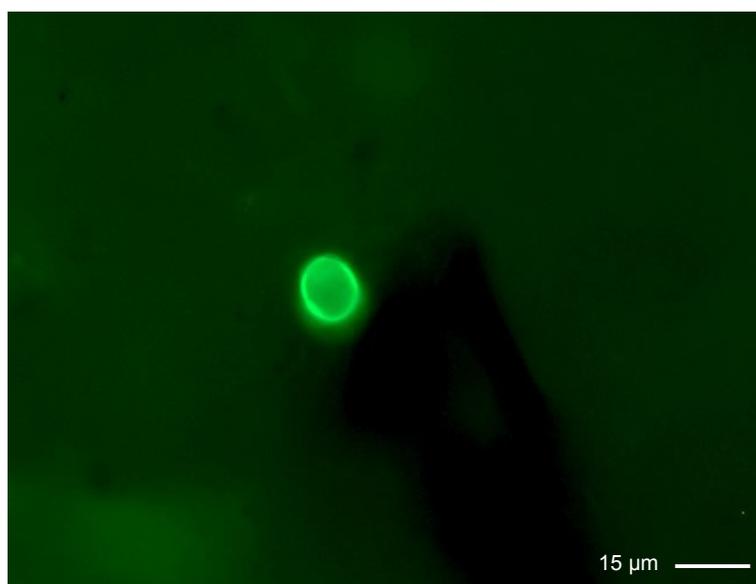


Fig. 43: Cisti di *Giardia* spp. con marcatura FITC osservata ad un ingrandimento di 400x con microscopio a fluorescenza Axiolab (Zeiss).

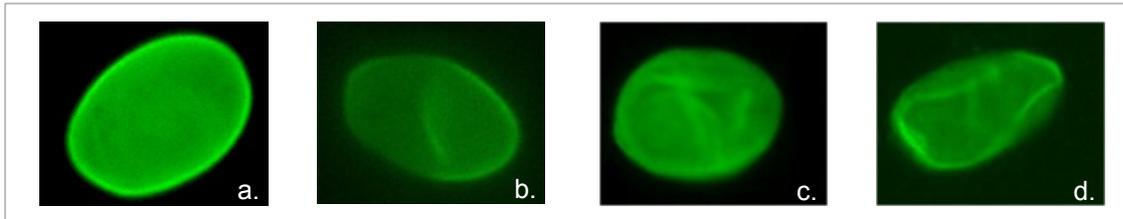


Fig. 44: Varianti morfologiche della cisti di *Giardia* spp., marcate con fluorocromo FITC. a. aspetto classico; b. cisti con piega singola; c. cisti corrugata; d. cisti accartocciata (immagini adattate da: EPA, 2001).

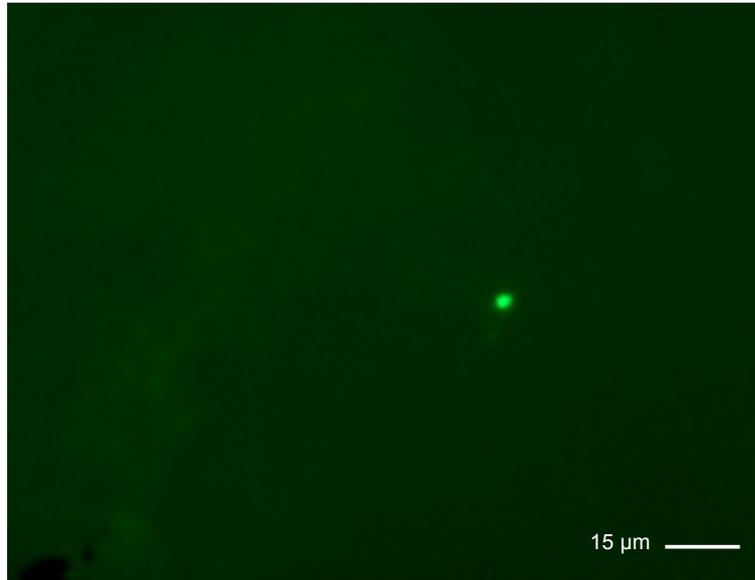


Fig. 45: Oocisti di *Cryptosporidium* spp. con marcatura FITC osservata ad un ingrandimento di 400x con microscopio a fluorescenza Axiolab (Zeiss).

7.5 Metodica operativa FCPsed

La metodica di filtrazione con cartuccia in polipropilene (FCP) per la detezone delle (oo)cisti di *Giardia* e *Cryptosporidium* nelle acque, è stata parzialmente modificata per rendere possibile il campionamento di alcuni siti di monitoraggio appartenenti al sistema fognario, contraddistinti da una diversa tipologia di matrice idrica. Vista infatti l'elevata torbidità che caratterizza i reflui fognari, è stato necessario introdurre, come step preliminare, un passaggio addizionale di sedimentazione, onde rendere possibile la filtrazione del campione. La metodica modificata prende il nome di FCPsed.

I siti in questione sono: l'ingresso *Centro Storico* del depuratore di Ca' Nordio, il collettore Intervento 10, il collettore Forcellini, il collettore Fossetta ed il collettore ZIP. Presso di essi si va a campionare il refluo fognario che, soprattutto in tempo asciutto, presenta una torbidità alquanto elevata e rende incompatibile la filtrazione diretta mediante cartuccia. Si ricorda che i campionamenti relativi al sistema fognario ed alle acque superficiali sono stati eseguiti tutti ad almeno 48 h di tempo dall'ultima precipitazione, come precauzione per standardizzare quanto possibile le condizioni di contorno, e.g. portata idrica, effetto del

dilavamento, torbidità.

Nella metodica FCPsed si fa precedere la filtrazione con uno step di sedimentazione parziale del materiale sospeso. A tale fine sono stati impiegati due imbuti conici in vetroresina, ciascuno con capacità massima di 20 L, equiparabili per funzione a dei coni Imhoff. Il tempo di sedimentazione è stato stabilito essere di 10', contrariamente ai 30' richiesti per la sedimentazione completa. La scelta di ridurre il tempo di sedimentazione è volta a rendere compatibile la matrice con il processo di filtrazione, cercando però di preservarla il più possibile simile all'originale.

Il rischio di sottostimare la concentrazione di (oo)cisti nel refluo a causa della sedimentazione delle stesse sul fondo dell'imbutto è estremamente ridotto: in letteratura si riportano infatti tempi di sedimentazione compresi tra le 18 e le 158 ore per *Giardia* e di circa 39 ore per *Cryptosporidium*. Tali studi hanno preso in considerazione sia la presenza di (oo)cisti libere nel mezzo acquoso, che di (oo)cisti adese al materiale organico sospeso (Thomas, 1993; Medema et al., 1998). Ad ogni modo, vista l'elevata imprecisione del range del tempo di sedimentazione, si è preferito scegliere un tempo di sedimentazione sufficiente (10') per chiarificare l'acqua tanto da renderla filtrabile, ma non in grado di alterare la concentrazione originale delle (oo)cisti.

Nonostante l'introduzione dello step di sedimentazione parziale, l'elevata quantità di particolato sospeso che si rinviene nei reflui fognari rende tecnicamente impossibile la filtrazione di un volume analogo a quello prelevato per l'analisi delle acque potabili. D'altro canto, avendo a che fare con una matrice meno diluita, è sicuramente possibile ridurre tale volume: con la FCPsed si andrà pertanto a campionare un volume compreso tra i 20 ed i 50 litri, anziché i 100 previsti per le altre tipologie di acqua.

8. Risultati II – Monitoraggio della filiera idrica integrata di Padova

8.1 Organizzazione dei risultati analitici

Le tabelle che compaiono nelle pagine seguenti riportano i dati relativi alla rete di punti considerati per il monitoraggio di *Giardia* e *Cryptosporidium* lungo la filiera idrica integrata di Padova. I risultati analitici di ciascun sito sono corredati da un breve commento critico. Si riportano anche i risultati inerenti alla determinazione dei parametri indicatori integrativi. In ordine vengono presentati i dati relativi ai pozzi di attingimento di Dueville (Tab. 13; Tab. 14), quelli della filiera di approvvigionamento dell'acqua potabile (Tab. 15-18), i dati inerenti il sistema fognario (Tab. 19-21), seguiti da quelli inerenti il corpo idrico recettore (Tab. 22), ed infine i dati ottenuti dal campionamento delle due aree marino-costiere adibite alla balneazione che si trovano nei pressi della foce del Brenta-Bacchiglione (Tab. 23). I conteggi relativi all'enumerazione delle (oo)cisti protozoarie sono riportati nelle tabelle già corretti tenendo conto delle rispettive ER proprie della metodica analitica FCP (cfr. 7.1).

Per quanto riguarda la catalogazione dei dati ottenuti, effettuata mediante registrazione su foglio elettronico di calcolo, a ciascun sito di monitoraggio è stato assegnato un codice che consente l'identificazione univoca e progressiva dei campionamenti effettuati. Il codice si compone di tre parti: la prima indica il tipo di matrice (MAT); la seconda indica il sito (SIT) e la terza, infine, riporta la numerazione progressiva del campionamento presso tale sito (NUM). Il codice identificativo avrà dunque la seguente struttura: MAT-SIT-NUM.

I valori che il campo MAT può assumere sono: POZ (pozzo), AC (acquedotto), DEP (depuratore) e BAC (Bacchiglione). I valori possibili per il campo SIT sono invece: 2VX (Dueville + num. pozzo), SOR (Sorgenti), PAR (Partitore), CAN (Canaletta), PRE (acqua mista pre-distribuzione), BRE (Canale Brentella), ZIP (collettore Zona Industriale), FOS (collettore Fossetta), INT (collettore Intervento 10), FOR (collettore Forcellini), IN (ingresso Centro Storico del depuratore), OUT (uscita depuratore), SAB (Ponte dei Sabbionari), DON (Lungargine Donati), BOV (Ponte di Bovolenta), CAB (Ca' Bianca), FOC (Foce), ISV (Isolaverde) e BRO (Brondolo).

8.2 Acquifero dell'Alto Vicentino

Per quanto riguarda il campionamento dei pozzi artesiani dislocati nel territorio del Comune di Dueville, in parallelo alla ricerca dei due protozoi *Giardia* e *Cryptosporidium* (Tab. 13), è stata condotta la determinazione del profilo qualitativo microbiologico classico (Tab. 14). Le analisi dei parametri indicatori batteriologici hanno evidenziato in generale una buona qualità microbiologica, presentando solo alcuni sforamenti occasionali dei limiti previsti dalla normativa. Tali eventi riguardano per altro i siti più sensibili (Area Verde; Impianti Sportivi 2; Impianti sportivi 3), in quanto caratterizzati da superficie non cementata nell'area circostante il pozzo di attingimento. Le anomalie rilevate si possono pertanto interpretare come

conseguenza del percolamento di specie batteriche ambientali (e.g. batteri coliformi), presenti negli strati più superficiali del terreno, all'interno del pozzo. A riprova di ciò, si è registrata la totale negatività dei parametri che sono indice di contaminazione fecale, ovvero *E. coli* e gli enterococchi fecali. Coerentemente, in assenza di contaminazione fecale, i campioni analizzati sono altresì risultati negativi per la presenza di (oo)cisti di *Giardia* e *Cryptosporidium*.

ID	Data	Temp. H ₂ O (°C)	pH	Cond. (µS/cm)	vol. (l)	pellet (ml)	n. vetrini	Giardia spp.			Cryptosporidium spp.		
								cisti / 50 µl	cisti / pellet	cisti / 100 L	oocisti / 50 µl	oocisti / pellet	oocisti / 100 L
Scuola Elementare 1													
POZ-2V1-01	16/05/2011	15,1	7,6	372	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V1-02	22/06/2011	17,2	7,6	335	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V1-03	25/07/2011	16,9	7,7	361	100	3	1	0	0	0	0	0	0
Area verde													
POZ-2V2-01	16/05/2011	18,0	7,4	608	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V2-02	22/06/2011	21,0	7,3	515	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V2-03	25/07/2011	23,5	6,9	608	100	3	1	0	0	0	0	0	0
Villino													
POZ-2V3-01	16/05/2011	17,5	7,4	529	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V3-02	22/06/2011	22,3	7,3	480	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V3-03	25/07/2011	22,2	7,4	519	100	3	1	0	0	0	0	0	0
Scuola Media													
POZ-2V4-01	16/05/2011	17,9	7,3	566	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V4-02	22/06/2011	20,1	7,2	520	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V4-03	25/07/2011	20,4	6,9	570	100	3	1	0	0	0	0	0	0
Scuola Elementare 2													
POZ-2V5-01	16/05/2011	20,4	7,7	365	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V5-02	22/06/2011	25,9	7,6	320	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V5-03	25/07/2011	24,0	7,3	349	100	3	1	0	0	0	0	0	0
Impianti sportivi 1													
POZ-2V61-01	16/05/2011	15,8	7,3	376	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V6-02	22/06/2011	18,2	7,6	340	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V6-03	25/07/2011	22,1	7,8	369	100	3	1	0	0	0	0	0	0
Impianti sportivi 2													
POZ-2V7-01	18/05/2011	21	7,6	394	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V7-02	23/06/2011	30,3	7,5	335	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V7-03	25/07/2011	30,2	7,3	391	100	3	1	0	0	0	0	0	0
Villino													
POZ-2V8-01	18/05/2011	18,7	7,8	373	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V8-02	23/06/2011	25,1	7,6	335	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V8-03	25/07/2011	22,3	7,3	367	100	3	1	0	0	0	0	0	0
Scuola Materna													
POZ-2V9-01	18/05/2011	17,9	7,6	382	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V9-02	23/06/2011	20,3	7,5	340	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V9-03	25/07/2011	25,2	7,2	385	100	3	1	0	0	0	0	0	0
Impianti sportivi 3													
POZ-2V10-01	18/05/2011	16,3	7,5	556	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V10-02	23/06/2011	17,4	7,4	500	100	3	2	0	0	0	0	0	0
POZ-2V10-03	25/07/2011	16,7	7,0	561	100	3	1	0	0	0	0	0	0

Tab. 13: La tabella riassume i risultati relativi alla ricerca di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nelle acque di falda prelevate dai 10 pozzi dislocati nel territorio comunale di Dueville (VI), che attingono dal medesimo acquifero che fa da fonte di approvvigionamento all'acquedotto padovano. I risultati mostrano un profilo qualitativo estremamente elevato, nonché la completa assenza di (oo)cisti protozoarie nei campioni analizzati.

ID	Data	Temp. H ₂ O (°C)	pH	Cond. (µS/cm)	CMT 22°C	CMT 37°C	coliformi tot.	<i>E. coli</i>	Enterococchi fecali	<i>P. aeruginosa</i>
Valore limite					100 UFC / 1 ml	20 UFC / 1 ml	0 UFC / 100 ml	0 UFC / 100 ml	0 UFC / 100 ml	0 UFC / 250 ml
Scuola Elementare 1										
POZ-2V1-01	16/05/2011	15,1	7,6	372	2	0	0	0	0	0
POZ-2V1-02	22/06/2011	17,2	7,6	335	1	32	0	0	0	0
POZ-2V1-03	25/07/2011	16,9	7,7	361	11	30	1	0	0	0
Area verde										
POZ-2V2-01	16/05/2011	18,0	7,4	608	17	10	2	0	0	0
POZ-2V2-02	22/06/2011	21,0	7,3	515	86	15	7	0	0	0
POZ-2V2-03	25/07/2011	23,5	6,9	608	>200	>200	1	0	0	0
Villino										
POZ-2V3-01	16/05/2011	17,5	7,4	529	0	0	0	0	0	0
POZ-2V3-02	22/06/2011	22,3	7,3	480	0	6	0	0	0	0
POZ-2V3-03	25/07/2011	22,2	7,4	519	0	1	0	0	0	0
Scuola Media										
POZ-2V4-01	16/05/2011	17,9	7,3	566	1	33	0	0	0	0
POZ-2V4-02	22/06/2011	20,1	7,2	520	1	1	0	0	0	0
POZ-2V4-03	25/07/2011	20,4	6,9	570	4	6	0	0	0	0
Scuola Elementare 2										
POZ-2V5-01	16/05/2011	20,4	7,7	365	1	0	0	0	0	0
POZ-2V5-02	22/06/2011	25,9	7,6	320	3	5	0	0	0	15
POZ-2V5-03	25/07/2011	24,0	7,3	349	1	17	0	0	0	0
Impianti sportivi 1										
POZ-2V6-01	16/05/2011	15,8	7,3	376	1	1	0	0	0	0
POZ-2V6-02	22/06/2011	18,2	7,6	340	0	0	0	0	0	0
POZ-2V6-03	25/07/2011	22,1	7,8	369	18	17	0	0	0	0
Impianti sportivi 2										
POZ-2V7-01	18/05/2011	21	7,6	394	0	3	0	0	0	1
POZ-2V7-02	23/06/2011	30,3	7,5	335	61	29	0	0	0	1
POZ-2V7-03	25/07/2011	30,2	7,3	391	76	93	0	0	0	9
Villino										
POZ-2V8-01	18/05/2011	18,7	7,8	373	4	1	0	0	0	0
POZ-2V8-02	23/06/2011	25,1	7,6	335	30	7	0	0	0	0
POZ-2V8-03	25/07/2011	22,3	7,3	367	0	180	0	0	0	0
Scuola Materna										
POZ-2V9-01	18/05/2011	17,9	7,6	382	0	0	0	0	0	0
POZ-2V9-02	23/06/2011	20,3	7,5	340	0	2	0	0	0	0
POZ-2V9-03	25/07/2011	25,2	7,2	385	1	36	0	0	0	0
Impianti sportivi 3										
POZ-2V10-01	18/05/2011	16,3	7,5	556	9	71	0	0	0	0
POZ-2V10-02	23/06/2011	17,4	7,4	500	>200	>200	0	0	0	0
POZ-2V10-03	25/07/2011	16,7	7,0	561	0	3	0	0	0	0

Tab. 14: In tabella sono riportati i risultati relativi alla determinazione dei parametri indicatori propri della batteriologia classica. I risultati mostrano un profilo qualitativo complessivamente molto buono, fatta eccezione per degli sforamenti sporadici dei valori limite di alcuni parametri (in rosso). La totale assenza di batteri indicatori di contaminazione fecale (*Escherichia coli* ed enterococchi) nei campioni analizzati è concorde alla completa assenza di (oo)cisti protozoarie. Si consideri che l'acqua analizzata è priva di qualsiasi tipo di trattamento di disinfezione.

8.3 Filiera di approvvigionamento dell'acqua potabile

I siti monitorati lungo la filiera di approvvigionamento dell'acqua potabile sono cinque (cfr. 4.2). Si tratta della Sala Sorgenti di Villaverla, ovvero il punto di captazione principale dell'

acquedotto; il Partitore di Vicenza, punto di accesso intermedio alla Canaletta a pelo libero; l'arrivo di tale linea di adduzione presso il CIB; il Nodo pre-distribuzione, sempre dislocato all'interno del medesimo impianto ed infine il Canale Brentella, che costituisce un punto di captazione accessorio (Tab. 15).

ID	Data	Ora	Temp. H ₂ O (°C)	pH	torbidità	vol. (l)	pellet (ml)	n. vetrini	Giardia spp.			Cryptosporidium spp.		
									cisti / 50 µl	cisti / pellet	cisti / 100 L	oocisti / 50 µl	oocisti / pellet	oocisti / 100 L
Sala Sorgenti														
AC-SOR-01	11/07/2012	9.30	12,6	7,5	0.004 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-SOR-02	06/08/2012	10.15	12,4	7,7	0.003 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-SOR-03	18/09/2012	10.50	13,7	7,6	0.006 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-SOR-04	01/10/2012	10.30	13,5	7,8	0.008 FNU	100	5	1	0	0	0	0	0	0
AC-SOR-05	08/11/2012	11.00	12,5	7,5	0.002 FNU	70	3	1	0	0	0	0	0	0
AC-SOR-06	03/12/2012	11.10	11,7	7,6	0.003 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
Partitore														
AC-PAR-01	11/07/2012	10.30	12,9	7,2	0.008 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-PAR-02	06/08/2012	9.30	13,3	7,4	0.007 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-PAR-03	18/09/2012	9.40	14,1	7,1	0.009 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-PAR-04	01/10/2012	9.30	13,8	7,1	0.009 FNU	100	5	1	0	0	0	0	0	0
AC-PAR-05	08/11/2012	9.45	13,2	7,4	0.005 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
AC-PAR-06	03/12/2012	10.00	11,9	7,2	0.006 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
Canaletta a pelo libero														
AC-CAN-01	10/07/2012	10.00	15,2	7,5	0.042 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-CAN-02	01/08/2012	10.00	16,0	7,5	0.030 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-CAN-03	28/08/2012	9.40	15,2	7,5	0.013 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-CAN-04	09/10/2012	9.30	14,4	7,5	0.052 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-CAN-05	15/11/2012	9.45	13,6	7,5	0.093 FNU	100	3	2	0	0	0	0	0	0
AC-CAN-06	18/12/2012	10.30	12,6	7,5	0.041 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
AC-CAN-07	21/01/2013	9.30	12,4	7,6	0.067 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
AC-CAN-08	15/02/2013	10.30	13,0	7,5	0.098 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
AC-CAN-09	11/03/2013	11.30	13,2	7,5	0.065 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
AC-CAN-10	14/05/2013	9.30	13,8	7,6	0.044 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
AC-CAN-11	03/07/2013	9.00	14,8	7,5	0.078 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
Nodo pre-distribuzione														
AC-PRE-01	10/07/2012	11.00	16,2	6,8	0.065 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-PRE-02	01/08/2012	10.00	14,7	7,7	0.050 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-PRE-03	28/08/2012	10.00	14,2	7,9	0.029 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-PRE-04	09/10/2012	10.00	15,5	7,7	0.046 FNU	100	5	2	0	0	0	0	0	0
AC-PRE-05	15/11/2012	10.30	14,6	6,9	0.097 FNU	100	3	2	0	0	0	0	0	0
AC-PRE-06	18/12/2012	10.30	13,6	7,1	0.057 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
AC-PRE-07	21/01/2013	9.30	12,6	7,0	0.055 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
AC-PRE-08	15/02/2013	10.30	12,5	7,2	0.108 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
AC-PRE-09	11/03/2013	11.30	14,1	6,9	0.073 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
AC-PRE-10	14/05/2013	9.35	14,4	7,6	0.059 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
AC-PRE-11	03/07/2013	9.00	15,3	7,5	0.112 FNU	100	3	1	0	0	0	0	0	0
Canale Brentella														
AC-BRE-01	10/07/2012	8.45	25,6	6,8	9.53 FAU	100	2	2	5,5	220	327	8	320	488
AC-BRE-02	01/08/2012	8.45	22,9	7,6	16.21 FAU	100	2	2	4,5	180	267	6	240	366
AC-BRE-03	28/08/2012	8.45	21,8	7,8	14.28 FAU	100	2	2	5,0	200	297	6,5	260	396
AC-BRE-04	09/10/2012	8.45	17,2	7,8	6.40 FAU	80	2	2	2,0	80	149	2	80	152
AC-BRE-05	15/11/2012	12.00	11,2	6,4	5.35 FAU	30	2	2	2,5	100	495	2	80	407
AC-BRE-06	18/12/2012	11.00	8,5	7,6	2.47 FAU	100	5	2	4,0	400	594	1	100	152
AC-BRE-07	21/01/2013	10.15	7,3	7,7	3.46 FAU	100	5	2	3,5	350	520	2,5	250	381
AC-BRE-08	15/02/2013	10.00	7,8	7,1	7.90 FAU	102	5	2	1,5	150	219	0,5	50	75
AC-BRE-09	11/03/2013	11.45	10,8	7,6	5.76 FAU	102	5	2	1,0	100	146	2	200	299

Tab. 15: La tabella riporta i dati relativi al monitoraggio del sistema acquedottistico. I siti in azzurro prevedono l'analisi di acqua di falda, mentre il sito evidenziato in verde quella di acqua superficiale.

8.3.1 *Sala Sorgenti*

Il sito di captazione dell'acquedotto padovano, denominato Sala Sorgenti, si trova nell'Oasi Naturalistica di Villaverla, nell'Alto Vicentino, ed è posto a monte dell'intera filiera di approvvigionamento. Presso la Sala Sorgenti il monitoraggio si è protratto con cadenza mensile a partire dal mese di luglio 2012. Il profilo chimico-fisico dell'acqua che zampilla dai pozzi della Sala Sorgenti è estremamente stabile, in relazione alla natura stessa delle risorgive, le quali, fino al momento del loro affioramento, costituiscono un sistema idrogeologico quasi isolato. I valori di torbidità registrati sono estremamente bassi (torbidità media = 0.004 FNU) e la temperatura subisce variazioni stagionali minime. Dal punto di vista microbiologico, la qualità microbiologica dell'acqua di questo sito risulta ineccepibile e, coerentemente, si è sempre riscontrata l'assenza di (oo)cisti protozoarie. Rispetto ai pozzi comunali di Dueville, il profilo batteriologico migliore, in quanto i fontanili di zampillamento sono protetti da eventuali episodi di contaminazione da un'apposita struttura coperta, la galleria di presa.

Vedremo come, vista la costante negatività dei campioni analizzati, a partire dal mese di dicembre 2012 il campionamento presso questo sito sia stato sospeso, a favore di un più agevole controllo presso il CIB, dove è comunque possibile prelevare la medesima acqua della Sala Sorgenti prima della sua immissione nella rete di distribuzione urbana.

8.3.2 *Partitore*

Il Partitore di Vicenza rappresenta il secondo sito di campionamento della rete di monitoraggio. Esso costituisce l'ultimo accesso diretto alla Canaletta di adduzione, prima del lungo tratto sotterraneo che essa percorre tra la città berica e quella patavina. Ricordiamo come in realtà esistano tre distinte linee di adduzione, tra le quali la Canaletta è però di fatto quella più esposta al rischio di contaminazione. A differenza delle altre due linee la Canaletta a pelo libero, oltre ad essere il manufatto più antico, condotta l'acqua per semplice gravimetria ed è pertanto caratterizzata dall'assenza di pressione al suo interno. Per questo motivo non si può escludere il rischio di l'infiltrazione di microcontaminanti in coincidenza di eventuali crepe o fratture. I campionamenti presso il Partitore sono iniziati nel mese di Luglio 2012. Le considerazioni estrapolate dai dati ottenuti sono del tutto sovrapponibili a quelle già presentate per la Sala Sorgenti. Si conferma l'ottimo profilo chimico-fisico e microbiologico dell'acqua proveniente da Villaverla, la sua bassa variabilità parametrica stagionale e la costante assenza di (oo)cisti, al pari della perenne negatività dei classici parametri batteriologici di contaminazione organico-fecale. Anche i campionamenti presso il Partitore sono stati sospesi nel mese di Dicembre 2012, a favore del solo monitoraggio dell'acqua addotta presso l'arrivo della Canaletta di adduzione presso il CIB.

8.3.3 *Canaletta a pelo libero*

L'uscita della Canaletta a pelo libero si trova all'interno del CIB: qui l'acqua giunge dopo un tragitto sotterraneo che dura all'incirca 10 ore. L'acqua in uscita dalla canaletta, già

precauzionalmente clorata presso la Centrale di Saviabona (VI), viene nuovamente addizionata di ipoclorito di sodio. In seguito viene miscelata con l'acqua proveniente dalle altre due linee adduttrici, le condotte forzate da 900 cm e da 1300 cm, e dell'immissione nella rete di distribuzione cittadina.

Il sito è stato monitorato con cadenza mensile per 12 mesi, da Luglio 2012 a Luglio 2013. Ancora una volta la qualità dell'acqua risulta essere sempre impeccabile e, anche qui, la ricerca di *Giardia* e di *Cryptosporidium* ha restituito unicamente risultati negativi.

8.3.4 Nodo pre-distribuzione

Il punto di campionamento è posto appena a monte dell'immissione finale dell'acqua nella rete di distribuzione cittadina. La denominazione di acqua *mista*, in riferimento alla tipologia di matrice idrica prelevata presso questo sito, deriva dal fatto che essa è composta dalla miscelazione dell'acqua proveniente da tutte e tre le linee di adduzione dell'acquedotto padovano. I dati discussi nella relazione del II anno circa i valori medi del profilo dell'acqua erogata a Padova, si riferiscono per l'appunto a campioni prelevati presso questo sito. Il campionamento del nodo pre-distribuzione si è protratto da luglio 2012 a luglio 2013, con cadenza mensile.

Anche presso il Nodo pre-distribuzione si è riscontrata l'assenza di microrganismi contaminanti e, coerentemente, di (oo)cisti protozoarie. Il presente sito coincide con il punto di prelievo dei campioni utilizzati per l'analisi dei parametri microbiologici classici, in quanto rappresentativo della qualità media dell'acqua distribuita (Tab. 16).

ID	Data	Temp. H ₂ O (°C)	pH	Cond. (µS/cm)*	CMT 22°C	CMT 37°C	coliformi tot.	<i>E. coli</i>	Enterococchi fecali	<i>P. aeruginosa</i>
Valore limite					100 UFC / 1 ml	20 UFC / 1 ml	0 UFC / 100 ml	0 UFC / 100 ml	0 UFC / 100 ml	0 UFC / 250 ml
Nodo pre-distribuzione										
AC-PRE-01	10/07/2012	16,2	6,8	455	0	1	0	0	0	0
AC-PRE-02	01/08/2012	14,7	7,7	465	8	7	0	0	0	0
AC-PRE-03	28/08/2012	14,2	7,9	460	4	5	0	0	0	0
AC-PRE-04	09/10/2012	15,5	7,7	455	5	5	0	0	0	0
AC-PRE-05	15/11/2012	14,6	6,9	450	nd	nd	0	0	0	0
AC-PRE-06	18/12/2012	13,6	7,1	450	2	3	0	0	0	0
AC-PRE-07	21/01/2013	12,6	7,0	465	6	5	0	0	0	0
AC-PRE-08	15/02/2013	12,5	7,2	460	7	8	0	0	0	0
AC-PRE-09	11/03/2013	14,1	6,9	465	2	3	0	0	0	0
AC-PRE-10	14/05/2013	14,4	7,6	455	6	6	0	0	0	0
AC-PRE-11	03/07/2013	15,3	7,5	460	17	16	0	0	0	0

Tab. 16: Profilo microbiologico medio dell'acqua addotta dall'acquedotto padovano. I parametri considerati sono quelli indicati dal D. Lgs. 31/2001 per la qualità delle acque potabili. Il sito da cui si sono prelevati i campioni per le analisi microbiologiche è il Nodo Pre-distribuzione del CIB, in quanto rappresentativo della qualità media dell'acqua poi distribuita. Si tratta del medesimo punto di prelievo utilizzato anche dalla ULSS di competenza per i controlli esterni periodici. * I valori di conducibilità sono stati cortesemente forniti da APS.

8.3.5 Canale Brentella

Il canale Brentella è stato incluso nei siti strategici di monitoraggio della filiera di approvvigionamento di acqua potabile in quanto, in caso di emergenza idrica, esso costituisce un punto di captazione accessorio per l'acquedotto padovano. I campionamenti presso il Brentella sono iniziati nel mese di luglio 2012 e sono terminati nel marzo 2013. La sospensione dell'attività di campionamento presso questo sito è sostanzialmente legata a motivi di carattere pratico: l'impianto di captazione di acqua superficiale non è mai entrato in funzione negli ultimi dieci anni, dal momento che le risorgive dell'Alto Vicentino hanno consentito il pieno soddisfacimento del fabbisogno idrico di Padova e, pertanto, una volta comprovata la costante presenza di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nelle acque del canale, si è preferito indagare più approfonditamente altri siti, più significativi al fine ultimo della ricerca.

In base al profilo microbiologico ottenuto con la determinazione dei parametri richiesti (cfr. 5.5), il Canale Brentella si classifica come corso d'acqua di categoria intermedia tra la A2 e la A3, ovvero potenzialmente idoneo alla potabilizzazione, ma che necessita tassativamente di trattamenti di potabilizzazione sia chimici che fisici (Tab. 17; Tab. 18). Nel presente sito si è riscontrata la presenza di coliformi, sia totali che fecali, di enterococchi fecali e di clostridi solfito-riduttori. La positività di questi parametri va a testimoniare l'avvenuta contaminazione del Brentella da parte di materiale fecale.

La ricerca di *Giardia* e *Cryptosporidium* presso questo sito di campionamento ha dato esito positivo (Tab. 15): il valore medio sui campionamenti eseguiti risulta rispettivamente di 335 cisti/100 L e di 302 oocisti/100 L. E' interessante osservare il grafico temporale dei campionamenti, che riporta le concentrazioni di cisti ed oocisti rilevate mensilmente, in riferimento all'andamento della temperatura del canale (Fig. 46): nonostante il periodo di monitoraggio non includa un intero ciclo stagionale, per i motivi già esposti poco sopra, si può intuire un probabile legame tra la temperatura ambientale e la concentrazione di (oo)cisti individuate nel corpo idrico. Sebbene i livelli inter-campionamento siano alquanto disomogenei, è opportuno notare come, sia per *Giardia* che per *Cryptosporidium*, si siano registrate concentrazioni molto elevate nei mesi invernali di novembre, dicembre e gennaio.

E' verosimile supporre che le basse temperature del corpo idrico registrate in inverno giochino a favore della sopravvivenza delle (oo)cisti nell'ambiente acquatico. Altre spiegazioni potrebbero risiedere in un qualche evento di contaminazione casuale avvenuto a monte del sito di prelievo nel periodo di osservazione del fenomeno, o ancora nella minor portata del canale durante i mesi invernali, la quale comporterebbe un effetto di concentrazione dei microrganismi. Ad ogni modo vedremo più avanti come anche in altri siti di monitoraggio si sia registrata un analogo pattern di concentrazione delle (oo)cisti durante i mesi freddi.

ID	Data	Temp. H ₂ O (°C)	pH	CMT 22°C	CMT 37°C	coliformi tot.	<i>E. coli</i>	Enterococchi fecali	Clostridi solfito riduttori
Canale Brentella									
AC-BRE-01	10/07/2012	25,6	6,8	685	880	10050	350	195	530
Classe qualitativa		non idoneo	A1			A3	A2	A2	

Tab. 17: Analisi microbiologiche delle acque del Canale Brentella. Il corso d'acqua, secondo gli obiettivi di qualità delineati dal D. Lgs. 152/2006, si classifica grossomodo come appartenente ad una categoria intermedia tra la A2 e la A3. Da notare l'elevato valore di temperatura che si è registrato, che è addirittura superiore al valore massimo ammesso dal decreto (25 °C).

Parametro	Unità di misura	Classe A1	Classe A2	Classe A3
pH	Unità di pH	6,5 – 8,5	5,5 – 9,0	5,5 – 9,0
Temperatura	°C	22 (g) – 25 (i)	22 (g) – 25 (i)	22 (g) – 25 (i)
Coliformi totali	UFC / 100 ml	50	5 000	50 000
Coliformi fecali	UFC / 100 ml	20	2 000	20 000
Enterococchi fecali	UFC / 100 ml	20	1 000	10 000

Tab. 18: Le classi di qualità per le acque superficiali destinate alla potabilizzazione, secondo il D. Lgs. 152/2006. Per il parametro Temperatura compaiono un valore guida (g) ed un valore imperativo (i).

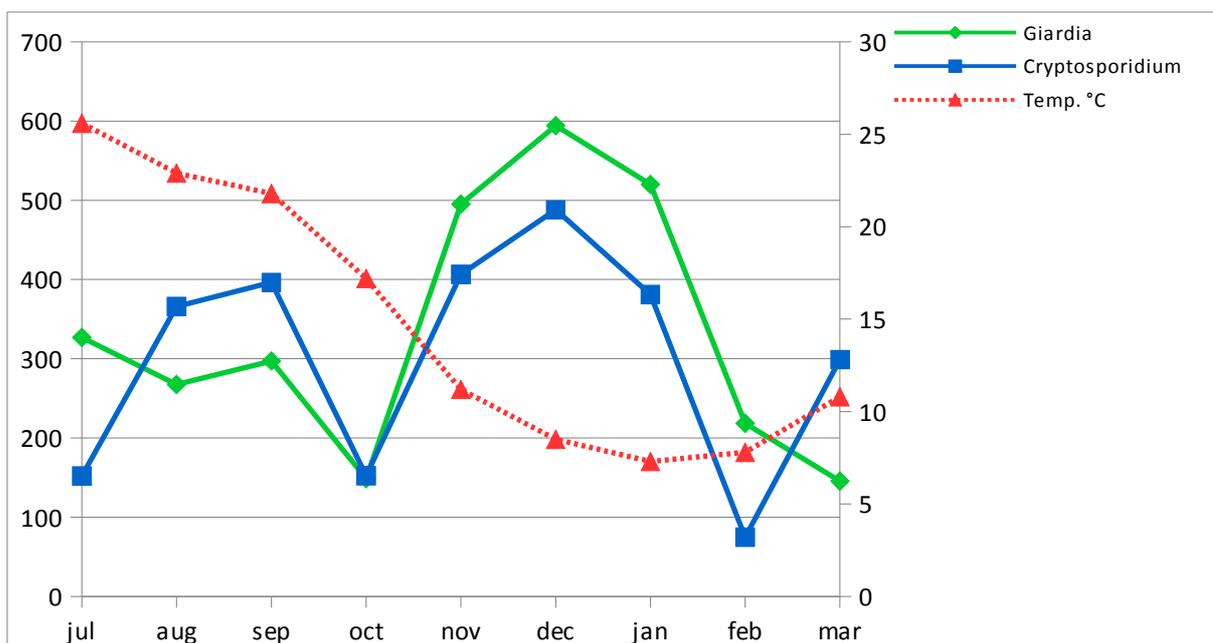


Fig. 46: Concentrazioni di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. rilevate tra Luglio 2012 e Marzo 2013 nel Canale Brentella. Il grafico riporta in ascissa i mesi durante i quali si è protratta l'attività di monitoraggio e in ordinata la concentrazione di cisti (verde) ed oocisti (blu) rilevata su un volume di 100 L. E' presente un asse y secondario, sulla destra del grafico, relativo alla temperatura del corpo idrico, espressa in °C.

8.4 Sistema fognario

I dati raccolti consentono di ottenere una mappatura circa la presenza qualitativa ed in parte quantitativa di *Giardia* e *Cryptosporidium* a livello delle maggiori infrastrutture fognarie della città di Padova, ovvero i collettori zonali e il depuratore principale (Tab. 19). L'indagine è stata vincolata dalla difficoltà operativa di condurre i campionamenti presso i collettori zonali, in quanto, per accedervi, era strettamente necessaria la presenza del personale tecnico APS, società che gestisce il ciclo idrico integrato patavino.

ID	Data	Ora	Temp. H ₂ O (°C)	pH	torbidità	vol. (l)	pellet (ml)	n. vetrini	Giardia spp.			Cryptosporidium spp.		
									cisti / 50 µl	cisti / pellet	cisti / 100 L	oocisti / 50 µl	oocisti / pellet	oocisti / 100 L
Collettore ZIP*														
DEP-ZIP-01	11/03/2013	09.15	12,5	7,2	35,3 FAU	24,0	5	1	18	1800	11144	4	400	2541
DEP-ZIP-02	15/04/2013	08.30	16,2	7,4	144 FAU	12,0	5	1	52	5200	64388	11	1100	13974
DEP-ZIP-03*	17/06/2013	08.30	22,3	7,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DEP-ZIP-04	12/12/2013	08.30	13,5	7,1	146 FAU	40,7	7,4	2	128	18944	69161	19	2812	10532
Collettore Fossetta*														
DEP-FOS-01	11/03/2013	09.00	12,3	7,2	44,7 FAU	20,0	5	1	2	200	1486	5	500	3811
DEP-FOS-02	15/04/2013	08.30	16,2	7,1	41,3 FAU	11,0	5	1	10	1000	13508	17	1700	23559
DEP-FOS-03	17/06/2013	08.30	21,5	7,2	67,5 FAU	34,4	4	2	9,5	760	3283	12,5	1000	4431
DEP-FOS-04	12/12/2013	08.30	11,6	7,3	42,3 FAU	32,3	1,6	2	7	224	1030	2	64	302
Collettore Intervento 10*														
DEP-INT-01	15/04/2013	09.30	15,6	7,5	128 FAU	28,0	2	2	0	0	0	0,5	20	109
DEP-INT-02	17/06/2013	10.15	20,6	7,5	134 FAU	49,8	2,5	2	0	0	0	2	100	306
DEP-INT-03	12/12/2013	09.15	11,4	7,3	32,3 FAU	34,5	4,3	2	0	0	0	6	516	2280
Collettore Forcellini*														
DEP-FOR-01	15/04/2013	10.15	15,8	7,3	218 FAU	45,0	2	2	18	720	2377	6	240	813
DEP-FOR-02	17/06/2013	09.20	22,2	7,5	204 FAU	48,8	4	2	8	640	1949	6,5	520	1624
DEP-INT-03	12/12/2013	09.45	11,6	7,3	11,8 FAU	47,7	2,5	2	4	200	623	2	100	320
Depuratore Ca' Nordio: ingresso linea Centro Storico*														
DEP-IN-01	18/12/2012	09.00	12,7	7,8	215 FAU	23,0	10	1	1	200	1292	7	1400	9279
DEP-IN-02	15/02/2013	09.00	11,1	7,6	214 FAU	22,0	5	2	9,5	950	6416	8	800	5543
DEP-IN-03	11/03/2013	10.00	13,6	7,3	193 FAU	23,7	5	1	15	1500	9404	2	200	1286
DEP-IN-04	13/12/2013	10.00	11,5	7,7	16,3 FAU	32,2	3,8	2	8	608	2806	4	304	1439
Depuratore Ca' Nordio: scarico														
DEP-OUT-01	10/07/2012	12.00	27,0	6,8	11,73 FAU	100	2	2	15,5	620	921	8	320	488
DEP-OUT-02	01/08/2012	11.00	24,9	7,3	15,28 FAU	100	2	2	13	520	773	10	400	610
DEP-OUT-03	28/08/2012	11.15	23,1	7,4	10,91 FAU	70	2	2	12,5	500	1061	14,5	580	1263
DEP-OUT-04	09/10/2012	11.00	19,9	7,6	7,97 FAU	100	5	2	10	1000	1486	2	200	305
DEP-OUT-05	15/11/2012	07.12	15,1	7,3	4,48 FAU	100	5	2	16,5	1650	2452	5,5	550	838
DEP-OUT-06	18/12/2012	09.00	12,0	7,5	1,93 FAU	100	7,5	2	20	3000	4458	9	1350	2058
DEP-OUT-07	21/01/2013	11.30	9,9	7,6	1,56 FAU	100	5	2	17,5	1750	2600	6	600	915
DEP-OUT-08	15/02/2013	11.00	10,2	7,5	0,970 FAU	108	5	2	19	1900	2626	4	400	567
DEP-OUT-09	11/03/2013	10.00	12,7	7,6	0,490 FAU	72	5	2	15,5	1550	3181	11,5	1150	2421
DEP-OUT-10	14/05/2013	10.30	17,9	7,4	8,43 FAU	100	5	2	11	1100	1634	6,5	650	991
DEP-OUT-11	09/07/2013	09.15	24,5	6,9	12,18 FAU	100	2	2	20	800	1189	10	400	610
DEP-OUT-12	26/07/2013	10.45	27,2	7,3	14,20 FAU	90	5	2	4	400	660	2	200	339
DEP-OUT-13	13/12/2013	09.30	12,3	7,0	7,42 FAU	97,1	4,5	2	13	1170	1790	5	450	706

Tab. 19: Dati relativi al monitoraggio del sistema fognario di Padova. I siti considerati sono i collettori zonali Intervento 10, Forcellini, ZIP, e Fossetta, l'ingresso Centro Storico del depuratore di Ca' Nordio e lo scarico del medesimo impianto.

* Per quanto riguarda i campionamenti eseguiti presso i siti contrassegnati da *, si rimanda alla lettura della sezione 7.5, in quanto presso di essi è stata impiegata la metodica di filtrazione modificata FCPsed, in relazione alla diversa tipologia di matrice idrica da analizzare (refluo fognario). ° Il campione del collettore ZIP che doveva essere effettuato in data 17/06/2013 non è stato prelevato in quanto, al momento della procedura, è stata rinvenuta una spessa crosta di natura prevalentemente grasso-oleosa che copriva l'intera superficie del collettore fognario, rendendola inaccessibile.

Il campionamento presso i collettori prevede la stombinatura delle coperture di accesso alle condotte fognarie, che scorrono nel sottosuolo a diversi metri di profondità. Per i suddetti motivi, la periodicità dei campionamenti è stata vincolata alla disponibilità del personale APS, che pure ha cortesemente acconsentito ai campionamenti ogni qual volta possibile. Per quanto riguarda i quattro collettori fognari e l'ingresso della linea centro storico presso Ca' Nordio, i dati sono troppo ad ora pochi per poter condurre un'analisi con carattere stagionale, ma pur risultano estremamente significativi circa la presenza qualitativa, zona per zona, di *Giardia* e *Cryptosporidium*. Il monitoraggio dell'uscita comune del depuratore di Ca' Nordio, per contro, si è protratto per un anno intero e consente di discutere più approfonditamente le dinamiche stagionali della presenza di (oo)cisti nel refluo.

8.4.1 Collettore ZIP

Il collettore ZIP serve l'area Zona industriale-Granze-Camin. Anch'esso, come il Fossetta, transita per l'impianto di sollevamento di C.so Stati Uniti, prima di arrivare a Ca' Nordio. Il sopralluogo preliminare condotto presso il varco di accesso del collettore ZIP ha rivelato una complicità operativa non indifferente: l'intera superficie della vasca sotterranea era ricoperta da una spessa crosta di natura grasso-oleosa giallognola. Il personale tecnico di APS suppone che tale materiale possa provenire dalle numerose cucine industriali presenti nei dintorni, evidentemente non dotate di un serbatoio per la disoleazione locale delle acque grigie. Prima di procedere con il campionamento del sito, è stato pertanto necessario attendere l'intervento manutentivo di un'autobotte aspirante. Il campionamento è stato in seguito condotto nei mesi di marzo e aprile 2013, ma già nel mese di maggio la ricomparsa della crosta ha reso impossibile il prelievo del campione. Un ultimo campionamento è stato condotto nel mese di dicembre 2013, in seguito alla nuova rimozione dello strato di materiale di accumulo.

Presso questo sito si è rilevata la più alta concentrazione di cisti di *Giardia* di tutta la rete di monitoraggio. La massima concentrazione di cisti di *Giardia* si è registrata nel mese di dicembre (69 161 cisti / 100 L), mentre la concentrazione più elevata di oocisti di *Cryptosporidium* è relativa al mese di aprile (13 974 oocisti / 100 L), ma risulta inferiore al massimo assoluto, registrato presso il Fossetta.

8.4.2 Collettore Fossetta

Il collettore Fossetta conferisce il refluo dell'area Nord e dell'area Ovest di Padova presso l'impianto di sollevamento di C.so Stati Uniti, presso il quale si congiunge con la linea proveniente dalla ZIP, Camin e Granze. Il refluo condottato dal Fossetta è di tipo misto: le acque nere sono commiste sia a quelle meteoriche che ai contributi provenienti dagli scoli collaterali del Canale Brentella e da alcune diramazioni minori del Bacchiglione, e.g. Fossa Bastioni. I campionamenti effettuati presso il collettore Fossetta sono stati condotti nei mesi di marzo, aprile, giugno e dicembre 2013. L'analisi dei campioni ha sempre dato esito positivo circa la presenza di *Giardia* e *Cryptosporidium*, con un valore medio di 6 092 cisti / 100 L e

di 10 600 oocisti / 100 L. Nel mese di aprile va però segnalato un picco di concentrazione, che ha assunto i rispettivi valori di 13 508 cisti / 100 L e di 23 559 oocisti / 100 L. Il valore relativo alle oocisti del coccidio è per altro il massimo assoluto rilevato lungo tutta la rete di monitoraggio. Si ricorda l'elevata piovosità che ha caratterizzato il mese di aprile 2013, arrivando nel Nord-est ai 150 mm di precipitazioni, contro una media mensile storica inferiore ai 100 mm (Arpav, 2012; CPC, 2013). A tal proposito si rammenta l'effetto di dilavamento del suolo da parte delle precipitazioni atmosferiche quale elemento facilitatore della contaminazione protozoaria delle risorse idriche superficiali (Karanis, 2007; Baldursson and Karanis, 2011).

8.4.3 *Collettore Intervento 10*

Il collettore fognario denominato Intervento 10 riunisce il refluo proveniente dalla zona sud del Centro Storico (Quattro Martiri e aree limitrofe) e presso via Canestrini si riunisce con la linea proveniente da Centro Storico propriamente detto. I dati ottenuti dai campionamenti effettuati presso questo sito si sono dimostrati particolarmente interessanti: sono gli unici, per quanto riguarda il monitoraggio del sistema fognario, ad aver sempre restituito negatività per *Giardia*. La concentrazione media delle oocisti di *Cryptosporidium* si è altresì attestata su valore nettamente più basso rispetto a tutti gli altri punti di campionamento, ovvero pari a 207 oocisti / 100 L. Si ricordi a proposito come per il Canale Brentella, sito esterno al sistema fognario, fosse stata determinata una concentrazione media di circa 300 oocisti / 100 L. Peculiarità dell'area servita dall'Intervento 10 è la ridotta presenza di aree verdi, o comunque non cementate, e l'assenza di scoli e canalizzazioni che apportino contributi idrici alla rete fognaria.

8.4.4 *Collettore Forcellini*

Il collettore Forcellini, simmetricamente all'Intervento 10, raccoglie il refluo fognario della porzione orientale del Centro Storico (S. Gregorio, Forcellini e Terranegra) e lo immette nel collettore principale della linea Centro Storico all'altezza di via Canestrini. Presso il collettore Forcellini si è riscontrata positività sia per *Giardia* che per *Cryptosporidium*, con le rispettive concentrazioni medie di 2 163 cisti / 100 L e di 1 219 oocisti / 100 L.

8.4.5 *Depuratore Ca' Nordio: ingresso*

Il campionamento presso l'ingresso della linea Centro Storico del depuratore di Ca' Nordio consente la valutazione del contributo congiunto dei tre collettori Intervento 10, Forcellini e Centro Storico, che si fondono poco a monte dell'ingresso nell'impianto. Si ricorda come vi sia un'altra linea in ingresso a Ca' Nordio, composta dai reflui di Fossetta e ZIP, ma che essa non è direttamente accessibile all'interno del perimetro del depuratore. L'ingresso Centro Storico ha restituito costante positività per entrambi i protozoi, con le rispettive

concentrazioni medie di 5 704 cisti / 100 L e di 5 369 oocisti / 100 L.

8.4.6 Depuratore Ca' Nordio: effluente

L'impianto di Ca' Nordio è dotato di uno scarico unico per il refluo depurato, il quale va ad immettersi nel Canale Scaricatore, poco più a valle del Ponte dei Sabbionari. La portata complessiva trattata giornalmente a Ca' Nordio, fornita da APS per il periodo 2012-2013, è pari a 54 000 m³ e risulta nello scarico di circa 600 litri di effluente al secondo. Per quanto riguarda i limiti di legge circa i parametri chimico-fisici e microbiologici, il controllo di routine viene condotto da APS stessa, al fine di garantire il rispetto delle concentrazioni e delle cariche microbiche richieste prima della re-immissione nell'ambiente del refluo trattato. Nello specifico, per quanto riguarda gli indicatori batteriologici si richiede una concentrazione di coliformi totali inferiore alle 5 000 UFC / 100 ml (D. Lgs. 152/2006 e D.G. Regione Veneto 2267/2007). Le analisi microbiologiche condotte contestualmente alla ricerca delle (oo)cisti protozoarie (Tab. 20), confermano che il Depuratore di Ca' Nordio si mantiene abbondantemente al di sotto di tale valore soglia, presentando una concentrazione di coliformi fecali nell'effluente pari a 2 200 UFC / 100 mL.

ID	Data	Temp. H ₂ O (°C)	pH	CMT 22°C	CMT 37°C	coliformi tot.	<i>E. coli</i>	Enterococchi fecali	Clostridi solfito riduttori
Depuratore Ca' Nordio: scarico									
DEP-OUT-01	10/07/2012	27,0	6,8	705	800	2200	10	5	5800

Tab. 20: Analisi microbiologiche dell'effluente di Ca' Nordio. La normativa prevede come unico parametro normato i coliformi totali, che non devono superare le 5 000 UFC / 100 mL.

Il campionamento per la ricerca di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. presso questo sito è stato condotto mensilmente dal mese di luglio 2012 al mese di agosto 2013. Nel caso contingente è stato possibile effettuare una valutazione circa l'eventuale andamento stagionale delle concentrazioni di (oo)cisti nel refluo, come emerge dal grafico sotto riportato (Fig. 47). L'andamento delle concentrazioni registrato per *Giardia* e per *Cryptosporidium* non è per nulla regolare. Pur tuttavia esso sembra subire un incremento nei mesi freddi, ovvero tra novembre e febbraio, in modo analogo a quanto osservato per il Canale Brentella. Sebbene le concentrazioni rilevate mensilmente seguano un andamento disomogeneo, si registra un certo parallelismo tra il pattern di *Giardia* e quello di *Cryptosporidium*. Nel mese di aprile 2014 si nota inoltre un picco per entrambi i protozoi che, nel caso del coccidio, mostra una concentrazione addirittura superiore ai massimi invernali. Si ricorda l'analogo fenomeno, sempre attinente al medesimo mese, per i campioni provenienti dal collettore Fossetta e dal collettore ZIP.

Si è infine stimato il potere di abbattimento dell'impianto di biotattamento di Ca' Nordio per quanto riguarda l'eliminazione delle (oo)cisti protozoarie dal refluo. Tale stima ha preso in considerazione le portate medie dei collettori afferenti (ZIP = 100 l/s; Fossetta = 200

l/s; Centro Storico = 300 l/s) e quella dello scarico del depuratore (600 l/s), così da stimare il numero medio di (oo)cisti addotte dai diversi affluenti fognari e di rapportarlo al numero medio di (oo)cisti ancora presenti nell'effluente (Tab. 21). L'abbattimento percentuale così calcolato è risultato pari all'86.5 % per *Giardia* e pari al 72.6 % per *Cryptosporidium*.

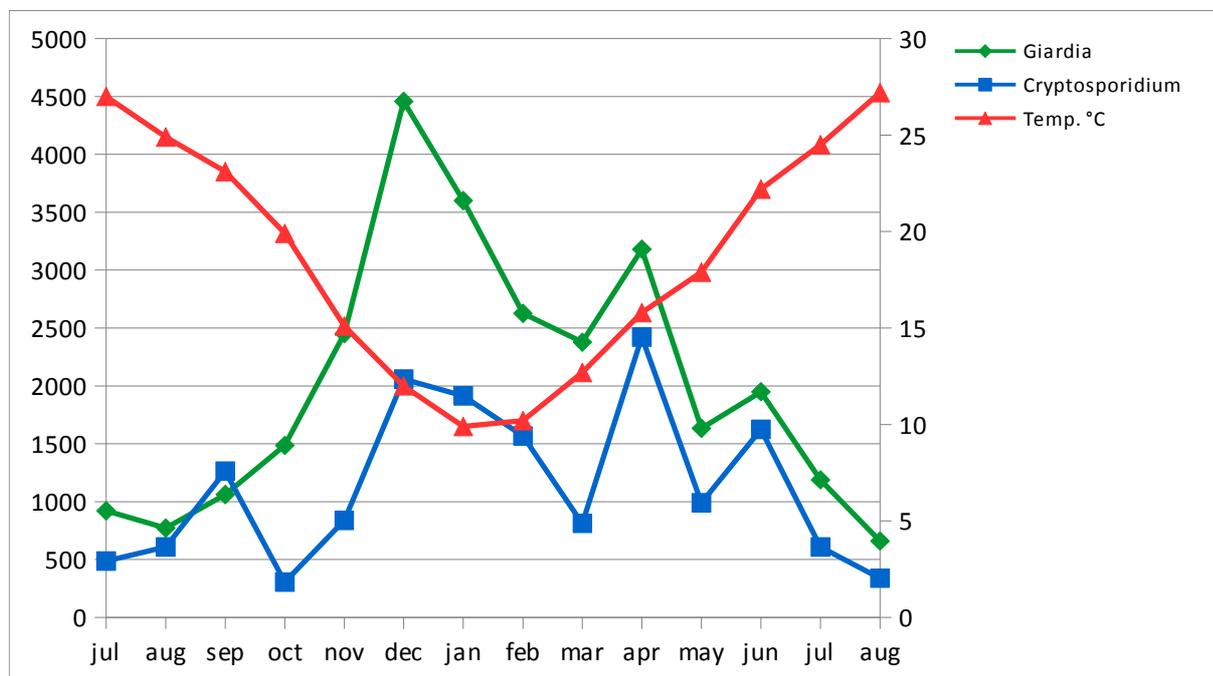


Fig. 47: Concentrazioni di *Giardia* e *Cryptosporidium* rilevate tra Luglio 2012 ed Agosto 2013 presso l'uscita comune del depuratore di Ca' Nordio. Il grafico riporta in ascissa i mesi durante i quali si è protratta l'attività di monitoraggio e in ordinata la concentrazione di cisti (verde) ed oocisti (blu) rilevata, su volumi di 100 L. E' presente un asse y secondario, sulla destra del grafico, relativo alla temperatura del refluo in uscita (rosso), espressa in °C.

Sito	Giardia / 100 L	Crypto / 100 L	portata (L/s)	cisti addotte /s	oocisti addotte /s
Affluente ZIP	69161	10532	100	69161	10532
Affluente Fossetta	1030	302	200	2060	604
Affluente Centro Storico	2806	1439	300	8418	4317
Tot. Addotto				79639	15453
Effluente	1790	706	600	10740	4236

Tab. 21: Contributo dei singoli collettori afferenti all'adduzione di (oo)cisti protozoarie. Tali valori, pesati con la portata del singolo collettore, vengono confrontati con le (oo)cisti poi rinvenute nell'effluente trattato del depuratore.

8.5 Corpo idrico recettore

Il monitoraggio del Bacchiglione vuole valutare l'eventuale contributo contaminante dell'effluente di Ca' Nordio sul corpo idrico recettore. Il Bacchiglione si classifica come corpo idrico appartenente alla classe di qualità microbiologica A2 (Arpav, 2008). Si ricorda come i parametri normati per le acque superficiali siano esclusivamente di tipo fisico-chimico e batteriologico, ma che ad oggi non viene contemplato alcun parametro inerente la carica

parassitologica. Il rischio è che i trattamenti operati presso l'impianto di Ca' Nordio siano sufficienti per quanto riguarda i contaminanti microbiologici classici, ma non per l'abbattimento delle (oo)cisti protozoarie. L'impianto di depurazione, pur essendo caratterizzato da un elevato potere di abbattimento delle (oo)cisti (cfr. 8.4.6), rappresenta un punto critico di immissione nel copro idrico di una matrice idrica allogena contenente forme di resistenza protozoarie. Il basso corso del Bacchiglione non è adibito alla captazione per la produzione di acqua potabile, ma pur tuttavia esso sfocia congiuntamente al fiume Brenta, nei pressi di un'estesa area marino-costiera balneabile, il litorale di Chioggia-Sottomarina. Come riportato in letteratura (Karanis, 2007; Baldursson and Karanis, 2011), si identifica una seconda modalità di trasmissione di giardiasi e criptosporidiosi, che prevede l'infezione per ingestione *involontaria* di acqua contaminata: ciò avviene accidentalmente durante la balneazione in acque infette. Da qui, l'importanza di valutare l'eventuale presenza dei protozoi lungo il corso del fiume e, successivamente, la loro persistenza nelle acque marine del litorale costiero. Ciascuna serie di campionamenti presso i siti di monitoraggio del Bacchiglione è sempre stata condotta nel medesimo giorno, partendo dal sito più a monte e fino ad arrivare alle aree balneabili (Tab. 22).

ID	Data	Ora	Temp. H ₂ O (°C)	pH	torbidità	Cond. (µS/cm)	vol. (l)	pellet (ml)	n. vetrini	Giardia spp.			Cryptosporidium spp.		
										cisti / 50 µl	cisti / pellet	cisti / 100 L	oocisti / 50 µl	oocisti / pellet	oocisti / 100 L
Ponte dei Sabbionari															
BAC-SAB-01	09/07/2013	10.00	22,9	7,6	0.77 FAU	-	100	5	2	0	0	0	0	0	0
BAC-SAB-02	26/07/2013	9.15	25,1	7,1	42.50 FAU	474	130	5,5	1	1	110	126	2	220	258
Lungargine Donati															
BAC-PSN-01*	09/07/2013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BAC-PSN-02	26/07/2013	10.00	26	7,4	10.40 FAU	612	110	5,5	1	3	330	446	2	220	305
Ponte di Bovolenta															
BAC-BOV-01	09/07/2013	12.30	24,4	7,3	4.57 FAU	-	100	5	2	1,5	150	223	2,5	250	381
BAC-BOV-02	26/07/2013	11.50	26,2	7,6	1.29 FAU	510	120	5	1	4	400	495	2	200	254
Ca' Bianca															
BAC-CAB-01	09/07/2013	13.20	32,8	8,2	14.70 FAU	-	100	5	2	0,5	50	74	0	0	0
BAC-CAB-02	26/07/2013	13.30	35,8	8,1	17.70 FAU	901	100	5	1	0	0	0	0	0	0
Foce															
BAC-FOC-01	09/07/2013	14.00	27,2	8,1	18.40 FAU	-	100	5	2	1	100	149	0	0	0
BAC-FOC-02	26/07/2013	14.45	31,6	7,9	23.80 FAU	7110	100	4,5	1	0	0	0	1	90	137

Tab. 22: Il monitoraggio del basso corso del Bacchiglione ha restituito i dati riportati in tabella. I siti considerati sono: Ponte dei Sabbionari (a monte dello scarico del depuratore di Ca' Nordio); Lungargine Donati (a valle di suddetto scarico); Ponte di Bovolenta (intermedio tra Padova e la foce); Ca' Bianca (a monte della confluenza tra Bacchiglione e Brenta) ed infine la Foce (foce congiunta del sistema fluviale Brenta-Bacchiglione).

*Il campione del Lungargine Donati del 09/07/2013 non è stato effettuato in quanto la vegetazione incolta e la ripida pendenza del punto di discesa all'alveo fluviale non hanno consentito un accesso sicuro al punto di campionamento.

8.5.1 Ponte dei Sabbionari

Il Ponte dei Sabbionari rappresenta il sito di riferimento per il monitoraggio fluviale del Bacchiglione. Posto qualche centinaia di metri a monte dello scarico unico del depuratore di Ca' Nordio, esso rappresenta un punto strategico di facile accesso. Valutare la presenza di (oo)cisti presso questo sito è strettamente necessario per poter poi inferire qualche supposizione sui risultati derivanti dai campionamenti effettuati più a valle e sull'eventuale

influenza dello scarico fognario sulla qualità del corpo recettore.

Le concentrazioni medie ottenute per *Giardia* e *Cryptosporidium* sono le seguenti: 63 cisti / 100 L e 129 oocisti / 100 L. Esse in un certo senso si possono dire rappresentative del profilo che il Bacchiglione possiede prima di subire l'influenza dello scarico del depuratore.

8.5.2 *Lungargine Donati*

Si tratta del primo punto accessibile a valle di Ca' Nordio. Esso si colloca sulla sponda sinistra del fiume, nei pressi del Lungargine Donati. Le concentrazioni medie rilevate sono rispettivamente di 446 cisti / 100 L e di 305 oocisti / 100 L. La totalità dei campionamenti ha riportato presso questo sito una concentrazione maggiore sia di *Giardia* che di *Cryptosporidium* rispetto alle medie del Ponte dei Sabbionari, suggerendo o un possibile effetto locale dell'effluente di Ca' Nordio, o un contributo del Canale San Gregorio che si immette nello Scaricatore poco più a monte del sito di prelievo.

8.5.3 *Ponte di Bovolenta*

Bovolenta si colloca approssimativamente a metà strada tra Padova e la foce del Bacchiglione. Il campionamento viene eseguito sulla sponda sinistra, alla base di un ponte carrabile. Si è sempre riscontrata la positività, sia per *Giardia* che per *Cryptosporidium*, con le concentrazioni medie di 359 cisti / 100 L e 318 (oo)cisti / 100 L. Tali concentrazioni risultano di nuovo maggiori rispetto a quelle di riferimento, dettate dal sito del Ponte dei Sabbionari.

8.5.4 *Ca' Bianca*

Ca' Bianca è una località sita circa due chilometri a monte della confluenza tra Bacchiglione e Brenta. L'alveo del fiume in questo tratto è piuttosto largo e la corrente estremamente lenta, tanto che, ripetutamente, in occasione dei campionamenti è stato riscontrato un moto retrogrado delle acque. Altra caratteristica è l'aumento di conducibilità che si registra presso questo sito (cuneo salino): la prossimità del mare è forse imputabile a valori mediamente più alti (901 $\mu\text{S}/\text{cm}$) rispetto ai punti di monitoraggio dislocati a monte (< 612 $\mu\text{S}/\text{cm}$). L'analisi dei campioni prelevati presso Ca' Bianca ha riscontrato negatività per *Cryptosporidium* e una media di 37 cisti / 100 L per *Giardia*, decisamente inferiore ai valori registrati presso i siti precedenti.

8.5.5 *Foce*

La foce comune di Bacchiglione e Brenta risulta essere forse un sito meno significativo dei precedenti, in quanto l'influenza della notevole portata del fiume Brenta va ad alterare pesantemente il profilo dell'acqua trasportata dal Bacchiglione. Ad ogni modo il prelievo dei campioni è stato effettuato sulla sponda destra, ipotizzando che la commistione tra i due fiumi

risultasse in qualche misura minore sull'argine meridionale, prosieguo dell'alveo originale del Bacchiglione. I valori di conducibilità presso la foce appaiono certamente influenzati dall'acqua di mare (7.1 mS/cm). E' interessante vedere come presso questo sito i dati restituiscano nuovamente positività sia per *Giardia* (75 cisti / 100 L) che per *Cryptosporidium* (69 oocisti / 100 L). Da notare che, come precisato in 2.1.3., poco più a monte del sito di campionamento (~1 km), si riversa lo scarico del depuratore di Val da Rio, ovvero l'impianto di depurazione da 160 000 AE che serve il Comune di Chioggia. L'effluente dell'impianto viene scaricato nel bacino lagunare, ma un canale mette in comunicazione diretta le acque recettrici con l'alveo fluviale.

8.6 Aree balneabili marino-costiere

Il litorale di Chioggia-Sottomarina è un continuum di spiagge sabbiose, pubbliche e private, che si affacciano sul mare Adriatico. La tanto discussa qualità delle acque marine della zona è in realtà periodicamente monitorata da Arpav, sia dal punto di vista chimico-fisico che microbiologico, ma ancora una volta tra i parametri elencati dalla normativa non figurano né protozoi, né parassiti idrotrasmessi di altra natura. Le due spiagge prese in considerazione, in qualità di punti terminali della rete di monitoraggio della filiera idrica integrata di Padova, sono quelle di Isolaverde e di Brondolo. Nel mese di Agosto 2013 si è provveduto inoltre ad eseguire anche la determinazione del profilo microbiologico classico, in riferimento a quanto prescritto dalla Direttiva 2006/7/CE, recepita con il D.M. 30 marzo 2010 del Ministero della Salute, che stabilisce i requisiti qualitativi per la balneabilità delle acque marino-costiere.

8.6.1 Spiaggia di Isolaverde

La spiaggia pubblica di Isolaverde si estende sulla destra della foce del Brenta-Bacchiglione, in direzione sud. Una diga digitiforme separa la spiaggia dalla foce per alcune centinaia di metri, ma anche in figura è ben visibile il gioco di correnti che deriva dall'incontro tra acqua dolce e acqua salmastra. Da notare la vicinanza alla spiaggia di un'altra foce fluviale, quella dell'Adige, posta poco più a sud. Sito oramai caratterizzato da valori di conducibilità prettamente tipici dell'acqua marina (31.8 mS/cm), è risultato negativo per quanto riguarda la presenza di (oo)cisti protozoarie su volumi di 100 L (Tab. 23). In aggiunta, oltre alla ben nota ricerca parassitologica, si è proceduto anche con la determinazione del profilo batteriologico. La tabella sottostante riporta i risultati di tali analisi (Tab. 24) che vanno a classificare l'acqua di Isolaverde come di eccellente qualità microbiologica ai fini della balneazione.

8.6.2 Spiaggia di Brondolo

La spiaggia di Brondolo, sita a nord della foce del Brenta-Bacchiglione, è uno stabilimento privato ad uso esclusivo dei campeggiatori del camping Oasi. Anch'essa è separata dalla foce mediante una lunga diga di scogli. Come già riscontrato per Isolaverde, anche qui ovviamente

si rilevano valori di conducibilità caratteristicamente marini (36.5 mS/cm) e la totale assenza di *Giardia* e *Cryptosporidium* su 100 L (Tab. 23). La tabella sottostante (Tab. 24) riporta i risultati relativi all'analisi batteriologica effettuata anche presso questo sito.

ID	Data	Ora	Temp. H ₂ O (°C)	pH	torbidità	Cond. (µS/cm)	vol. (l)	pellet (ml)	n. vetrini	<i>Giardia</i> spp.			<i>Cryptosporidium</i> spp.		
										cisti / 50 µl	cisti / pellet	cisti / 100 L	oocisti / 50 µl	oocisti / pellet	oocisti / 100 L
Isolaverde															
BAC-ISV-01	02/08/2013	10.00	27	7,9	0.0 FAU	31800	200	4,1	2	0	0	0	0	0	0
Brondolo															
BAC-SOT-01	02/08/2013	11.00	28,4	7,6	0.0 FAU	36500	100	4	2	0	0	0	0	0	0

Tab. 23: Il monitoraggio delle acque marino-costiere delle aree balneabili dislocate nei pressi della foce fluviale del Brenta-Bacchiglione è stato miratamente effettuato durante la stagione estiva. I risultati ottenuti per il sito delle spiagge di Isolaverde e di Brondolo sono riportati in tabella.

Parametro	Unità	Isolaverde	Brondolo
Conta microbica totale 22°C	UFC/1 ml	150	140
Conta microbica totale 37°C	UFC/1 ml	80	90
Coliformi totali	UFC/100 ml	2800	1110
Coliformi fecali (<i>E. coli</i>)	UFC/100 ml	9	13
Enterococchi fecali	UFC/100 ml	0	0
Clostridi	UFC/100 ml	>200	172

Tab. 24: Profilo batteriologico delle acque di Isolaverde e Brondolo. Il DM 31 marzo 2010 del ministero della Salute e la Direttiva 2006/7/CE in realtà contemplano unicamente la determinazione di *Escherichia coli* e dei coliformi fecali (nel testo definiti *intestinali*), pertanto la tabella riporta in neretto le righe corrispondenti a tali parametri e in base ai quali viene attribuito il giudizio di qualità.

8.7 Quadro d'insieme

Nel suo complesso la filiera idrica integrata che serve la città di Padova si trova a disporre di una fonte di captazione caratterizzata da un elevatissimo profilo qualitativo idrico. A differenza di molte altre aree urbane che dipendono da fonti di acqua superficiale, anche nello stesso Veneto, il territorio di Padova può contare su una matrice idrica di falda che, dal punto di vista microbiologico, è di qualità davvero superlativa. I rischi di contaminazione sono estremamente ridotti e ancor di più minimizzati da una clorazione preventiva che tutela l'acqua non solo durante il tragitto tra Villaverla e la città patavina, ma anche nel corso della sua distribuzione alle diverse utenze.

A livello della filiera di captazione-adduzione-distribuzione dell'acqua potabile non è mai stata riscontrata la presenza di *Giardia* spp. e di *Cryptosporidium* spp. Coerentemente, la consultazione dei dati regionali relativi alle notifiche di casi di giardiasi e criptosporidiosi nel padovano non riporta alcun evento di carattere epidemico, ma solo pochi e isolati casi d'infezione da parte di *Giardia duodenalis* e addirittura nessun caso di criptosporidiosi durante gli ultimi quattro anni. I dati sono stati cortesemente forniti dal Servizio Promozione e

Sviluppo Igiene e Sanità Pubblica della Regione Veneto (Tab. 25; Fig. 48). Va pur ricordato che entrambe le infezioni possono presentarsi in forma asintomatica, ma data la ripetuta negatività dei campioni di acqua potabile analizzati, congiuntamente al supporto dei dati epidemiologici ufficiali, non dà motivo di pensare che la popolazione sia interessata all'ingestione di (oo)cisti protozoarie tramite assunzione dell'acqua distribuita dall'acquedotto. L'unica criticità da tenere in considerazione è relativa all'eventuale utilizzo del Canale Brentella qual fonte di captazione sussidiaria.

ULSS		2010	2011	2012	2013
Prov. Belluno		3	1	0	2
01	Belluno	3	0	0	0
02	Feltre	0	1	0	2
Prov. Vicenza		1	0	0	2
04	Alto Vicentino	0	0	0	1
06	Vicenza	1	0	0	1
Prov. Treviso		2	0	1	0
08	Asolo	1	0	0	0
09	Treviso	1	0	1	0
Prov. Venezia		1	0	0	1
12	Venezia	0	0	0	1
13	Mirano	1	0	0	0
Prov. Padova		2	2	1	1
15	Alta Padovana	2	1	0	0
16	Padova	0	1	1	1
Prov. Verona		2	4	5	1
20	Verona	0	1	2	0
21	Legnago	0	1	0	0
22	Bussolengo	2	2	3	1
Tot.		11	7	7	7

Tab. 25: La tabella riporta, per ciascuna ULSS notificante, i casi di giardiasi verificatesi nei rispettivi territori di competenza tra il 2010 ed il 2013 (i dati sono aggiornati al mese di dicembre 2013). Nello stesso periodo non si sono verificati casi di criptosporidiosi. Per quanto riguarda il territorio padovano si riscontrano solamente 1-2 casi all'anno, incompatibili con eventi di carattere epidemico.

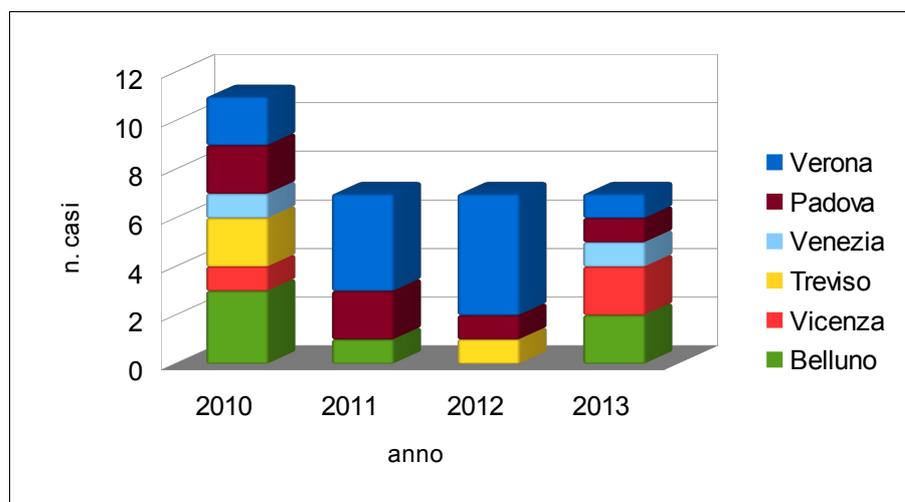


Fig. 48: Casi di giardiasi nel Veneto nel periodo 2010-2013, suddivisi per provincia. I casi notificati sono pochi e relativi ad infezioni sporadiche.

Il Brentella, risultato positivo sia per *Giardia* che per *Cryptosporidium*, potrebbe infatti essere impiegato per la produzione di acqua potabile in caso di grave emergenza idrica o di interruzione temporanea delle linee di adduzione che provengono dall'Alto Vicentino. In tal caso si dovrebbe considerare che la sola clorazione, attualmente operata con set-point pari a 0.15 ppm, non sarebbe sufficiente a debellare le (oo)cisti protozoarie. La positività riscontrata sia per *Giardia* che per *Cryptosporidium* dei campioni prelevati lungo il sistema fognario, in un primo momento è risultata contraddittoria con la comprovata negatività della filiera dell'acqua potabile. In altre parole non è stato immediato giustificare la presenza dei due protozoi nei reflui fognari, partendo dal presupposto che essi, trasmessi lungo la via oro-fecale, avrebbero dovuto provenire unicamente dalle feci dei cittadini padovani, che per contro non assumono acqua contaminata e non sviluppano né giardiasi né criptosporidiosi.

L'approfondimento delle caratteristiche infrastrutturali del complesso sistema fognario che serve la città ha però consentito di avanzare alcune ipotesi circa l'effettiva provenienza delle (oo)cisti. Innanzitutto si ricorda come la metodica impiegata, la FCP, consenta la detezione dei generi *Giardia* e *Cryptosporidium*, ma non delle sole specie patogene per l'uomo *G. duodenalis* e *C. parvum*. Detto questo, considerando l'elevato grado di commistione tra acque nere e acque superficiali provenienti da canali, rogge, scoli che si rinvergono in tutta l'area urbana e peri-urbana, è lecito supporre che la contaminazione del refluo avvenga prevalentemente tramite le feci di animali infetti, che fungono da serbatoio per la diffusione dei due protozoi. Non è da escludere che un contributo notevole possa essere apportato anche dagli animali domestici. Si nota una certa disomogeneità tra le cariche di (oo)cisti addotte dai diversi affluenti dei collettori zonali: il collettore ZIP apporta in media la maggior quantità di protozoi, seguito dal Fossetta e dal Forcellini.

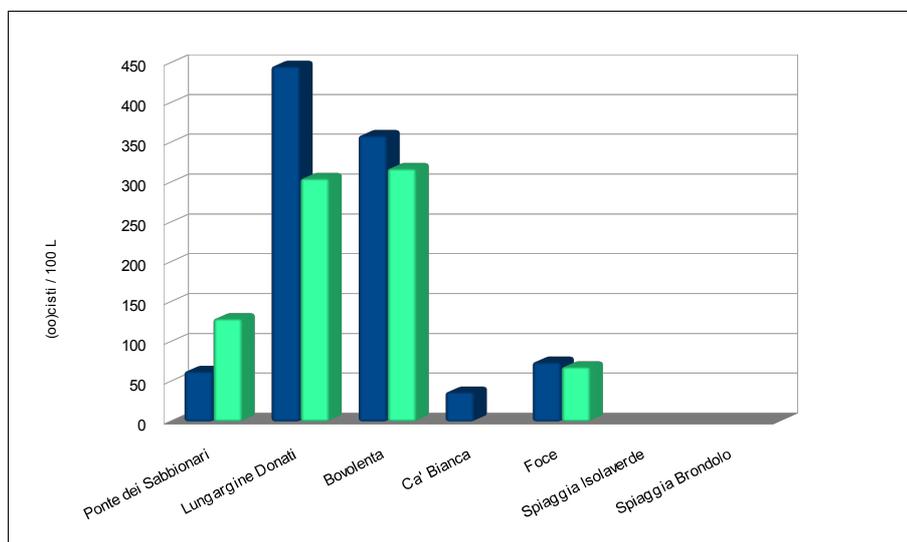


Fig. 49: Andamento delle concentrazioni di *Giardia* (blu) e *Cryptosporidium* (verde) lungo il corso del Bacchiglione. Il Ponte dei Sabbionari rappresenta il controllo, in quanto sito a monte dello scarico dell'effluente depurato dall'impianto di Ca' Nordio. Si nota una progressiva diminuzione della carica di entrambi i protozoi, fino alla loro scomparsa nelle acque di mare di Isolaverde e Brondolo. Come discusso nel testo, l'innalzamento rilevato presso la Foce è forse da ricondursi a contributi di contaminazione locali.

Per contro, il collettore Intervento 10 presenta negatività per *Giardia* e valori alquanto contenuti di oocisti di *Cryptosporidium*, forse in relazione ad un sistema infrastrutturale di più recente realizzazione o alla minor presenza nell'area di aree verdi non pavimentate.

Al fine di delucidare l'incognita che riguarda l'effettiva provenienza delle (oo)cisti protozoarie, i campioni prelevati nel mese di Dicembre 2013, oltre al processamento analitico canonico, sono stati altresì tipizzati mediante PCR presso il Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, nel tentativo di caratterizzare a livello di specie, e non soltanto di genere, i protozoi rinvenuti. In contraddizione apparente con quanto osservato in immunofluorescenza, la metodica molecolare ha restituito negatività, sia per *Giardia duodenalis* che per *Cryptosporidium parvum*, di tutti i campioni tranne quello relativo al Collettore ZIP, il quale risulta positivo per la sola *G. duodenalis*. Tali risultati possono essere letti con due distinte interpretazioni. La prima considera l'assoluta specificità della metodica di PCR a livello di specie: se i campioni risultano negativi, le (oo)cisti rinvenute probabilmente appartengono ad altre specie di *Giardia* e di *Cryptosporidium*, diverse dalla *duodenalis* e dal *parvum*, che non vengono riconosciute dai primer di amplificazione. La seconda ipotesi contempla invece il limite di sensibilità della metodica e di conseguenza è imputabile alle basse concentrazioni di (oo)cisti rinvenute nei campioni. Qualora le unità genomiche di *Giardia* e di *Cryptosporidium* fossero infatti troppo poche, la PCR non potrebbe avere esito positivo. A tal proposito si consideri che l'unico campione amplificato con successo è di fatto quello che, in immunofluorescenza, presenta la concentrazione di cisti di *Giardia* più elevata (256 cisti / 100 µl). Ad ora, sta di fatto che il tentativo di tipizzazione molecolare non consente di addurre informazioni aggiuntive a quanto già emerso dall'attività di monitoraggio canonica.

Per quanto riguarda poi il Bacchiglione, corpo idrico recettore dell'effluente di Ca' Nordio, si vede come esso sia caratterizzato da una presenza endogena di (oo)cisti protozoarie, come mostrato dai campioni prelevati presso il Ponte dei Sabbionari, ovvero a monte dello scarico del depuratore fognario. Nonostante il potere di abbattimento dei trattamenti depurativi operati vada a ridurre drasticamente la carica protozoaria (cfr. 8.4.6), ancora si rinvencono (oo)cisti nell'effluente di Ca' Nordio. L'effetto reale sulla qualità del corpo idrico recettore risulta di difficile quantificazione, ma viene suggerito un effetto locale di innalzamento delle concentrazioni di (oo)cisti protozoarie, che pure scompare mano a mano che si segue il decorso fluviale (Fig. 49). La spiegazione dell'anomalia riscontrata presso la foce, che vede un nuovo incremento della carica di *Giardia* e di *Cryptosporidium*, va ricercata o nella presenza del vicino depuratore di Val da Rio o nel contributo dei numerosi canali di irrigazione che si confluiscono in quella zona.

Da ultimo, la balneazione nelle aree marino-costiere prospicienti la foce del sistema fluviale non sembra comportare rischi significativi per la popolazione, data la negatività dei campioni prelevati presso tali siti.

9. Risultati III – Database GCDB e Indice IRCPRI

9.1 Giardiasis and Cryptosporidiosis database

Il GCDB copre ad ora il periodo 1954 – 2012 e, per quanto riguarda i DWO, include 104 casi di giardiasi e 77 di criptosporidiosi, mentre per i RWO consta di 21 casi di giardiasi e 149 di criptosporidiosi. Il database viene fornito in formato Excel nel cd-rom allegato ed è liberamente consultabile e modificabile.

9.2 Indice di Rischio di Contaminazione Protozoaria delle Risorse Idropotabili

L'interfaccia di calcolo dell'indice IRCPRI è disponibile nel cd-rom che si presenta in allegato: selezionando i vari parametri, il valore dell'indice per un determinato contesto simulato viene calcolato in automatico. A scopo dimostrativo, si riportano i valori assunti volendo stimare il rischio a cui è soggetto l'acquedotto di Padova (Tab. 26). Il valore dell'IRCPRI per il contesto in questione è pari a 3.29. Il rischio è relativamente basso, se si considera che il valore massimo assumibile dall'indice è pari a 10. Tale stima del rischio è perfettamente concorde con quanto suggerito dal monitoraggio eseguito lungo l'intera filiera.

C1 – Water source		values	3
Water source	groundwater		0,21
water typology	well		0,26

C2 – Infrastructure O&M		values	2
Water source protection	yes		0,00
Disinfection treatment	yes (chlorination)		0,65
system integrity	yes		0,00

C3 – Detrimental factors		values	1
animal presence	no		0,00
heavy rainfall	no		0,00
irrigation with wastewater	no		0,00

C4 – Land use		values	1
wilderness	yes		0,46
urban	no		0,00
rural	no		0,00

IRCPRI			3,29
---------------	--	--	-------------

Tab. 26: Calcolo dell'IRCPRI per la filiera di approvvigionamento idrico di Padova. La tabella riporta le quattro categorie fattoriali su cui si basa l'indice (C1 – C4) e le relative variabili. A ciascuna viene assegnato un determinato coefficiente di peso, poi utilizzato nel computo del valore dell'IRCPRI.

10. Discussione

10.1 Confronto con la bibliografia nazionale e internazionale

Il concetto di gestione unitaria delle filiera idriche, ovvero la coordinazione ed il controllo di quella complessa catena di infrastrutture e servizi che comprende sia l'approvvigionamento di acqua potabile che l'allontanamento ed il successivo trattamento del refluo urbano, è un concetto relativamente recente. In Italia i primi accenni a tale modalità di gestione olistica della filiera risalgono all'emanazione della Legge Galli (L. n° 36 del 05/01/1994) e vengono definitivamente consolidati con il Testo Unico Ambientale (D. Lgs. 152/2006). Il controllo analitico periodico della qualità chimico-fisica e microbiologica dell'acqua erogata, nonché il corrispettivo profilo del refluo depurato, viene di norma condotto dal Gestore Unico che ha in appalto la filiera integrata, fatta eccezione per i controlli di verifica occasionali che vengono invece eseguiti dalle autorità sanitarie competenti, nel caso dell'acqua potabile, o da enti esterni di controllo, per quanto riguarda i vincoli di scarico nell'ambiente.

Al di fuori dell'Unione Europea, la quale per altro va annoverata tra i principali promotori di un pionieristico progetto per la gestione concertata delle risorse idriche nell'ambito urbano (*Integrated Urban Water Management* - IUWM), la filosofia del servizio idrico integrato è in realtà ancora poco diffusa (Global Water Partnership, 2012). Come possibile conseguenza della limitata adozione di questo tipo di approccio, in letteratura sono assai pochi gli studi che prevedono un monitoraggio, parimenti integrato, dell'intera filiera: la quasi totalità dei lavori pubblicati riguarda piuttosto un'analisi di tipo settoriale e alquanto frammentaria. Per altro, gli unici studi rinvenuti in bibliografia dedicati all'attività di controllo integrata (Tomar, 1999; UN-Water, 2013) focalizzano rispettivamente sull'aspetto ecologico e quello prettamente economico-gestionale.

In questo contesto si può dunque sottolineare il carattere innovativo dell'attività di monitoraggio seguita nel corso del presente progetto di ricerca, che è stata per l'appunto condotta non solo indagando la filiera idrica di Padova nel suo insieme, ma anche estendendo il controllo analitico fino ai confini della sfera di influenza ecologica che la reimmissione dell'effluente depurato nel corpo idrico recettore, il fiume Bacchiglione, esercita sull'ambiente. Il modello di monitoraggio olistico implementato, oltre ai dati di presenza e persistenza dei due protozoi indagati, fornisce dunque indirettamente anche informazioni circa l'efficienza dei trattamenti operati e la qualità intrinseca delle infrastrutture. La filiera idrica integrata ideale dovrebbe di per sé consistere in un sistema *a flusso controllato*, nel quale oltre alla matrice in ingresso (punto di captazione) e a quella in uscita (effluente del depuratore), il bilancio dei contributi ambientali dovrebbe risultare pressoché nullo o comunque non influente sulla qualità della matrice trasportata. Si è visto come questo non avvenga nel caso della filiera di Padova, dove l'alto grado di anastomizzazione della rete fognaria con canali consortili, rogge e scolli, adduca di fatto nelle condotte di rete nera un importante quantitativo

di acque meteoriche, di dilavamento e di irrigazione che veicola contaminanti altrimenti estranei a quelli propri della matrice fognaria. Le (oo)cisti di *Giardia* spp. e di *Cryptosporidium* spp. rientrano per l'appunto in questa categoria di xeno-contaminanti che per lo più non sembrano derivare da eventi di inquinamento fecale umano, quanto piuttosto da quelli zoonotici. Essi comportano una presenza endemica dei due protozoi nelle acque superficiali della rete idrografica patavina, che si vanno in seguito a mescolare con le portate addotte dalla rete fognaria.

I lavori dedicati alla presenza di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. in Italia sono pochi. I primi studi pubblicati sull'argomento possiedono un carattere prettamente clinico-epidemiologico (Brandonisio et al., 1996; 1999; Ballone et al., 2001) e, per quanto riguarda le finalità del presente progetto, altro non rivelano se non l'accertata presenza di entrambi i protozoi sul territorio nazionale.

Nessuno studio è stato ad ora pubblicato circa la presenza delle (oo)cisti protozoarie nelle acque potabili, forse per una ridotta sensibilità degli stessi gestori del servizio idrico, il cui supporto risulta d'altra parte irrinunciabile, nei confronti di parametri microbiologici non ancora contemplati dalla normativa. Gli unici ambiti indagati risultano essere quelli delle acque superficiali, dei reflui e delle piscine, ma condotti sempre in modo frammentario e disomogeneo. Sicuramente si può asserire che la probabilità di detezione di *Giardia* e *Cryptosporidium* nelle acque potabili dipenda in larga misura dalla qualità intrinseca delle stesse e quindi essenzialmente dalla tipologia di acqua captata per l'uso ed il consumo umano.

Per quanto riguarda le acque superficiali potenzialmente destinabili alla captazione, gli unici studi reperibili, condotti dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), riguardano la ricerca dei due protozoi nel fiume Tevere (Bonadonna et al., 2004) e in alcuni siti del territorio palermitano (Di Benedetto et al., 2005). Il primo lavoro presenta risultati circa la presenza di *Giardia* e *Cryptosporidium* nel fiume Tevere, presso il sito di Fiumicino-Isola Sacra, grossomodo in linea con quelli ottenuti dal monitoraggio fluviale condotto nel territorio padovano sul canale Brentella. Anche i campioni del Tevere, risultati sempre positivi per cisti ed oocisti, rivelano concentrazioni moderatamente più alte nel periodo invernale, nonostante esse risultino in media inferiori a quelle del Brentella (Tevere: 290-300 cisti/L e 90-190 oocisti/L vs. Brentella 335 cisti/100 L e 302 oocisti/100 L). A tal proposito vanno però considerate sia le diverse caratteristiche eco-idrologiche dei due corpi idrici, sia l'impiego di metodi analitici diversi, ciascuno caratterizzato da una propria efficienza di recupero e di detezione. Altro dato interessante fornito dal medesimo lavoro (Bonadonna et al., 2004) è la totale assenza di correlazione tra l'andamento delle concentrazioni protozoarie e quello di altri parametri batteriologici ad oggi contemplati dalla normativa.

Lo studio condotto nel palermitano (Di Benedetto et al., 2005) evidenzia poi come la concentrazione di *Giardia* e di *Cryptosporidium* raggiunga un picco in primavera, con valori massimi relativi in coincidenza di abbondanti precipitazioni, probabilmente per effetto del dilavamento ambientale. Nel caso del monitoraggio della filiera patavina è stato registrato un analogo picco, ma durante la stagione invernale. Per il sito di Ca' Nordio si è per altro individuato un picco di concentrazioni proprio nel mese di Aprile 2013, interessato in modo

analogo da un intenso periodo di piogge.

Per quanto riguarda la ricerca di *Giardia* e *Cryptosporidium* nei reflui, troviamo un interessante lavoro (Carraro et al., 2000) che va a valutare l'eventuale impatto dello scarico del depuratore fognario principale di Torino sul corpo idrico recettore, il fiume Po. Il depuratore in questione, analogamente a Ca' Nordio, non risulta influire in modo palese e significativo sulla qualità dell'acqua del corso fluviale recettore, almeno per quanto riguarda la contaminazione con (oo)cisti protozoarie.

Sempre un'indagine condotta dall'ISS (Bonadonna et al., 2001) va poi a valutare, mediante un'accurata analisi multivariata, l'eventuale correlazione tra *Cryptosporidium* ed altri parametri indicatori, ma ancora una volta non viene identificato alcun predittore utile.

Un'ulteriore considerazione estrapolabile dai risultati ottenuti dal monitoraggio del sistema fognario di Padova riguarda sottolineare come le concentrazioni di (oo)cisti risultino più elevate nel periodo di tardo autunno ed invernale, coerentemente a quanto riportato altrove (Cacciò et al., 2003).

Per quanto riguarda la contrazione di giardiasi e criptosporidiosi in seguito a balneazione in acque infette, si riscontra come in Italia le piscine costituiscano l'unico esempio di acque ad uso balneare e ricreativo indagato circa la presenza di *Giardia* e *Cryptosporidium* (Bonadonna et al., 2004; Briancesco and Bonadonna, 2005). I lavori inerenti questa tematica sembrano per altro ispirati ai numerosi report redatti negli Stati Uniti in merito a casi di giardiasi e criptosporidiosi contratte dai frequentatori di alcuni *water-parks* e *swimming pools*. Tali lavori hanno riportato alcuni campioni positivi, nonostante l'impiego di cloro come agente disinfettante e la piena regolarità dei valori assunti dagli indicatori batteriologici classici, ma mai casi diagnosticati e conclamati di infezioni parassitiche, né a carico del singolo bagnante, né tanto meno a livello di gruppi esposti.

Per quanto riguarda il panorama internazionale, sono emerse alcune divergenze tra quanto suggerito dai dati raccolti per la filiera idrica padovana e risultati analoghi provenienti da studi condotti altrove, e.g. America del Nord, Gran Bretagna e Oceania. Anche i dati riportati dai sopracitati lavori relativi alla presenza di *Giardia* e *Cryptosporidium* in Italia (Carraro et al., 2000; Cacciò et al., 2003; Bonadonna et al., 2004; Briancesco and Bonadonna, 2005; Di Benedetto et al., 2005; Giangaspero et al., 2007) sembrano confermare tali discrepanze.

In primo luogo è emerso che a Padova, ma più genericamente in Italia, le concentrazioni relative alle cisti di *Giardia* spp. sono sempre maggiori rispetto a quelle delle oocisti di *Cryptosporidium*: nel Regno Unito, Canada e Stati Uniti si riscontra l'opposto, ovvero una netta preponderanza di *Cryptosporidium*. A tutti gli effetti sembra che il territorio nazionale presenti un quadro d'insieme assai diverso dagli altri paesi *notificanti*. Sicuramente l'assenza di una rete di sorveglianza dedicata e di un sistema di notifica concertato, a livello nazionale, vanno a limitare pesantemente la comprensione del carico di malattia effettivo di cui due protozoi enteropatogeni sono responsabili. Per chiarire definitivamente la questione bisognerebbe andare oltre la realizzazione di studi di carattere locale: sarebbe piuttosto opportuno condurre uno studio di carattere olistico che comprenda l'analisi dei diversi fattori

geo-climatici (latitudine, precipitazioni annue, irraggiamento solare, etc.), idrologici (tipologia differenziale delle fonti per l'approvvigionamento idrico, etc.), ma anche dell'ecologia del paesaggio (utilizzo del suolo, interazioni tra fattori antropici e ambiente, etc.) e dell'ecologia urbana (fauna sinantropa e selvatica, adeguatezza infrastrutturale, etc.).

10.2 Alcune considerazioni circa i metodi analitici

Per quanto riguarda l'aspetto analitico, si ritiene che l'impiego dell'immunofluorescenza diretta su preparati ottenuti mediante filtrazione, eluizione e concentrazione dei campioni sia di fatto un idoneo compromesso per l'esecuzione di controlli periodici. La metodica FCP e la sua variante FCPsed costituiscono dei protocolli versatili e robusti, che risultano compatibili sia con le difficoltà operative proprie dell'attività di monitoraggio ambientale sul campo, sia con il raggiungimento di un soddisfacente livello di sensibilità e di specificità di deteazione dei due protozoi indagati. Per quanto riguarda i costi, andando a considerare i materiali di consumo necessari (matrice filtrante, reagenti, anticorpi FITC-coniugati), si va incontro ad una spesa per campione alquanto contenuta, che risulta sicuramente competitiva nei confronti di altre metodiche alternative, incluse quelle molecolari (cfr. 1.7).

Per contro, si evidenzia un limite intrinseco della metodica FCP, legato al processo biotecnologico di produzione degli anticorpi monoclonali utilizzati per la marcatura delle (oo)cisti. Essi, originariamente sviluppati per uso clinico, si sono infatti rivelati specifici a livello di genere, ma non di specie. Di fatto vengono marcate cisti ed oocisti protozoarie non solo di *Giardia duodenalis* e a *Cryptosporidium parvum*, ma anche quelle di specie diverse, non patogene, appartenenti agli stessi generi, e.g. *G. agilis* e *C. muris*.

E' stato inoltrato un breve questionario ad alcune delle principali aziende produttrici di anticorpi monoclonali FITC-coniugati per la deteazione in immunofluorescenza di *Giardia* e di *Cryptosporidium*, con il fine di indagare la reale specificità degli anticorpi prodotti, che spesso viene descritta in modo ambiguo nella scheda tecnica, ma da tutte si è ricevuta conferma che lo sviluppo del prodotto, essendo validato secondo i criteri la diagnostica clinica, non contempli prove di cross-reattività nei confronti delle altre specie appartenenti allo stesso genere (Tab. 27).

Sta di fatto che l'impiego dell'IF diretta per la marcatura di campioni ottenuti da matrici ambientali, nelle quali a differenza dei campioni clinici non è aprioristicamente sicuro rinvenire *G. duodenalis* e *C. parvum*, fornisce informazioni circa l'avvenuta contaminazione da parte di materiale fecale di animali serbatoio per una qualche specie appartenente ai generi *Giardia* e *Cryptosporidium*, ma non consente l'identificazione univoca di specie protozoarie patogene per l'uomo.

10.3 Conclusioni e prospettive preliminari

Per quanto riguarda l'attività di monitoraggio della filiera idrica integrata in esame, si è visto come essa abbia portato all'identificazione di diverse criticità, alcune attese o comunque prevedibili, ed altre ancora contornate da un alone di indeterminatezza che offrono però interessanti spunti di riflessione per condurre ulteriori indagini.

Il quadro generale che descrive la filiera idrica integrata di Padova, alla luce di quanto emerso dalla presente ricerca si può riassumere descrivendo i differenti segmenti sistemici indagati. Per quanto riguarda la filiera di approvvigionamento dell'acqua potabile, si è avuta conferma che la fonte di captazione a cui attinge l'acquedotto patavino è di qualità superlativa: i pozzi dell'Oasi di Villaverla costituiscono una risorsa protetta e sicura, caratterizzata da un rischio di contaminazione microbiologica e parassitologica assai basso. La strategia operante è infatti quella di tutelare non solo la qualità intrinseca dell'acquifero, ma anche quella dell'ambiente circostante. Le tre condotte adibite all'adduzione idrica si sono poi rivelate strutturalmente idonee e sicure per il trasporto dell'acqua dall'Alto Vicentino a Padova. L'ottimo stato di manutenzione delle linee riduce al minimo il rischio di contaminazione microbiologica durante il tragitto sotterraneo, che pure viene ulteriormente ridotto mediante un trattamento preventivo di disinfezione. Tra le tre condotte di adduzione, la Canaletta a pelo libero è la più antica e teoricamente la più esposta al rischio di contaminazione per percolamento, in quanto in essa l'acqua scorre per semplice gravimetria e non in pressione. Ad ogni modo essa di fatto assolve il suo compito in modo ottimale e trasporta fino al CIB acqua di ottima qualità. In sintesi, si può affermare che il rischio di contrarre giardiasi e/o criptosporidiosi per la popolazione servita dall'acquedotto è pressoché nullo (IRCPRI = 3.29), data la costante assenza non solo dei protozoi, ma di qualsiasi indicatore di contaminazione fecale, durante l'intero periodo di monitoraggio analitico.

Giardia e *Cryptosporidium* sono per contro presenti a livello dell'intero sistema fognario, che comprende le canalizzazioni di allontanamento del refluo e l'impianto di depurazione di Ca' Nordio. Non essendo mai stati notificati eventi di carattere epidemico di giardiasi o criptosporidiosi, la presenza delle (oo)cisti dei due protozoi nel refluo non sembra pertanto essere riconducibile all'immissione in fognatura di feci umane infette. L'elevato grado di commistione delle acque nere con le acque provenienti da scoli, rogge e canali agricoli lascia pertanto supporre che la provenienza delle (oo)cisti sia prevalentemente, se non addirittura esclusivamente, di origine animale. Il corpo idrico recettore dell'effluente fognario, il Bacchiglione, non sembra risentire in particolar modo dell'apporto addotto dal depuratore di Padova, se non a livello locale, ovvero in stretta prossimità dello scarico dell'impianto di depurazione.

Infine, per quanto riguarda le aree marino-costiere adibite alla balneazione nei pressi della foce del corpo idrico recettore, il rischio di contrarre giardiasi e/o criptosporidiosi durante la balneazione in seguito all'ingestione involontaria di acqua marina infetta, è risultato praticamente nullo, in quanto non si è mai rilevata la presenza di (oo)cisti nelle acque prospicienti gli stabilimenti balneari considerati.

Oltre ai risultati ottenuti dal monitoraggio della filiera idrica di Padova ed alle loro implicazioni dirette, dalla ricerca emergono alcuni spunti che sarebbe alquanto interessante approfondire nel contesto di future attività. Innanzitutto sarebbe opportuno elaborare delle linee guida, da proporre come integrazione alle normative vigenti, che stabiliscano le concentrazioni massime ammissibili di (oo)cisti rispettivamente nelle acque destinate all'uso ed al consumo umano, nei reflui trattati e nelle acque adibite alla balneazione. L'inserimento di parametri indicatori di tipo protozoario emerge come strettamente necessario, specialmente vista la comprovata e già discussa assenza di correlazione tra la presenza di *Giardia* e *Cryptosporidium* spp. ed il livello dei parametri indicatori propri della batteriologia classica, i.e. coliformi, *E. coli*, clostridi ed enterococchi. A tal proposito si segnala l'introduzione nel Regno Unito di un limite di riferimento per *Cryptosporidium* nelle acque da potabilizzare pari ad 1 oocisti / 10 L (Foundation for Water Research, 2006).

Più in generale, si propone di considerare appositi valori limite a seconda della specifica destinazione funzionale dell'acqua. Per quanto riguarda l'acqua potabile, ad esempio, considerando che la dose infettiva per entrambi i protozoi è di circa 10 (oo)cisti (cfr. 1.3.3 e 1.4.3) e che l'assunzione giornaliera di acqua raccomandata per un uomo adulto è di circa 3 L (Meinders and Meinders, 2010), il limite imperativo dovrà essere inferiore alle 10 (oo)cisti / 3 L, ovvero non più di 3 (oo)cisti / L. Tuttavia, un limite cautelativo appropriato dovrebbe esigere l'assenza di (oo)cisti in un litro, analogamente a quanto si richiede, ad esempio, per i batteri coliformi o per gli enterococchi nell'ambito della batteriologia. Nel caso delle acque adibite alla balneazione bisogna invece tener da conto, oltre alla dose infettiva, del quantitativo di acqua accidentalmente ingerita dai bagnanti durante le attività ricreative acquatiche. Si stima che, nel corso di un'ora di bagno, il quantitativo di acqua ingerito dai bambini sia in media pari a 37 ml, mentre per gli adulti esso sia di circa 16 ml (Dufour et al., 2006). Si possono dunque stimare un limite imperativo che preveda una concentrazione inferiore alle 10 (oo)cisti / 37 ml (270 (oo)cisti / L) ed un limite cautelativo di 100 (oo)cisti / L.

L'istituzione di un database informatico a livello internazionale, sul modello del GCDB, potrebbe poi consentire un'uniformazione dei dati ad oggi pubblicati come *case-report* indipendenti, con il vantaggio di rendere possibile una valutazione ed una caratterizzazione numerica del rischio più accurate. L'applicazione dell'indice IRCPRI a livello delle filiere idriche viene suggerita contestualmente proprio per ottenere sia una valutazione preliminare dell'esposizione della popolazione, che una caratterizzazione parametrica del rischio di contaminazione protozoaria delle risorse idriche addotte.

In aggiunta, una criticità che andrebbe indagata in modo dedicato è la capacità di sopravvivenza delle (oo)cisti nell'acqua di mare: la totalità degli outbreak di giardiasi e criptosporidiosi riportati nella letteratura internazionale, contratte in seguito a balneazione, è infatti relativa ad eventi intercorsi unicamente in acque dolci contaminate (i.e. fiumi, laghi, piscine, parchi acquatici) (cfr. 2.5). Per quanto riguarda il contesto italiano, caratterizzato da una preponderanza di aree marino-costiere adibite alla balneazione, si propone di condurre uno studio mirato alla valutazione della sopravvivenza delle (oo)cisti nelle acque marine. I

lavori ad ora reperibili che hanno cercato di delucidare tale argomento sono pochi, datati e riportanti opinioni discordi (Fayer et al., 1998; Brown et al., 1999).

Da ultimo, si questiona l'effettiva significatività che le metodiche analitiche ad oggi in uso, sia quelle reperite in bibliografia che quelle implementate contestualmente al presente progetto di ricerca, sono in grado di fornire. Da un lato si collocano le metodiche, quali ad esempio la detezone in immunofluorescenza, che consentono un'identificazione a livello di genere, ma non di specie. Dall'altro troviamo le metodiche, per lo più molecolari, che vanno a tipizzare le (oo)cisti a livello di specie e di sotto-specie, ma che richiedono un processamento preliminare dei campioni molto più complesso e non sempre forniscono un dato di tipo quantitativo. Se si assume una prospettiva legata all'ecologia ambientale dei due protozoi si è portati a considerare la questione come un problema di secondaria importanza, ma questo approccio non è assolutamente adottabile se si considerano gli aspetti di salute pubblica strettamente interconnessi alla patogenicità degli stessi, posseduta soltanto da determinate specie.

Considerando quanto esposto, gli approcci alternativi perseguibili identificati sono sostanzialmente due. Il primo prevede un avanzamento a livello analitico: la direzione sembra quella dell'implementazione di metodiche molecolari basate su protocolli combinati di multiplex- e rtq-PCR, in modo da ottenere discriminazione a livello di microrganismo, di specie, di sotto-specie (i.e. i diversi *assemblaggi* di *Giardia duodenalis*), unitamente ad informazioni di tipo quantitativo. In alternativa, si potrebbe mirare ad un approccio semplificato che si limiti a stabilire delle linee guida circa la massima concentrazione ammissibile di (oo)cisti nelle acque che considerino i generi *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. alla stregua di parametri indicatori con valenza generica, paragonabili ad esempio alla categoria ed alla significatività dei coliformi totali.

In conclusione, considerando quanto emerso dall'investigazione delle dinamiche di contaminazione e di persistenza dei patogeni emergenti *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium parvum* nelle filiere idriche integrate, viene d'obbligo ribadire l'importanza dell'adozione di un metodo di indagine interdisciplinare ed olistico, capace di superare i limiti degli approcci settorialisti ed in grado di correlare trasversalmente fattori che, in apparenza, paiono indipendenti.

11. Bibliografia

- Adam, R.D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical microbiology reviews*, 14(3):447-475.
- Aguilar-Díaz, H., Carrero, J.C., Argüello-García, R., Lacleste, J.P., Morales-Montor J. 2011. Cyst and encystment in protozoan parasites: Optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? *Trends in Parasitology* 27(10): 450-8.
- Ajeegah, G. 2007. Enumeration of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. (oo)cysts in a tropical eutrophic lake. *International Journal of Environmental Science and Technology* 4(2): 223-32.
- Aldom, J. E. and Chagla, A.H. 1995. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. *Lett. Appl. Microbiol.* 20:186–187.
- Alexander, L.C., Niebel, M., Jones, B. 2013. The rapid detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in clinical stools using the Quik Chek immunoassay. *Parasitol Int*, 62(6):552-3.
- Alexeieff, A. 1914. Notes protistologiques: VIII - Sur la revision des genres de l'ordre *Polymastigina*, Blochmann. *Zool Anz* 44:193-213.
- Almeida, A. 2010. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in drinking water samples in the North of Portugal. *Korean Journal of Parasitology* 48(1):43.
- Alonso, J.L. 2011. Development and evaluation of a real-time PCR assay for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage samples. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89(4):1203.
- Altissimo, L., Dal Prà, A., Scaltriti, G. 1999. Relazione conclusiva. Osservatorio interprovinciale per la tutela delle falde acquifere, Vicenza.
- Amoros, I., Alonso, J.L.; Cuesta, G. 2010. *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts on Salad Products Irrigated with Contaminated Water. *Journal of food Protection* 6(3):1138-1140.
- Angus, K.W., Hutchison, G., Munro, H.M.C. 1985. Infectivity of a strain of *Cryptosporidium* found in the guinea-pig (*Cavia porcellus*) for guinea-pigs, mice and lambs. *Journal of comparative pathology*, 95(2):151-165.
- Ankarklev, J., Jerlston-Hultqvist J., Ringqvist, E., Troell, K., Svard, S.G. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature reviews, Microbiology* 8:413-422.
- Arpav. 2008. Indagine per l'individuazione dei requisiti delle acque idonee all'irrigazione di colture alimentari. Rapporto Tecnico. Electronic document available at: www.arpa.veneto.it/temi-ambientali (URL last accessed on 20.10.013).
- Arpav. 2012. Indicatori ambientali – Precipitazione annua. Online database available at: www.arpa.veneto.it (URL last accessed on 11.10.2013)
- Atherton, F., Newman, C.P.S. and Casemore, D.P. 1995. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis associated with a public water supply in the UK. *Epidemiology and Infection*, 115 (1):123-31.
- Baldursson, S. and Karanis, P. 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites. Review of worldwide outbreaks: an update 2004-2010. *Water Res*, 45(20):6603.
- Ballone, E., Fazii, P., Riario Sforza, G., Scassa, E., Di Nicola, M., Ippolito, N., Di Mascio, C., Schioppa, F. 2001. Indagine sulla diffusione della giardiosi nell'area pescarese. *Ann Ig* 13:111-120.
- Baque, R.H. 2011. A real-time RT-PCR method to detect viable giardia lamblia cysts in environmental waters. *Water Research* 45 (10): 3175-84.
- Barwick R.S., Levy D.A., Craun G.F., Beach M.J., Calderon R.L. 2000. Surveillance for waterborne-disease outbreaks: United States 1997–1998. *Morbidity Mortality Wkly Rep Surveill Summ*, 49(4):1–35.
- Berselli, G. 1868. Il cholera in Padova nell'anno 1867. Relazione letta all'Accademia di Scienze, lettere ed arti in Padova nella tornata 19 Genajo 1868 e pubblicata a cura della Giunta Municipale. Penada, Padova.
- Betancourt, W.Q. 2002. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: A review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *Journal of Microbiological Methods*, 49(3):209-24.
- Betancourt, W.Q. 2008. Waterborne enteric protozoan parasites: Concentration and detection methods. *Interciencia* 33, (6): 418-23.
- Betancourt, W.Q., Querales, L., Sulbaran, Y.F., Rodriguez-Diaz, J., Caraballo, L. and Pujol, F.H. 2010. Molecular characterization of sewage-borne pathogens and detection of sewage markers in an urban stream in Caracas, Venezuela. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (6): 2023-6.
- Bonadonna, L., Briancesco, R., Ottaviani, M., Veschetti, E. 2002. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts

- in sewage effluents and correlation with microbial, chemical and physical water variables. *Environmental Monitoring and Assessment* 75:241–252.
- Bonadonna, L., Briancesco, R., Ottaviani, M., Veschetti, E. 2002. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and correlation with microbial, chemical and physical water variables. *Environ Monit Assess*, 75:241–252.
 - Bonadonna, L., R. Briancesco, D. Donia, M. Ottaviani, E. Veschetti, and M. Divizia. 2004. Hygienic aspects of the Tiber river: Presence of pathogenic protozoa and correlation with microbiological and physico-chemical parameters | Aspetti igienico-sanitari delle acque del fiume Tevere: Presenza di protozoi patogeni e rapporti di correlazione con parametri microbiologici e chimico-fisici. *Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità* 16 (1-2): 273-80.
 - Bonadonna, L., Briancesco, R., Magini, V., Orsini, M., Romano-Spica, V. 2004. A preliminary investigation on the occurrence of protozoa in swimming pools in Italy. *Ann Ig*, 16:709–719.
 - Bonadonna, L., Briancesco, R., Lacchetti, I., Paradiso, R., Petrinca, A.R., Gabrieli, R., Cencioni, B., Divizia, M. 2006. Protozoi e virus in matrici ambientali con particolare riguardo alla valutazione dei rischi igienico-sanitari legati al riutilizzo delle acque reflue. *Atti del Convegno “Riutilizzo Irriguo di acque reflue depurate”*, Verona, 11.02.2006.
 - Bonollo S.r.l. 2006. Aggiornamento Piano d’Ambito ATO Bacchiglione: Relazione sul sistema fognario di Padova. E-document available at: www.atobacchiglione.it (URL last accessed on 21.04.2013).
 - Boscolo C. and Mion, F. 2008. Le acque sotterranee della pianura veneta. I risultati del progetto SAMPAS. Grafiche Brenta, Limena (PD), Italy.
 - Brandonisio, O., Marangi, A., Panaro, M.A., Marzio, R., Natalicchio, M.I., Zizzadoro, P., De Santis, U. 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* in children with enteritis in southern Italy. *Eur J Epidemiol*, 12:187–190.
 - Brandonisio, O., Maggi, P., Panaro, M.A., Lisi, S., Andriola, A., Acquafredda, A., Angarano, G. 1999. Intestinal protozoa in HIV-infected patients in Apulia, South Italy. *Epidemiol Infect*, 123:457–462.
 - Brandonisio, O., Portincasa, F., Torchetti, G., Lacarpia, N., Rizzi, A., Fumarola, L., Donadio, F., Carnimeo, D. 2000. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water: evaluation of two concentration methods and occurrence in wastewater. *Parassitologia*, 42:205–209.
 - Brandonisio, O., Fumarola, L., Spinelli, R., Donadio, F., Montemurro, P., Portincasa, F. 2004. *Giardia* e *Cryptosporidium* spp.: rassegna critica e monitoraggio in acque superficiali e reflue. *Ig Mod*, 122:137–160.
 - Brandonisio, O., Lonigro, A., Lacasella, V., Cavallo, P., Berrilli, F., Di Cave, D., Cirillo, R., Marangi, M., Giangaspero, A. 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* in treated municipal wastewater and water courses flowing into the Varano Lagoon (Italy) and in shellfish harvested in the same environment. Proc. II Int Congress on *Giardia* and *Cryptosporidium*, Morales (Mexico), 13-18.05.2007.
 - Briancesco, R. and Bonadonna, L. 2005. An Italian study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, fresh water and treated water. *Environ Monit Assess*, 104:445–457.
 - Bridgman, S.A., Robertson, R.M., Syed, Q., Speed, N., Andrews, N. & Hunter, P.R. 1995. Outbreak of cryptosporidiosis associated with a disinfected groundwater supply. *Epidemiol. Infect.* 115:555–566.
 - Broglia, A. and Kapel, C. 2011. Changing dietary habits in a changing world: Emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses. *Veterinary Parasitology* 182(1):2-13.
 - Brown, T.J. et al. 1999. The viability of *Giardia intestinalis* and *Giardia muris* cysts in seawater. *International Journal of Environmental Health Research*, 9:2.
 - Cacciò, S.M. 2003. Molecular techniques to detect and identify protozoan parasites in the environment. *Acta Microbiologica Polonica*, 52:23-34.
 - Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Aulicino, F.A., Pozio, E. 2003. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Appl Environ Microbiol*, 69:3393–3398.
 - Caprioli, A., Pezzella, C., Morelli, R., Giammanco, A., Arista, S., Crotti, D., Facchini, M., Guglielmetti, P., Piersimoni, C., Luzzi, I. 1996. Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy. *Pediatr Infect Dis J*, 15:876–883.
 - Caravello, G.U. 1997. Il sistema fognario. In AA.VV. Padova e le sue acque. Comune di Padova, Assessorato all’Ambiente, Padova, Italy.
 - Carraro, E., Fea, E., Salva, S., Gilli, G. 2000. Impact of a wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in surface water. *Water Sci Technol*, 41:31–37.
 - Cevenini, R., Varoli, O., Rumpianesi, F., Mazzaracchio, R., Nanetti, A., La Placa, M. 1985. A two-year longitudinal study on the etiology of acute diarrhea in young children in Northern Italy. *Microbiologica*,

- Chaidez, C., Soto, M., Gortares, P., Mena, K. 2006. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in irrigation water and its impact on the fresh produce industry. *International Journal of Environmental Health Research* 15(5).
- Chemello, I. 2008. Aspetti geologici e idrologici. In: Mezzalana, F. Le risorgive a Bressanvido e Sandrigo. Marca Print, Quinto di Treviso.
- Cicirello, H.G. 1997. Cryptosporidiosis in children during a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin: Clinical, laboratory and epidemiologic findings. *Epidemiology and Infection* 119(1): 53-60.
- Climate Prediction Centre. 2013. NOAA European rainfall data – April 2013. Online database available at: www.cpc.ncep.noaa.gov (URL last accessed on 11.10.2013)
- CAC Codex Alimentarius Commission. 1999. CAC Principles and Guidelines for the conduct of microbiological risk assessment. Doc. n. CAC/GL-30.
- Cohen, M.L. 2000. Changing patterns of infectious disease. *Nature* 406:762–767.
- Craun, G.F. 2006. Workshop summary: Estimating waterborne disease risks in the United States. *J Water Health* 4(2):241.
- Craun, G.F., Brunkard, J.M., Yoder, J.S., Roberts, V.A., Carpenter, J., Wade, T., Calderon, R.L., Roberts, J.M., Beach, M.J. and Roy, S.L. 2010. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. *Clinical Microbiology Reviews* 23(3): 507-28.
- Current, W.L. and Garcia, L.S. 1991. Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4(3):325-358 .
- De Lalla, F. 1992. Outbreak of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* infections in travelers returning from the Tropics. *Infection*, 20(2):78-82.
- De Riu, G.C., Vitale, A., Margarita, G. 1967. On the distribution of *Lamblia intestinalis* in a population group in the province of Caserta. *Ig Mod* 60:270–275.
- Desai, N.T., Sarkar, R., Kang, G. 2012. Cryptosporidiosis: an under-recognized public health problem. *Tropical Medicine* 2(2):91-98.
- Desselberger, U. 2000. Emerging and Re-emerging Infectious Diseases. *Journal of Infection*, 40:3-15.
- Di Benedetto, M.A., Di Piazza, F., Maida, C.M., Firenze, A., Oliveri, R. 2005. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wastewater, surface water and ground water samples in Palermo (Sicily). *Ann Ig*, 17:367–375.
- Dowd, S.E. 1999. Evaluation of methodologies including immunofluorescent assay (IFA) and the polymerase chain reaction (PCR) for detection of human pathogenic microsporidia in water. *Journal of Microbiological Methods*, 35 (1): 43-52.
- Dufour, A.P., Evans, O., Behymer, T.D., Cantu, R. Water ingestion during swimming activities in a pool: A pilot study. *Journal of water and health*, 4(4):425-430.
- Dworkin, M. S., Goldman, D. P., Wells, T. G., Kobayashi, J. M. & Herwaldt, B. L. 1996. Cryptosporidiosis in Washington State: An outbreak associated with well water. *J. Infect. Dis.* 174:1372–1376.
- El Said Said, D. 2012. Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. *Alexandria Journal of Medicine* 48:345–352.
- EPA. 1995. ICR protozoan method for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by a fluorescent antibody procedure. EPA/814-B-95-003.
- EPA. 1998. *Giardia*: human health criteria document. US-EPA Office of water. E-document available at: <http://water.epa.gov> (URL last accessed on 10.11.2013).
- EPA. 2001. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. EPA/821-R-01-026.
- EPA. 2009. Water on tap: what you need to know. US-EPA Office of water. E-document available at: <http://water.epa.gov> (URL last accessed on 10.09.2011).
- FAO/WHO. 2003. Hazard Characterization for Pathogens in Food and Water. Guidelines. Microbiological risk assessment series, vol. 3. E-document available at: www.who.int (URL last accessed on 21.08.2013).
- FAO/WHO. 2008a. Exposure assessment of microbiological hazards in food. Guidelines. Microbiological risk assessment series, vol. 7. E-document available at: www.who.int (URL last accessed on 21.08.2013).
- FAO/WHO. 2008b. Risk Characterization of Microbiological Hazards in Food. Guidelines.

Microbiological risk assessment series, vol. 17. E-document available at: www.who.int (URL last accessed on 21.08.2013).

- Fayer, R. et al. 1998. Survival of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Seawater and Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol*, 64(3):1070–1074.
- Feng, Y. and Xiao, L. 2011. Zoonotic potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 24(1):110-140.
- Filice, F.P. 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *U.C. Publications in Zoology* 57(2):53-146.
- Finch, G.R. and Belosevic, M. 2002. Controlling *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in drinking water by microbial reduction processes. *J. Environ. Eng. Sci.* 1:17-31.
- Fontaine, M. 2003. An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. *J Microbiol Methods*, 54(1):29.
- Foundation for Water Research. 2006. *Cryptosporidium* in water supplies. UK regulations. E-document available at: <http://www.fwr.org> (URL last accessed on 12.10.2013)
- Frost, F.J., Fea, E., Gilli, G., Biorci, F., Muller, T.M., Craun, G.F., Calderon, R.L. 2000. Serological evidence of *Cryptosporidium* infections in Southern Europe. *Eur J Epidemiol*, 16:385–390.
- Furtado, C., Adak, G.K., Stuart, J.M., Wall, P.G., Evans, H.S. and Casemore, D.P. 1998. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–95. *Epidemiol. Infect.* 121:109–119.
- Gagneux, S. 2012. Host–pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367(1590):850–859.
- Gatti, S., Lopes, R., Cevini, C., Ijaoba, B., Bruno, A., Bernuzzi, A.M., de Lio, P., Monco, A., Scaglia, M. 2000. Intestinal parasitic infections in an institution for the mentally retarded. *Ann Trop Med Parasitol*, 94:453–460.
- Genchi, C. 2003. De Carneri - Parassitologia generale e umana. CEA Edizioni, Rozzano (MI), Italy.
- Gerometta, M. and Crestani, C. 2012a. AcegasAps - I Quaderni: L'acqua potabile. Ed. AcegasAps, Trieste, Italy.
- Gerometta, M. and Crestani, C. 2012b. AcegasAps - I Quaderni: Il sistema fognario. Ed. AcegasAps, Trieste, Italy.
- Geurden, T., Vanderstichel, R., Pohle, H., Ehsan, A., von Samson-Himmelstjerna, G., Morgan, E.R., Camuset, P., Capelli, G., Vercruyssen, J., Claerebout, E. 2012. A multicentre prevalence study in Europe on *Giardia duodenalis* in calves, with molecular identification and risk factor analysis. *Veterinary parasitology*, 190(3-4):383-90.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Balducci, M., Drenaggi, D., Quarta, M., De Federicis, M., Ruggeri, P., Colapinto, D., Ripani, G., Scalise, G. 1997. Epidemiologic features of intestinal parasitic infections in Italian mental institutions. *Eur J Epidemiol*, 13:825–830.
- Giangaspero, A., Berrilli, F., Brandonisio, O. 2007. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitol Res*, 101:1169–1182.
- Giangaspero, A. 2009. *Giardia* and *cryptosporidium* in inflowing water and harvested shellfish in a lagoon in southern Italy. *Parasitology International* 58 (1): 12-7.
- Global Water Partnership. 2012. Briefing note: Integrated Urban Water Management. E-document available at: <http://www.gwp.org> (URL last accessed on 10.10.2013).
- Gomez Morales, M.A., Pozio, E., Croppo, G.P. 1992. Serodiagnosis of cryptosporidiosis in Italian HIV-positive patients by means of an oocyst soluble antigen in an ELISA. *J Infect*, 25:229–236.
- Gomez-Couzo, H. 2009. Excystation of *cryptosporidium parvum* at temperatures that are reached during solar water disinfection. *Parasitology* 136 (4): 393.
- Gomez-Couzo, H., McLauchlin, J., Ares-Mazas, E. 2005. Characterisation of a *Cryptosporidium* isolate from water buffalo (*Bubalus bubalis*) by sequencing of a fragment of the *Cryptosporidium* oocysts wall protein gene (COWP). *Veterinary Parasitology* 131:139-144.
- Grandis C. 1983. Il Bacchiglione: un fiume e la sua terra. Ed. Comune di Selvazzano Dentro (PD).
- Gross, T.L., Wheat, J., Bartlett, M., O'Connor, K.W. 1986. AIDS and multiple system involvement with *Cryptosporidium*. *Am J Gastroenterol*, 81(6):456-8.
- Hart, C.A. And Baxby, D. 1990. *Cryptosporidium muris* is particularly hazardous for people with suppressed immune systems from drugs or diseases, e.g. AIDS. *J Hosp Infect*, 16(4):379-81.

- Hopkins, R.M., Meloni, B.P., Groth, D.M., Wethrall, J.D., Reynoldson, J.A., Thompson, R.C. 1997. RNA sequencing reveals differences between genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J. Parasitol.*, 83:44-51.
- Institute of Medicine. 1992. Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States. National Academy Press, Washington DC.
- Jarroll E.L., Bingham, A.K. and Meyer, E.A. 1981. Effect of Chlorine on *Giardia lamblia* Cyst Viability. *Appl Environ Microbiol.* 41(2):483-487.
- Karanis, P. 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal Of Water And Health*, 5(1):1-38.
- Katz, D.E., Heisy-Grove, D., Beach, M., Dicker, R., Matyas, B. 2006. Prolonged outbreak of giardiasis with two models of transmission. *Epidemiol. Infect.* 29:1-7.
- Kofoid, C.A. And Christiansen, E.B. 1915. On the life-history of *Giardia*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1(11):547-52.
- Kofoid, C.A. 1920. A critical review of the nomenclature of human intestinal flagellates *Cercomonas*, *Chilomastix*, *Trichomonas*, *Tetratrichomonas* and *Giardia*. *University of California Publications in Zoology* 16:30-54.
- LeChevallier, M.W., Norton, W.D., Lee, R.G. 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Appl Environ Microbiol* 57(9):2610-2616.
- Leclerc, H., Schwartzbrod, L., Die-Cas, E. 2002. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit. Rev. Microbiol.* 28:371-409.
- Lee, S.H., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J. and Calderon, R.L. 2002. Surveillance for waterborne disease outbreaks: United States, 1999-2000. *Morb. Mortal Wkly Rep.* 51:1-47.
- Lee, A.K. 2009. Detecting pathogens in water by ultrafiltration and microarray analysis. Presented at the U.S. EPA Workshop on Innovative Approaches for Detecting Microorganisms and Cyanotoxins in Water, 20-21.05.2009.
- Lee, D.Y., Seto, P. and Korczak, R. 2010. DNA microarray-based detection and identification of waterborne protozoan pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 80(2):129-33.
- Levin, R.B., Epstein R.P., Ford, T.E., Harrington, W., Elson, O. and Reichard, E.G. 2002. U.S. drinking water challenges in the twenty-first century. *Environmental Health Perspectives*, 110: 43-52.
- Liang, J., Dziuban, E., Craun, G., Hill, V., Moore, M., Gelting, R., Calderon, R., Beach, M., Roy, S. 2006. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking e United States, 2003e2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 55:31-58.
- Lonigro, A., Pollice, A., Spinelli, R., Berrilli, F., Di Cave, D., D'Orazi, C., Cavallo, P., Brandonisio, O. 2006. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in membrane-filtered municipal wastewater used for irrigation. *Appl Environ Microbiol*, 72:7916-7918.
- MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., et al. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*, 331:(161-168).
- Maffei, M. 2001. L'acquedotto moderno: la vicenda storica. In: AA.VV. Le sorgenti per Padova - La costruzione del primo acquedotto moderno. Papergraf, Piazzola sul Brenta (PD), Italy.
- Mazzetti A., Suman. B. 1994. Il Bacchiglione: studi sul territorio, l'ambiente ed il paesaggio di Padova. Ed. Suman, Conselve (PD).
- McHardy, I.H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Couturier, M.R., Humphries, R.M. 2013. Clinical Laboratory Diagnosis of Intestinal Protozoa. *Clin Microbiol e-pub preview*.
- Medema G.J., Schets F., Teunis P.F.M. and Havelaar A.H. 1998. Sedimentation of Free and Attached *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts in Water. *Applied and environmental microbiology*, 64(11):4460-4466.
- Meinders, A.J. and Meinders, A.E. 2010. How much water do we really need to drink? *Ned Tijdschr Geneesk*, 54:A1757. [in Dutch]
- Mesquita, J.R., Vaz, L., Cerqueira, S., Castilho, F., Santos, R., Monteiro, S., Manso, C.F., Romalde, J.L., Nascimento, M.S. 2011. Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. *Food Microbiology* 28(5):936-41.
- Meyer, W.T. 1973. Epidemic giardiasis: a continue elusive entity. *Rocky Mt. Med. Jour.* 70:48-49.
- Miliotis, M.B. and Bier, J.W. 2003. International handbook of foodborne pathogens. Marcel Dekker Inc., New York.

- Mion, F. 2002. Acqua sotterranea nel Veneto. ARPAV, Padova.
- Moore, G. T., Cross, W. M., McGuire, D., Molloyhan, C. S., Gleason, N. N., Healy, G. R., and Newton, L. H. 1969. Epidemic giardiasis at a ski resort, *N. Engl. J. Med.* 281:402–407.
- Nasser, A.M., Tweto, E., Nitzan, Y. 2007. Die off of *Cryptosporidium parvum* in soil and waste water effluents. *J. Appl. Microbiol.* 102(1):169-76.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J., Kruse, H. 2010. Food-borne diseases: the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology* 139(1):3-15.
- Nygard, K., Schimmer, B., Sobstad, Q., Walde, A., Tveit, I., Langeland, N., Hausken, T., Aavitsland, P. 2006. A large community outbreak of waterborne Giardiasis-delayed detection in a non endemic area. *BMC Public Health* (6):141-146.
- Oberhuber, G., Kastner, N., Stolte, M. 1997. Giardiasis: A histologic analysis of 567 cases. *Scand J Gastroenrol* 32(1):48-51.
- O'Donoghue, P.J. 1985. *Cryptosporidium* infections in man, animals, birds and fish. *Aust Vet J*, 62(8):253-258.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crabb, J.H., Sterling, C.R., DuPont, H.L. 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J Infect Dis*, 180:1275-1281.
- Oliveri, R., Di Piazza, F., Marsala, B., Cerame, G., Firenze, A., Di Benedetto, M.A. 2006. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in swimming pools in the province of Palermo, Italy. *Ann Ig*, 18:367–374.
- Pall Corporation. 1996. Analysis of Envirochek® Sampling Capsule versus Traditional String Wound Cartridges for Collection and Recovery of *Cryptosporidium*. E-document available at: <http://www.pall.com/main/laboratory/literature-library-details.page?id=25300> (URL last accessed on 23.02.2012)
- Peruzzo, S., Leuzingher, E., Tundo, U. and Spolaore, L. 2012. AcegasAps - I Quaderni: L'Oasi di Villaverla. Ed. AcegasAps, Trieste, Italy.
- Persson, K., Svenungsson, B., de Jong, B. 2007. An outbreak of cryptosporidiosis at a day-care centre in Sweden. *European Surveillance* 12(8): E070823.3.
- Pherwani, A.V.; Bhawe, S.Y., Bijm, A.M., Desai, A.G. 1989. Prevalence of *Cryptosporidium* in children with acute diarrhea. *Indian J Pediatr*, 56(1):133-5.
- Provincia di Padova. 2006. Rapporto sullo stato dell'ambiente. Cap.7 – Il Bacchiglione. E-document available at: www.provincia.padova.it (URL last accessed on 23.08.2013).
- Pucci, R., Marino, R., Ilardi, I. 1967. Giardiasis in childhood. *Arch Ital Sci Med Trop Parassitol*, 48:135–144.
- Read, C., Walters, J., Robertson, I.D., Thompson, R.C. 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int. J. Parasitol.*, 151:181-90.
- Rinaldo, A., Altissimo, L., Marani, M., Passadore, G., Sartori, M. 2004. Bacino del Bacchiglione: studi e ricerche idrologiche finalizzati alla messa a punto di modelli matematici per la tutela e la gestione delle risorse idriche sotterranee - Relazione Finale.
- Romano, M. 2001. L'acqua potabile: indagini ed analisi alla base di una scelta. In Maffei M. Le sorgenti per Padova - La costruzione del primo acquedotto moderno. Papergraf, Piazzola sul Brenta (PD), Italy.
- Rose J.B., Haas C.N. and Regli S. 1991. Risk Assessment and Control of Waterborne Giardiasis. *American Journal of Public Health*, 81(6):709-713.
- Rose, J.B. 1999. *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and their impact on foods: A review. *J Food Prot* 62(9):1059.
- Rose, J.B., Epstein, P.R., Lipp, E.K., Sherman, B.H., Bernard, S.M. and Patz, J.A. 2001. Climate variability and change in the United States: Potential impacts on water- and foodborne diseases caused by microbiologic agents. *Environmental Health Perspectives*, 109:211-21.
- Rose, J.B., Gerba, C.P., Jacobowski, W. 1991. Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Environ Sci Technol* 25(8):1393–1400.
- Ryu H., Alum A., Mena K.D. and Abbaszadegan M. (2007) Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-potable reclaimed water. *Water Science and Technology*, 55(1):283-290.

- Sacco, C., Bianchi, M., Lorini, C., Burrini, D., Berchielli, S., Lanciotti, E. 2006. Removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* in drinking water treatment in a Tuscan area. *Ann Ig*, 18:117–126.
- Scotti, S., Pettoello Mantovani, M., Polito, G., Carlomagno, F., Coppola, A., di Martino, L. 1996. *Giardia duodenalis* infections in pediatrics: our series. *Infez Med*, 4:35–40.
- Šlapeta, J. 2013. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? *International Journal for Parasitology* (in press).
- Slingenbergh, J.I., Gilbert, M., de Balogh, K.I., Wint, W. 2004. Ecological sources of zoonotic diseases. *Rev Sci Tech*, 23:467–484.
- Solo-Gabriele, H., Neumeister, M. 1996. U.S. outbreaks of Cryptosporidiosis. *J. Am. Water Works Assoc.* 88:76-86.
- Spinelli, R., Brandonisio, O., Serio, G., Trerotoli, P., Ghezzani, F., Carito, V., Dajci, N., Doci, A., Picaku, F., Dentico, P. 2006. Intestinal parasites in healthy subjects in Albania. *Eur J Epidemiol* 6:161-166.
- Straub, T. M. 2003. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 53(2):185-97.
- Taylor, A., Craun, G.F., Faith, G.A., McCabe, L.J., Gangarosa, E.J. 1972. Outbreaks of waterborne diseases in the United States, 1961-1970. *J. Infect. Dis.* 125:329-331.
- Taylor, L. H., Latham, S.M. and Woolhouse, E.J.M.. 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 356(1411):983-9.
- Te Wiata, I., Lennon, D.1985. *Cryptosporidium* infestation in hospitalised urban children. *N Z Med J*, 98(778):349.
- Theodos, C.M. 1998. Innate and cell mediated immune response to *Cryptosporidium parvum*. *Adv Parasitol*, 40:88-119.
- Thomas D.J. 1993. Sedimentation characteristics of *Giardia intestinalis* Cysts - relevance to standard methods of detection. MS Thesis, Central Washington University. (currentl unpublished)
- Thompson, R.C.A. And Monis, P.T. 2004. Variation in *Giardia*: Implications for taxonomy and epidemiology. *Adv. Parasitol.* 58:69–137.
- Thompson, R.C.A. And Monis, P.T. 2011. Taxonomy of *Giardia* species. In: Lujàn, H.D. and Svärd S. (eds.) *Giardia: a model organism*. Springer-Verlag, Wien.
- Tomar M. 1999. Water and Wastewater Quality Management. Lewis Publishers. ISBN: 9781566703826.
- UN-Water. 2013. Wastewater Management and Water Quality: Framing Paper. E-document available at: www.unwater.org (URL last accessed on 10.10.2013).
- Veazie, L. 1969. Epidemic giardiasis. *N. Engl. J. Med.* 281:853.
- Watanabe, Y., Kimura, K., Yang, C.H., Ooi, H.K. 2005. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in faucet water samples from cattle and goat farms in Taiwan. *J. Vet. Med. Sci.* 67:1285-1287.
- WHO. 1997. Division of emerging and communicable diseases surveillance and control annual report – 1996. Geneva.
- WHO. 2003. *Emerging Issues in Water and Infectious Disease*. E-document available at: http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/emerging.pdf (URL last accessed on 07/08/2013)
- WHO. 2004. Water, Sanitation and Hygiene: Links to Health. Facts and figures. E-document available at: http://www.who.int/water_sanitation_health/en/factsfigures04.pdf (URL last accessed on 07/08/2013)
- WHO. 2011. Guidelines for drinking-water quality, 4th Ed. E-document available at: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf (URL last accessed on 13/05/2013)
- Widmer, G. 1998. Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*. *Adv Parasitol*, 40:224–241.
- Woolhouse, M.E.J. 2002. Population biology of emerging and re-emerging pathogens. *Trends in Microbiology*, 10(10):S3–S7.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S. 2004a. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1):72–97.
- Yoder, J., Hlavsa, M., Craun, G., Hill, V., Roberts, V., Yu, P., Hicks, L., Alexander, N., Calderon, R., Roy, S., Beach, M. 2008. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility associated health events: United States 2005-2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 57(SS09):1-29.

- Yoder, J.S., Gargano, J.W., Wallace, R.M., Beach, M.J. 2012a. Giardiasis Surveillance: United States, 2009-2010. *Surveillance Summaries* 61(SS05):13-23.
- Yoder, J.S., Wallace, R.M., Collier, S.A., Beach, M.J., Hlavsa, M.H. 2012b. Cryptosporidiosis Surveillance - United States, 2009–2010. *Surveillance Summaries* 61(SS05):1-12.
- Zanetti, P.G. 2002. *Andar per acque*. Ed. Il Prato, Padova, Italy.
- Zanovello, A. 2001. Le risorgive: formazione e caratteristiche idrogeologiche del bacino acquifero nord-vicentino. In Maffei M. *Le sorgenti per Padova - La costruzione del primo acquedotto moderno*. Papergraf, Piazzola sul Brenta, Padova.
- Zanovello, P. 2001. Alle origini dell'acquedotto: l'approvvigionamento idrico a Padova nell'antichità. In Maffei M. *Le sorgenti per Padova - La costruzione del primo acquedotto moderno*. Papergraf, Piazzola sul Brenta (PD), Italy.