



Short note: Ricerca di DNA mitocondriale da vongole per l'identificazione della fonte d'inquinamento delle acque - Search for mitochondrial DNA from clams to identify the source of water pollution

Canonico C., Di Lullo S., Bartozzi B.

Abstract. The quality of surface waters is generally assessed by monitoring of *Escherichia coli*. The presence of fecal indicators in waters doesn't provide information about their possible sources. Recent studies have utilised specific mitochondrial DNA (mtDNA) sequences for the source characterisation of faecal pollution. In this study we used real time PCR Taqman probes to differentiate human, bovine, ovine and swine sequences. The method is found to be extremely rapid, and easily applicable to clams. The obtained results point out that the main source of pollution is of human origin

Riassunto. La qualità delle acque superficiali è generalmente valutata mediante monitoraggio dell'*Escherichia coli*. La presenza di indicatori fecali in acque non fornisce però informazioni sulla loro possibile provenienza. Recenti studi hanno utilizzato specifiche sequenze di DNA mitocondriale (mtDNA) per la caratterizzazione della fonte di inquinamento fecale. In questo studio è stata utilizzata una real time PCR Taqman probes per discriminare umani, bovini, ovini e suini. Il metodo applicato è risultato essere estremamente rapido, discriminante e applicabile alle vongole. Dai risultati ottenuti si è rilevato che la principale fonte d'inquinamento è di origine umana.

Introduzione

I molluschi bivalvi sono organismi filtratori in grado di concentrare agenti patogeni presenti nelle acque superficiali soggette a contaminazione fecale. La qualità delle acque viene testata tramite il monitoraggio degli *Escherichia coli*. La presenza di questi indicatori fecali non fornisce alcuna informazione sulla fonte causa di contaminazione. Recentemente sono stati sviluppati studi che identificano le fonti d'inquinamento fecale utilizzando sequenze specifiche del DNA mitocondriale (mtDNA) che presentano una variabilità specie specifica. Il materiale fecale contiene cellule epiteliali esfoliate del tratto intestinale che possono essere filtrate e concentrate dai molluschi nell'epatopancreas da dove il DNA viene estratto. Le sequenze specie specifiche di mtDNA vengono ricercate tramite real time PCR utilizzando sonde Taqman, che permettono di identificare quattro diverse fonti d'inquinamento, quali umano, bovino, suino e ovino.

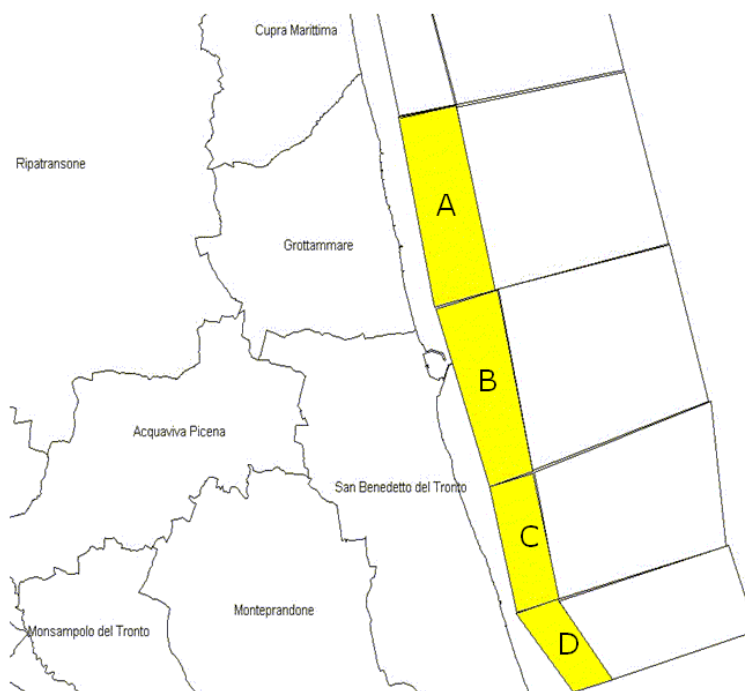


Figura 1. Punti di rilievo

Materiali e metodi

Per testare la specificità delle sonde sono stati analizzati 12 campioni di feci di origine animale (bovine, ovine, suine, feline) e umane. Per eliminare l'eventualità di cross reattività tra specie diverse, tutti i campioni di feci sono stati testati con tutte le sonde e sono stati analizzati campioni di natura mista. I campioni di vongole (*Chamelea gallina*) sono pervenuti da 4 punti di prelievo (A,B,C,D) scelti in prossimità delle foci dei fiumi a forte rischio di inquinamento; questi sono stati monitorati nel tempo fornendo un totale di 24 campioni. Sono stati prelevati 30 epatopancreas per ogni campione. Il DNA è stato estratto secondo la procedura NucliSens MiniMAG. La qualità e la quantità di DNA estratto da sottoporre a real time PCR è stata determinata al biofotometro.

PRIMERS CITOCROMO b	PCR MASTERMIX
HcytB-F 5'-CCTCCAAATCACCACAGGACTAT-3' HcytB-R 5'- CGTGAAGGTAGCGGATGATTC-3' Umano	<ul style="list-style-type: none"> TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)(Applied Biosystem) Primers forward e reverse 0,5µM Sonda 0,25µM Acqua ultrapura sterile fino a volume finale di 20µl
AcytB-F 5'-GCAATACACTACACATCTGACACAACAA-3' AcytB-R 5'- CAGATAAAAAATGATGCTCCGTTT-3' Animale	
SONDE TaqMan FAM-BHQ1 specie specifiche	CONDIZIONI DI AMPLIFICAZIONE
Human-p 5'-CAATCGCCACATCACTCGAGACGT-3' Umano	50°C per 2 minuti
Cow-p 5'- CTCCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGACG-3' Bovino	95°C per 10 minuti
Pig-p 5'-CGAATAACTCATCCGTAATTTACGTCTCGACAAA-3' Suino	50 cicli a 95°C per 15 secondi
Sheep-p 5'CTCCCTCTGTAACCCACATTTGCCGAGA-3' Ovino	60°C per 1 minuto

Figura 2. Specifiche per real time PCR

Risultati e discussione

I risultati relativi alle prove eseguite sulle feci hanno dato totale corrispondenza sia nei campioni a singola specie che nei campioni a specie miste. Non si sono verificate cross reazioni tra campioni singoli analizzati con sonde di specie diverse. Dai risultati ottenuti, nonostante si tratti di un lavoro in fase preliminare, si rileva che la principale fonte d'inquinamento è quella di origine umana. La positività da specie suina è spiegabile per la presenza in prossimità del corso degli affluenti dei fiumi di allevamenti suini. In conclusione il metodo applicato risulta essere estremamente rapido, discriminante e applicabile alle vongole; a supporto di questo possono essere affiancate altre tecniche analitiche per identificare la fonte d'inquinamento come ad esempio l'analisi del batteriofagi F+ di E.coli ma che risultano più indaginose.

Tabella 1. Risultato del campionamento per fonti di inquinamento umano, suino, bovino e ovino				
Punto di prelievo	N	PU	PS	PU/PS
A	1	2	0	1
B	1	4	0	2
C	0	5	0	1
D	2	3	1	1

N=campioni negativi per fonti di inquinamento umano, suino, bovino e ovino; PU=positivi per fonte d'inquinamento umano; PS=positivi per fonte di inquinamento suino; PU/PS=positivo sia per fonte d'inquinamento umano che suino

Bibliografia

Martellini A., Payment P., Villemur R. (2005). Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine, ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Res.* 39 (4): 541-548

Kortbaoui R, Locas A, Imbeau M, Payment P, Villemur R. (2009). Universal mitochondrial PCR combined with species-specific dot-blot assay as a source-tracking method of human, bovine, chicken, ovine and porcine in fecal contaminated surface water. *Water Res.* 43: 2002-2010.

Caldwell J.M., Raley M.E., Levine J. F. (2007). Mitochondrial multiplex real-time PCR as a source tracking method in fecal-contaminated effluents. *Environ Sci Technol.* 41: 3277-3283.



Search for mitochondrial DNA from clams to identify the source of water pollution by Canonico C., et al. 2013 is licensed under a Creative Commons Attribution - Non commerciale 3.0 Italia License. Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://indice.spvet.it/adv.html>.

	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy	
Centralino Istituto	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047	
Biblioteca	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: bie@izsum.it	
Rivista SPVet.it ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: editoria@izsum.it ; redazione-spvet@izsum.it http://spvet.it ; http://indice.spvet.it	
U. R. P.	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: URP@izsum.it	