



Interreg 
Alpine Space
Eco-AlpsWater
European Regional Development Fund

Linee guida per l'uso del eDNA nel biomonitoraggio delle acque nella Regione alpina

2021

PER STAKEHOLDERS E END-USER



Eco-AlpsWater

Innovative Ecological Assessment and Water Management Strategy for the Protection of Ecosystem Services in Alpine Lakes and Rivers

EDITORE Tina Elersek

AUTORI

TESTO: Isabelle Domaizon, Giulia Riccioni, Massimo Pindo, Valentin Vasselon, Rainer Kurmayer, Adriano Boscaini, Camilla Capelli, Agnes Bouchez, Frederic Rimet, Marine Vautier, Cécile Chardon, Maxime Logez, Jean Marc Baudoin, Josef Wanzenböck, Hans Rund, Stefanie Dobrovolny, Peter Hufnagl, Andrea Gandolfi, Jonas Bylemans, Ute Mischke, Tina Elersek, Nico Salmaso

REVISIONE: Hans Rund

TRADUZIONE: Camilla Capelli

IMMAGINI: National Institute of Biology (Maša Zupančič, Tina Eleršek), ARPAV (Giorgio Franzini). LFUI (Hans Rund) e FEM (Nico Salmaso)

GRAFICI: Nico Salmaso, Marine Vautier

DESIGN: Tina Elersek

PUBBLICATO da National Institute of Biology

Copyright © National Institute of Biology 2021

Edizione elettronica

Ljubljana, 2021

INFO tina.elersek@nib.si

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

[COBISS.SI-ID 89010435](https://nib.si/COBISS.SI-ID/89010435)

ISBN 978-961-7144-10-9 (PDF)

Protocolli per l'uso del eDNA nel biomonitoraggio degli ambienti acquatici! La presente pubblicazione rappresenta ad oggi lo stato dell'arte, tuttavia i protocolli discussi saranno ottimizzati grazie ai crescenti miglioramenti nelle procedure e allo sviluppo tecnologico.

Interreg
Alpine Space
Eco-AlpsWater
European Regional Development Fund





Contents

I. Stato dell'arte dei metodi per l'analisi del DNA ambientale nei laghi e nei corsi d'acqua.....	4
II. Protocolli per il campionamento (Fig. 1, step 1).....	7
Campionamento del plancton	7
Campionamento del biofilm in ambiente fluviale e lacustre.....	8
Campionamento dell'eDNA dei pesci in ambiente fluviale e lacustre.....	9
III. Protocolli per l'estrazione dell'eDNA (Fig. 1, step 2)	10
Estrazione del DNA del plancton.....	10
Estrazione del DNA dal biofilm.....	11
Estrazione dell'eDNA dei pesci (3 metodi).....	12
IV. Protocolli per la preparazione di librerie di sequenze (Fig. 1, step 3-4).....	14
Protocolli per la preparazione di librerie di diatomee.....	14
Protocollo per la preparazione di librerie di batteri	15
Protocollo per la preparazione di librerie di protisti	16
Protocollo per la preparazione di librerie dei pesci.....	17
V. Protocolli per l'analisi bioinformatica delle sequenze di DNA (Fig. 1, step 5-6)	18
Pipeline bioinformatica per le diatomee (gene <i>rbcl</i>)	18
Pipeline bioinformatica per i batteri (gene 16S rRNA)	19
Pipeline bioinformatica per i protisti (gene 18S rRNA).....	20
VI. Armonizzazione degli approcci tra Europa e Svizzera	21
Requisiti della EU-WFD e della CH-WPO.....	21
Approcci di monitoraggio di nuova generazione	24
VII. FAQ – prospettive generali e scientifiche	25



I. Stato dell'arte dei metodi per l'analisi del DNA ambientale nei laghi e nei corsi d'acqua

Le acque dolci di laghi e fiumi forniscono beni e servizi di primaria importanza per la società a livello globale; la protezione e la conservazione degli ecosistemi acquatici rappresenta quindi una grande sfida. Il biomonitoraggio supporta la gestione e la conservazione delle acque dolci ed è diventato un compito essenziale in Europa come conseguenza delle forti pressioni antropiche che influenzano la salute di laghi e fiumi. Una valutazione efficace della qualità/stato degli ecosistemi acquatici richiede informazioni dettagliate su vari organismi (dalle microalghe ai pesci), che vengono usati come indicatori della salute dell'ecosistema (elementi di qualità biologica, EQB). Le metriche di biodiversità si ottengono col campionamento degli EQB, che vengono identificati a livello di specie per costituire delle liste tassonomiche da utilizzare per il calcolo di indici di qualità. Questi approcci richiedono elevate competenze tassonomiche, per gli organismi superiori possono essere invasivi (per es. l'elettropesca), richiedono tempo, sono tecnicamente complessi e quindi costosi da applicare su larga scala temporale e spaziale. Negli ultimi anni, i metodi che utilizzano tecniche di sequenziamento di nuova generazione (High-throughput sequencing, HTS), come il metabarcoding applicato al DNA ambientale (*environmental DNA*, eDNA), sono state proposte come soluzione a tali limiti. Questo biomonitoraggio di nuova generazione ha molti vantaggi rispetto all'approccio tradizionale in termini di velocità, comparabilità e costi, offrendo la possibilità di monitorare la biodiversità acquatica con un approccio non invasivo e facilmente standardizzabile. Il DNA ambientale è il DNA contenuto nei campioni ambientali (in questo progetto acqua o biofilm) e comprende sia il DNA incluso in cellule viventi (ad es. batteri, microalghe), che il DNA rilasciato nell'ambiente da tutti i tipi di organismi (ad es. pesci). Dai campioni di eDNA, brevi regioni di DNA chiamate "barcode" (codice a barre) possono essere amplificate, sequenziate utilizzando tecnologie HTS e confrontate con una libreria di riferimento, che permette di identificare gli organismi presenti nel bacino in cui sono stati raccolti i campioni. Sebbene il metabarcoding dell'eDNA sia stato riconosciuto come un approccio molto promettente nel biomonitoraggio di prossima generazione, le metodologie associate non sono ancora standardizzate e il flusso di lavoro deve essere normalizzato e convalidato a livello Europeo, prima che possa essere implementato per il monitoraggio di laghi e fiumi. Uno degli obiettivi principali del progetto Eco-AlpsWater è quello di formalizzare dei protocolli standard basati sullo studio dell'eDNA per i batteri (cianobatteri), le microalghe e i pesci, e di ottimizzarli su scala alpina in laghi e fiumi pilota. Come evidenziato in Fig. 1, i protocolli sono stati sviluppati basandosi sullo stato dell'arte per ogni fase dell'approccio eDNA, ossia 1) il campionamento, 2) l'estrazione del DNA, 3) l'analisi del DNA (inclusa la selezione dei barcode e l'amplificazione), 4) il sequenziamento e 5) le analisi bioinformatiche che permettono di ottenere 6) le liste tassonomiche. Anche se includono alcuni passaggi comuni, i protocolli devono essere adattati ai diversi EQB. Una rappresentazione dei metodi applicati per lo studio dei pesci, è mostrata come esempio in Fig. 2. Sulla base delle evidenze discusse in questo rapporto, il consorzio del progetto Eco-AlpsWater ha fatto alcune scelte metodologiche che aiutano a



formalizzare appropriate strategie per lo studio dell'eDNA, e a renderle trasferibili al monitoraggio delle acque dolci. Le principali domande affrontate in questa sintesi bibliografica sono: (i) quando, come e dove campionare l'eDNA, (ii) come concentrare e conservare l'eDNA, (iii) qual è il metodo di estrazione del DNA più appropriato, (iv) quali sono i barcode da utilizzare secondo gli obiettivi del biomonitoraggio, e (v) quali sono le tecnologie di sequenziamento e le pipeline bioinformatiche da applicare per ottenere liste tassonomiche robusti per i gruppi biologici studiati.

Tutti i protocolli descritti sono tra quelli proposti dal consorzio Eco-AlpsWater per promuovere l'implementazione dell'analisi dell'eDNA con metodi HTS nel biomonitoraggio e nella valutazione ecologica di laghi e corsi d'acqua.

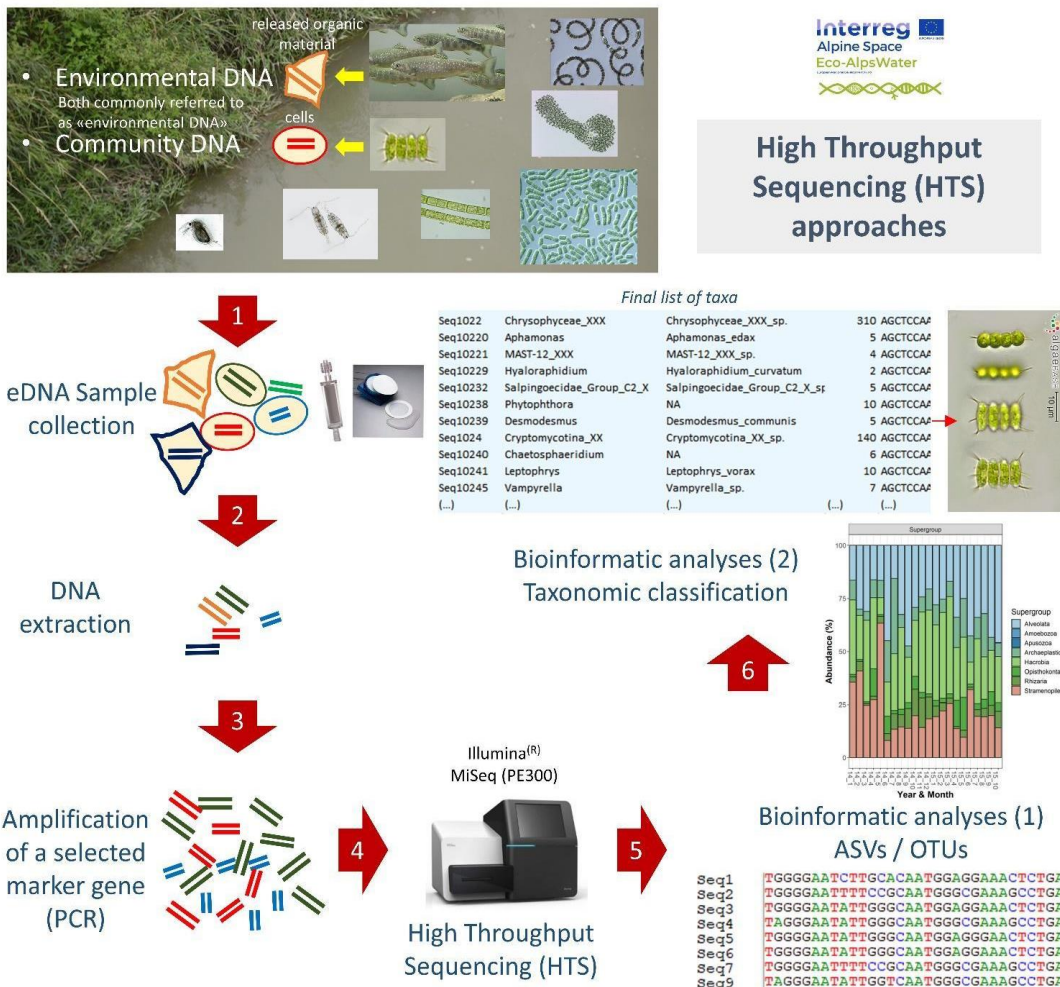


Fig. 1. Rappresentazione schematica delle fasi principali dell'analisi dell'eDNA negli ambienti acquatici (laghi e fiumi). Nell'immagine sono rappresentati l'amplificazione, il sequenziamento e la classificazione dei protisti (sequenze di DNA rosso, blu e verde scuro), ma queste fasi sono comuni nell'analisi anche di altri organismi acquatici. Tuttavia, ogni EQB richiede specifici adattamenti nelle procedure in tutte e sei le fasi dell'analisi HTS (si veda per es. la Fig.2).

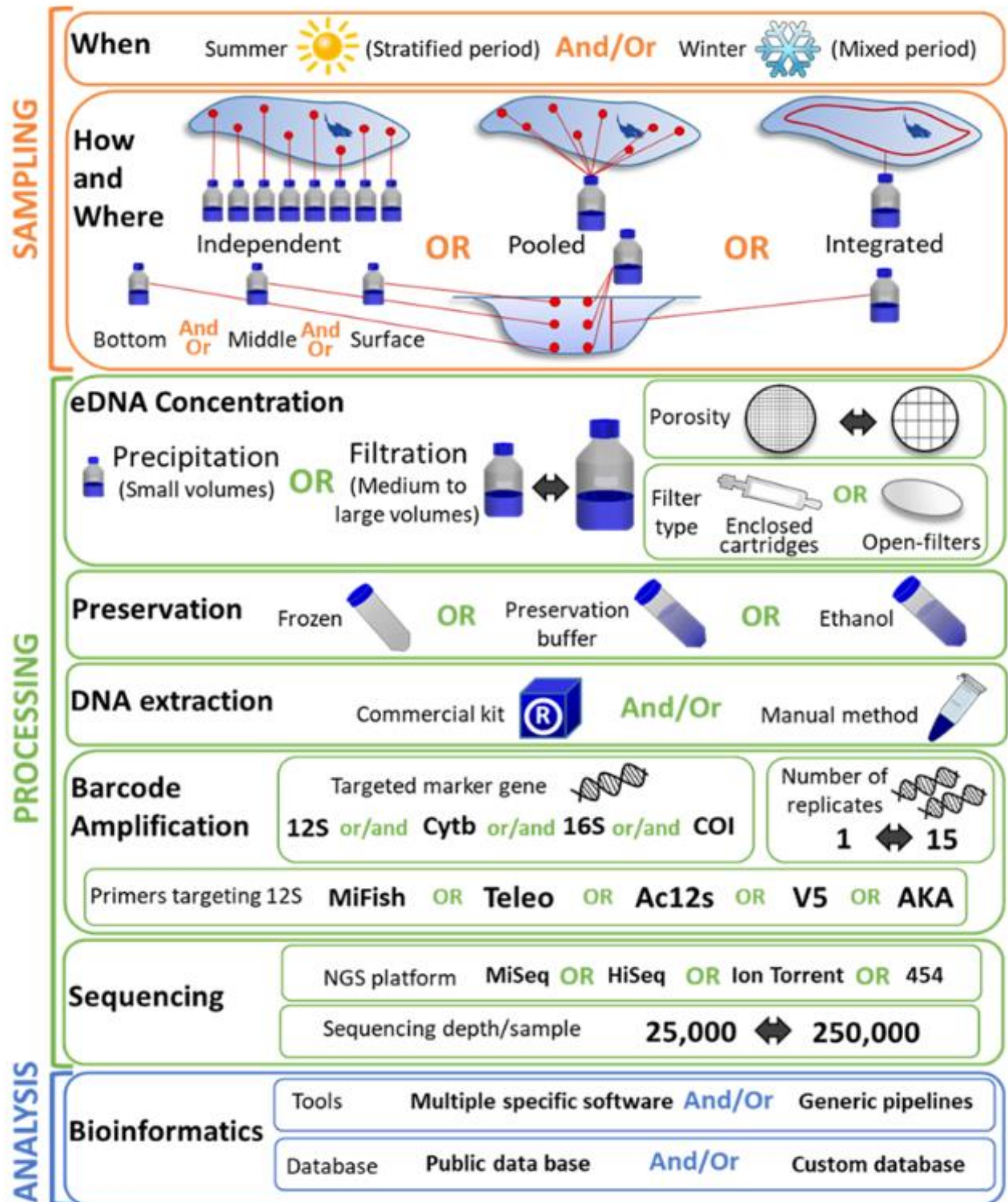


Fig. 2. Rappresentazione schematica delle fasi principali e dei metodi applicati nell'analisi dell'eDNA dei pesci tramite metabarcoding negli ecosistemi acquatici (laghi e fiumi).



II. Protocolli per il campionamento (Fig. 1, step 1)

Campionamento del plancton

Raccolta di campioni di plancton in ambiente lacustre per analisi molecolari

Lo scopo di questo protocollo è di fornire un metodo affidabile e replicabile per il campionamento del plancton in ambiente lacustre basato sull'analisi del DNA. L'applicazione qui proposta, nel contesto del progetto Eco-AlpsWater, mira a confrontare le liste di taxa ottenute con l'analisi del DNA con quelle tradizionali del fitoplancton e a caratterizzare in modo più ampio la diversità microplanctonica attraverso l'analisi dell'eDNA (inclusi i batteri). La strategia di campionamento è simile a quella utilizzata per l'indagine classica del fitoplancton che si concentra sulla zona eufotica (Fig. 3), tuttavia le procedure di filtrazione e conservazione dei campioni sono adattate per l'eDNA.

Protocollo:

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.xn6fmhe

Breve video che dimostra il campionamento del plancton per l'analisi dell'eDNA:

<https://www.youtube.com/watch?v=du5dfjNQr1E>

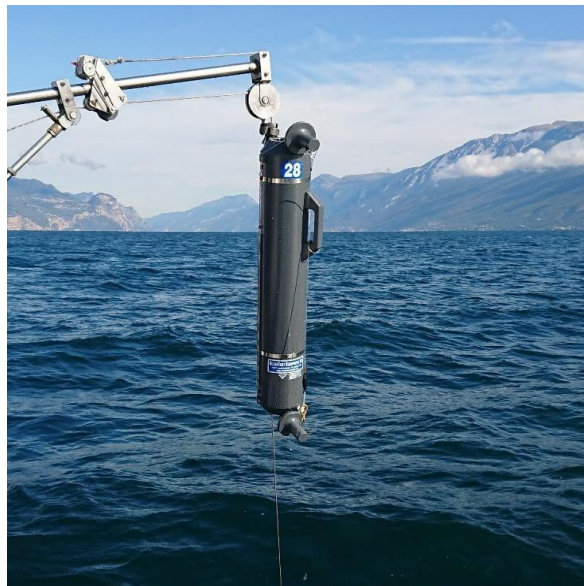


Fig. 3. Bottiglia Niskin usata per la raccolta di campioni d'acqua a profondità discrete nel Lago di Garda.



Campionamento del biofilm in ambiente fluviale e lacustre

Campionamento del biofilm nei corsi d'acqua per la classificazione al microscopio e l'analisi del DNA

L'obiettivo di questo protocollo è di fornire un metodo affidabile e replicabile per il campionamento del microfitorbentos e dei batteri associati nei biofilm nei corsi d'acqua, da utilizzare sia per l'analisi del DNA che per il conteggio al microscopio degli organismi. Il protocollo è ottimizzato per il campionamento di routine ed è in accordo con la linea guida CEN (NF EN 13946) e il rapporto tecnico CEN (FprCEN/TR 17245) per l'analisi delle diatomee bentoniche dei corsi d'acqua (es. Fig. 4) e dei laghi. L'applicazione qui proposta, nel contesto del progetto Eco-AlpsWater, mira a confrontare le liste tassonomiche ottenute con l'analisi del DNA con quelle tradizionali (microscopia)

Protocollo per il campionamento del biofilm nei laghi:

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.br2xm8fn](https://doi.org/10.17504/protocols.io.br2xm8fn)

Protocollo per il campionamento del biofilm nei corsi d'acqua:

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ben6jdhe](https://doi.org/10.17504/protocols.io.ben6jdhe)

Breve video che dimostra il campionamento del biofilm per l'analisi dell'eDNA:

<https://www.youtube.com/watch?v=6Q48nSMjNA>



Fig. 4. Fiume Bistrica, campionamento del biofilm con spazzolino sterile e guanti.



Campionamento dell'eDNA dei pesci in ambiente fluviale e lacustre

Campionamento dell'eDNA dei pesci nei laghi e nei corsi d'acqua per analisi molecolari.

L'obiettivo di questo protocollo è di fornire un metodo affidabile e replicabile per il campionamento dell'eDNA dei pesci nei laghi e nei corsi d'acqua da sottoporre ad analisi molecolari (es., Fig. 5). L'applicazione qui proposta mira a confrontare le liste tassonomiche di pesci ottenute con l'analisi dell'eDNA con quelle ottenute con l'applicazione di metodi tradizionali. Prenderemo in considerazione tre diversi approcci di campionamento, che si differenziano per il tipo di filtro utilizzato, il numero di campioni e il volume filtrato per campione (cfr. Fig. 2). Ognuno di questi metodi e le relative procedure di estrazione del DNA (descritte nella successiva sezione III) possiedono vantaggi e svantaggi. La scelta sul tipo di approccio più indicato dipende dalla domanda di ricerca in questione. E' da evidenziare che questi protocolli devono essere ancora considerati come "in fase di sviluppo". Tutti i membri del consorzio Eco-AlpsWater hanno contribuito all'ottimizzazione dei protocolli.

Protocollo:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/final-results-and-deliverables/d.t1.1.2---4-lake-river-fish-edna-sampling.pdf>



Fig. 5. *Perca fluviatilis*.



III. Protocolli per l'estrazione dell'eDNA (Fig. 1, step 2)

Estrazione del DNA del plancton

Protocollo Eco-AlpsWater applicato per i filtri Sterivex

Questo protocollo fa parte del flusso di lavoro per l'analisi del DNA applicato nel progetto Eco-AlpsWater per caratterizzare la diversità del plancton nei laghi. Tradizionalmente, l'analisi del fitoplancton viene fatta attraverso osservazioni al microscopio, ma le tecnologie HTS permettono un'analisi rapida dei campioni ambientali e hanno la capacità di includere una grande diversità di taxa che tradizionalmente non vengono presi in considerazione nelle indagini tradizionali. La fase qui descritta è l'estrazione del DNA. Questo è un passo critico per ottenere risultati affidabili, perché il DNA è immagazzinato all'interno delle cellule (vedi figura sotto) e i metodi per la lisi cellulare e l'isolamento del DNA devono essere efficienti per consentire il recupero dell'acido nucleico anche da specie con pareti cellulari resistenti. Per il progetto Eco-AlpsWater, il plancton campionato nei laghi è stato concentrato su filtri chiusi (incapsulati) Sterivex® (0.22 µm) e conservato a -20°C, come descritto nel protocollo "Lake plankton sample collection from the field for downstream molecular analysis" (sezione "Campionamento del plancton". La metodologia scelta per l'estrazione del DNA è stata quindi adattata al tipo di materiale/filtro utilizzato per la raccolta del plancton (ossia il filtro Sterivex®). Il protocollo presentato di seguito utilizza il kit DNeasy® PowerWater Sterivex® (QIAGEN) con modifiche specifiche ottimizzate per l'estrazione del DNA del plancton.

Protocollo:

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bvgzn3x6

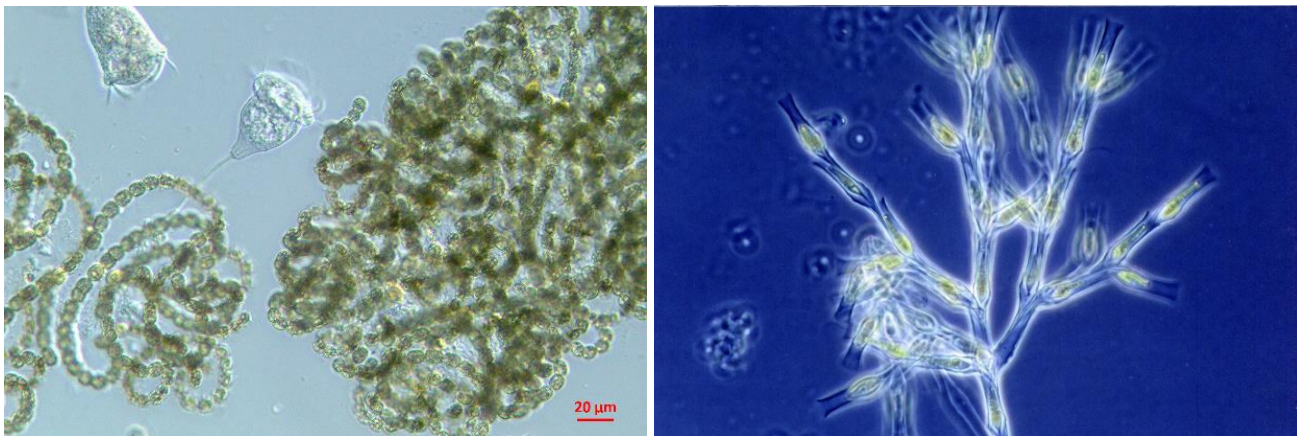


Fig. 6. Fitoplancton del Lago di Garda. In alto, filamenti del cianobatterio *Dolichospermum lemmermannii* con attaccati alcuni esemplari di *Vorticella*. In basso, *Dinobryon divergens* (*Crisoficee*). Il processo di estrazione fornisce il DNA genomico di tutti gli organismi presenti nel campione.



Estrazione del DNA dal biofilm

Protocollo Eco-AlpsWater applicato per i biofilm

La procedura qui descritta è l'estrazione del DNA dai campioni di biofilm, un passo critico per ottenere risultati rilevanti, poiché anche per questa tipologia di campioni gli inventari molecolari potrebbero essere influenzati dal metodo utilizzato nell'estrazione. La metodologia per l'estrazione del DNA del biofilm è stata identificata testando 5 diversi metodi basati su vari tipi di lisi cellulare e purificazione del DNA applicati a colture di diatomee pure e a campioni di laghi e fiumi contenenti diversi gruppi algali (es. Fig. 7). Nel progetto Eco-AlpsWater, dopo la raccolta in laghi o corsi d'acqua, i biofilm sono stati conservati in tubi sterili da 50 mL in etanolo a 4°C, e per un massimo di 3 mesi (preferibilmente l'estrazione dovrebbe essere eseguita nel mese successivo al campionamento). Il protocollo di estrazione del DNA presentato di seguito è stato utilizzato in diversi studi recenti incentrati sull'applicazione del metabarcoding per le diatomee; questa estrazione è basata su un protocollo adattato per il kit NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL) con modifiche specifiche ottimizzate per l'estrazione del DNA dei biofilm.

Protocollo:

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bd52i88e

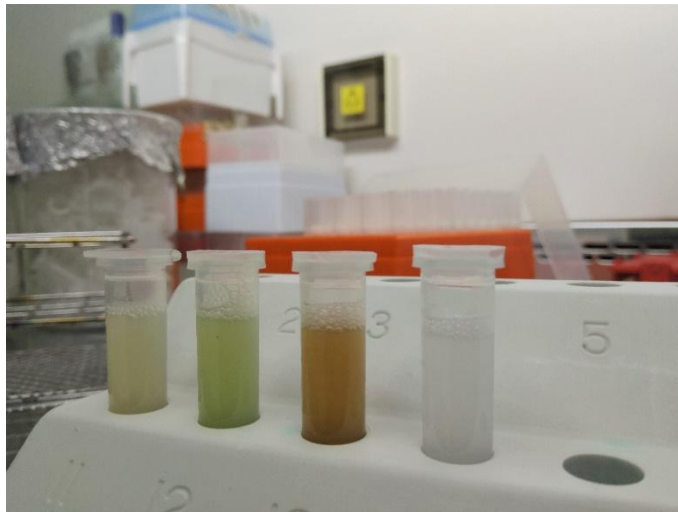


Fig. 7. Fase di estrazione del DNA da biofilm raccolti in diversi ambienti acquatici.



Estrazione dell'eDNA dei pesci (3 metodi)

(1) Protocollo Eco-AlpsWater applicato per l'estrazione del DNA dei pesci

La scelta del metodo di estrazione del DNA dei pesci è basata su studi precedenti, con l'inserimento di alcuni adattamenti. Per l'approccio integrato di campionamento dell'eDNA previsto nel progetto Eco-AlpsWater, i campioni d'acqua sono raccolti per mezzo di una cartuccia filtrante VigiDNA® (0.45 µm), in grado di filtrare grandi volumi di acqua (30 litri). Dopo la filtrazione, alla cartuccia è stata aggiunta una soluzione utile per la conservazione del materiale genetico. Successivamente, il filtro VigiDNA® è stato conservato a temperatura ambiente fino all'estrazione (entro 1 mese dal campionamento). Il protocollo di estrazione del DNA utilizzato per questo approccio è basato sul kit NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL) con modifiche specifiche. Questo metodo è stato testato e descritto in dettaglio nel contesto del progetto Eco-AlpsWater con il protocollo: "Eco-AlpsWater protocol applied for fish DNA extraction from VigiDNA® filtration cartridge using an adaptation of the NucleoSpin® Soil kit (MACHEREY-NAGEL)".

Protocollo:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/dt1.1.2.--8.2-fish dna extraction vigidna.pdf>

(2) Protocollo Eco-AlpsWater applicato per l'estrazione del DNA dei pesci da filtri Sterivex®

Questo specifico metodo di estrazione del DNA dei pesci è basato su studi precedenti e adattato ai filtri Sterivex®. Nell'ambito del progetto Eco-AlpsWater, per l'approccio di campionamento puntuale dell'eDNA dei pesci con filtri incapsulati, i campioni d'acqua (2 litri) sono stati filtrati su filtri Sterivex® (0.45-µm). Successivamente, le cartucce sono state riempite con una soluzione di conservazione e mantenute a temperatura ambiente fino all'estrazione del DNA (entro 1 mese dal campionamento). Il protocollo di estrazione del DNA presentato in questa sezione è basato sul kit NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL) con modifiche specifiche: "Eco- AlpsWater protocol applied for fish DNA extraction from Sterivex cartridge preserved with preservation buffer and using the NucleoSpin® Soil kit (MACHEREY-NAGEL)".

Protocollo:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/dt1.1.2.--8.1-fish dna extraction sterivex.pdf>



(3) Estrazione del DNA dei pesci da filtri in fibra di vetro con l'utilizzo del kit DNeasy PowerWater®

Per ragioni di confronto, per l'estrazione dell'eDNA dei pesci è stata utilizzata infine una metodologia aggiuntiva che si era dimostrata efficace in test precedenti condotti nell'ambito del progetto Eco-AlpsWater. A differenza dei precedenti, l'approccio per il campionamento puntuale dell'eDNA rappresentativo della fauna ittica è basato sull'utilizzo di filtri in fibra di vetro GFC. A questo riguardo, i campioni di acqua (5 litri) sono raccolti (es. Fig. 8) e filtrati su filtri GFC (1,2 µm di porosità). Dopo la filtrazione, i filtri sono conservati a -20 °C fino all'estrazione del DNA. L'estrazione è eseguita secondo il protocollo descritto dal produttore (Qiagen) ottimizzato per i filtri (compresi i GFC) utilizzando il kit DNeasy PowerWater.



Fig. 8. Giovani trote fario (Salmo trutta) in un corso d'acqua alpino.



IV. Protocolli per la preparazione di librerie di sequenze (Fig. 1, step 3-4)

Protocolli per la preparazione di librerie di diatomee

Amplificazione PCR del gene rbcL per l'analisi bioinformatica e la classificazione tassonomica delle diatomee (Bacillariophyta, Fig. 9)

Diversi studi hanno già mostrato il potenziale dell'applicazione del metabarcoding delle diatomee per la valutazione della qualità delle acque dolci. La scelta del gene marker e della regione del barcode è fondamentale per ottenere liste rappresentative e una precisa assegnazione tassonomica. Per le diatomee bentoniche, il gene rbcL ha dimostrato di essere un marker tassonomico appropriato per il biomonitoraggio. Inoltre, una libreria di riferimento di barcode ben curata è già disponibile per attribuire alle sequenze rbcL i nomi di specie (R-Syst::diatom). Nei protocolli Eco-AlpsWater, i campioni di biofilm sono raccolti nei corsi d'acqua e nella zona litorale dei laghi e il DNA estratto come descritto nelle sezioni precedenti. Le principali fasi del flusso di lavoro comprendono l'amplificazione PCR di barcode selezionati e i metodi di laboratorio per la preparazione della libreria di DNA da sottoporre al sequenziamento HTS con strumentazione Illumina MiSeq. Questo protocollo è stato testato in studi recenti dove il metabarcoding delle diatomee è stato utilizzato per la valutazione ecologica dei corsi d'acqua.

Protocollo:

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bd94i98w



Fig. 9. Diverse diatomee al microscopio ottico (Diatoma, Achnantheidium, Navicula).



Protocollo per la preparazione di librerie di batteri

Amplificazione PCR del gene 16S rRNA per l'analisi bioinformatica e la classificazione tassonomica dei batteri e dei cianobatteri

Questo protocollo fornisce gli elementi di base utilizzati per l'identificazione dei batteri nell'ambito del progetto Eco-AlpsWater. Le analisi sono state applicate al DNA estratto da campioni raccolti nella colonna d'acqua dei laghi e da biofilm raccolti nei corsi d'acqua e nella zona litorale dei laghi (es. Fig. 10). Il marker utilizzato per l'identificazione dei batteri è il gene 16S rRNA, che è ampiamente utilizzato nella determinazione tassonomica e nelle analisi filogenetiche delle comunità batteriche. L'amplificazione PCR di questo marker nel DNA genomico estratto da campioni ambientali è stata eseguita selezionando una sequenza di ~ 460 bp (base pairs) nelle regioni variabili V3-V4. Oltre alle classi batteriche, le librerie così preparate includono anche sequenze di cianobatteri, che sono tra gli elementi biologici più importanti nel biomonitoraggio ambientale e nel biomonitoraggio delle acque destinate ad uso potabile e ricreativo. Il set di primer batterici comprende: 341F (5' CCTACGGGGCWGCAG 3') e 805Rmod (5' GACTACNVGGGTWTCTAATCC 3') con adattatori Illumina. Questa coppia di primer è stata ampiamente utilizzata nella valutazione della biodiversità batterica in ambienti acquatici. Nella preparazione della libreria è stata seguita una procedura standard descritta nel protocollo indicato di seguito.

Protocollo:

https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/d.t1.3.1-10-validated_library_prep_16s.pdf



Fig. 10. Fioritura del cianobatterio *Planktothrix rubescens* nel Lago di Ledro (Alpi italiane).



Protocollo per la preparazione di librerie di protisti

Amplificazione PCR del gene 18S rRNA per l'analisi bioinformatica e la classificazione tassonomica dei protisti (incluse le microalghe)

I protisti sono un gruppo polifiletico di organismi eucarioti che include gruppi più strettamente associati alle piante, ai funghi o agli animali di quanto non lo siano ad altri protisti (es. Fig. 11). Oltre ai protisti eterotrofi e ai funghi microscopici, i protisti fotosintetici e mixotrofi, o "alghe", sono inclusi in molti supergruppi insieme a molti altri protozoi, ad eccezione degli Archaeplastida, che formano un gruppo a parte. Questo protocollo fornisce gli elementi di base che sono stati utilizzati per l'identificazione dei protisti nell'ambito del progetto Eco-AlpsWater. Le analisi sono state applicate al DNA estratto da campioni raccolti nella colonna d'acqua dei laghi e dai biofilm raccolti nei corsi d'acqua e nell'area litorale dei laghi (vedi sezioni precedenti). Il marker utilizzato per l'identificazione dei protisti è il gene 18S rRNA. L'amplificazione PCR di questo marker è stata eseguita selezionando una sequenza di ~380 bp della regione variabile V4 utilizzando il set di primer specifico: TAREuk454FWD1 (5' CCAGCASCYGC GGTAATCC 3') e TAREukREV3_modified (5' ACTTCGTTCTTGATYRATGA 3'). Questa coppia di primer è stata ampiamente utilizzata nella valutazione della biodiversità microeucariotica negli ambienti acquatici. Nella preparazione della libreria del gene 18S rRNA è stata seguita una procedura standard descritta nel protocollo indicato di seguito.

Protocollo:

https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/d.t1.3.1-11-validated_library_prep_18s.pdf

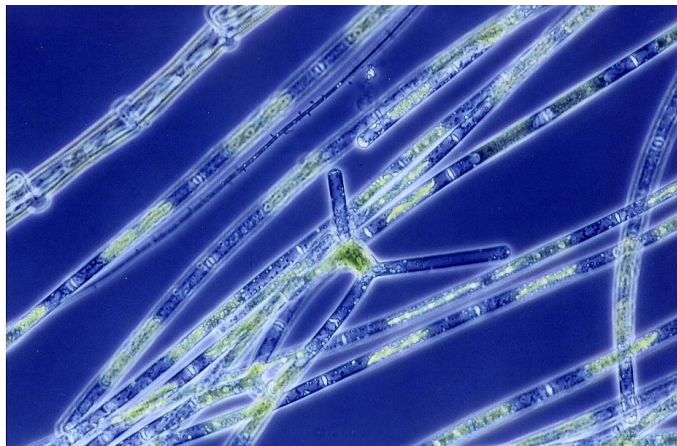


Fig. 11. L'alga verde *Mougeotia* sp. del Lago di Garda; i filamenti sono larghi ca. 7 μ m.



Protocollo per la preparazione di librerie dei pesci

AMPLIFICAZIONE PCR del gene 12S rRNA per l'analisi bioinformatica e la classificazione tassonomica dei pesci

Lo scopo di questo documento è quello di fornire una descrizione dettagliata del protocollo di preparazione delle librerie Illumina per il metabarcoding dell'eDNA delle comunità di pesci d'acqua dolce (es. Fig. 12). Il protocollo è stato attentamente valutato e verificato attraverso un test di intercalibrazione condotto presso la Piattaforma di Sequenziamento e Genotipizzazione di FEM nell'ambito del progetto Eco-AlpsWater. Il protocollo nella sua forma attuale, tuttavia, è ancora in fase di ottimizzazione e la valutazione della replicabilità e della robustezza degli approcci basati su protocolli diversi è ancora in fase di sperimentazione.

Protocollo:

https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/d.t1.1.2.-12library_preparation_12s.pdf



Fig. 12. *Anguilla europea* (*Anguilla anguilla*), un pesce migratore a forma di serpente.



V. Protocolli per l'analisi bioinformatica delle sequenze di DNA (Fig. 1, step 5-6)

Pipeline bioinformatica per le diatomee (gene *rbcl*)

Pipeline bioinformatica per il metabarcoding delle diatomee con software "Mothur", Miseq, rbcl 312 bp

Questo protocollo descrive in dettaglio le fasi principali delle analisi bioinformatiche applicate al trattamento dei dati HTS, in particolare per il metabarcoding delle diatomee. Nei laghi e nei corsi d'acqua, le diatomee sono un elemento biologico tra i più rilevanti (Fig. 13).

Protocollo:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/dt1.1.3.--1-bioinformatic-diatoms.pdf>

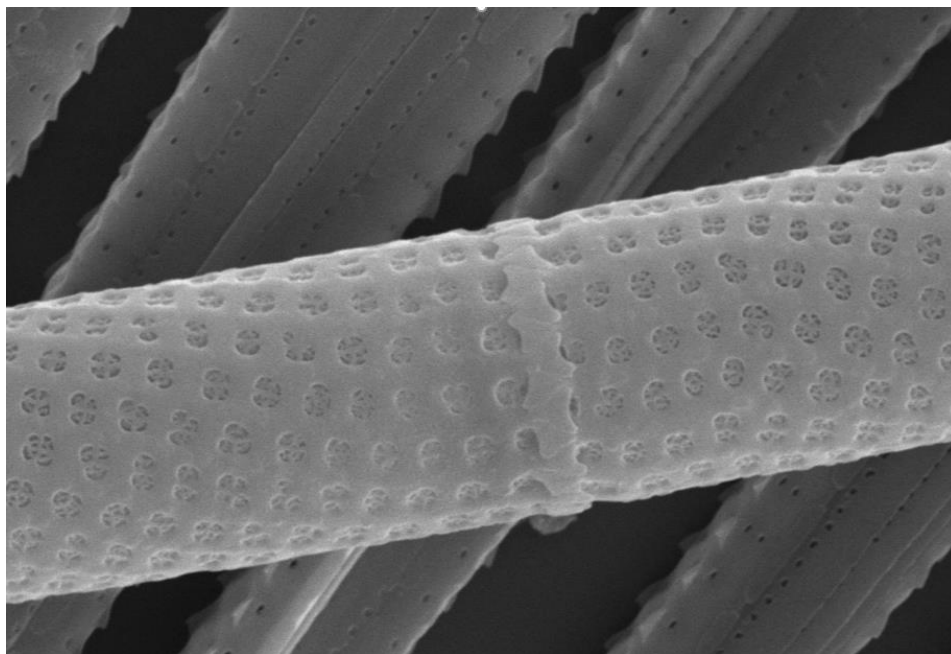


Fig. 13. Immagine al microscopio elettronico a scansione delle diatomee *Aulacoseira granulata* e (sfondo) *Fragilaria crotonensis* del Lago di Garda.



Pipeline bioinformatica per i batteri (gene 16S rRNA)

Analisi bioinformatica dei batteri (inclusi i cianobatteri) basata sull'utilizzo del gene 16S rRNA e la pipeline DADA2

Questo protocollo descrive in dettaglio le fasi principali della pipeline bioinformatica utilizzata per analizzare i dati ottenuti dal sequenziamento HTS del gene 16S rRNA, in particolare per le determinazioni di batteri e cianobatteri (Fig. 14). La pipeline si basa sull'identificazione delle sequenze esatte (Amplicon Sequence Variants, ASVs) utilizzando l'approccio DADA2. Il protocollo e le sequenze test possono essere scaricati da Zenodo

Protocollo:

<https://doi.org/10.5281/zenodo.5232772>

File test:

<https://doi.org/10.5281/zenodo.5215815>

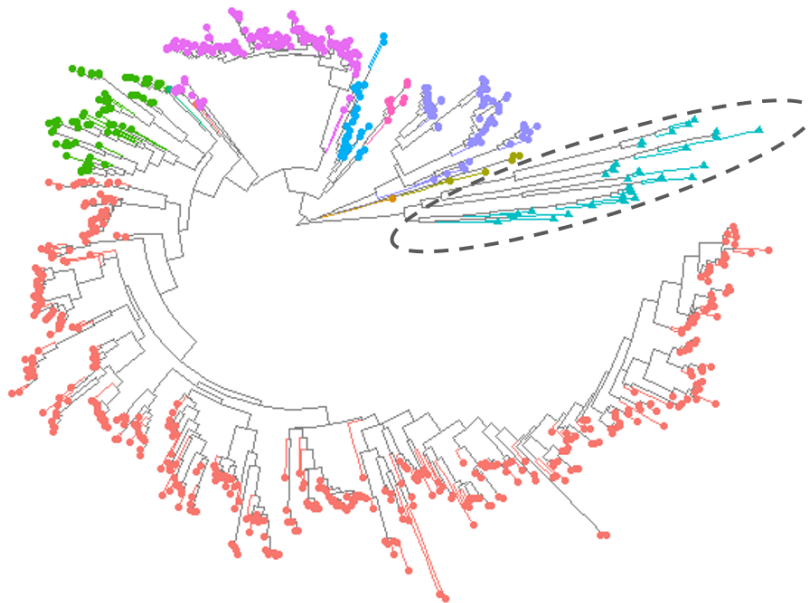


Fig. 14. Albero filogenetico basato sull'allineamento del gene 16S rRNA (ca. 400 bp) ottenuto dalle analisi HTS effettuate sui campioni raccolti nella Regione alpina. Nell'analisi sono state incluse solo le sequenze più abbondanti (ASVs). In confronto alle tecniche tradizionali, gli approcci di metagenomica ambientale permettono di esplorare gruppi prima non rilevabili, come i batteri non-fotosintetici (linea grigia tratteggiata). Altri gruppi più numerosi includono le Cyanobacteriales (arancione), Limnotrichales (verde) e Synechococcales (magenta).



Pipeline bioinformatica per i protisti (gene 18S rRNA)

Analisi bioinformatica dei protisti (incluse le microalghe) con l'utilizzo del gene 18S rRNA e la pipeline DADA2

Questo protocollo descrive in dettaglio le fasi principali della pipeline bioinformatica applicata per analizzare i dati HTS del gene 18S rRNA, in particolare per il metabarcoding di protisti e microalghe (Fig. 15). La pipeline si basa sull'identificazione delle sequenze esatte (Amplicon Sequence Variants, ASVs) utilizzando l'approccio DADA2. Il protocollo e le sequenze test possono essere scaricati da Zenodo.

Protocollo:

<https://doi.org/10.5281/zenodo.5233527>

File test:

<https://doi.org/10.5281/zenodo.5215919>

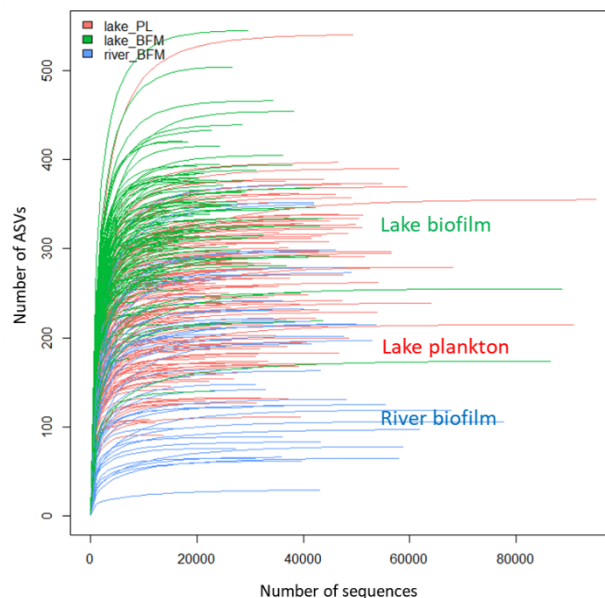


Fig. 15. Curve di rarefazione per i protisti e i funghi. Le curve mostrano l'aumento del numero di ASVs all'aumentare del numero di sequenze. La rarefazione è usata per stimare la ricchezza di ASVs a partire da un dato numero di sequenze, permettendo la normalizzazione delle abbondanze tra i campioni. Nella figura, ogni curva corrisponde ad un singolo campione. Mediamente, il maggior numero di ASVs è stato trovato nel biofilm dei laghi.



VI. Armonizzazione degli approcci tra Europa e Svizzera

L'utilizzo di approcci e protocolli transnazionali comuni per il monitoraggio della qualità delle acque nella Regione alpina è uno degli obiettivi principali del progetto Eco-AlpsWater. In questo ambito, la maggior parte dei paesi adotta metodi nazionali/regionali conformi alla WFD. Ciò nonostante, sono state evidenziate molte differenze tra i paesi. Inoltre, la Svizzera, come paese non UE, applica metodi basati sull'Ordinanza svizzera sulla protezione delle acque (WPO, Water Protection Ordinance). L'armonizzazione degli approcci per la valutazione della qualità delle acque nella Regione alpina è stata pertanto ritenuta un'azione necessaria nell'ambito del progetto Eco-AlpsWater. In particolare, al fine di sviluppare un approccio di monitoraggio di nuova generazione condiviso tra i paesi dello spazio alpino, i partners del consorzio hanno valutato come e dove gli approcci innovativi basati sull'eDNA e le tecnologie HTS potrebbero colmare le lacune e le debolezze dei metodi tradizionali.

Il confronto dei metodi adottati nella determinazione dello stato ecologico è stato effettuato utilizzando specifici elementi di qualità biologica (fitoplancton, fitobentos e pesci) determinati in sei laghi (Bled, Bourget, Garda, Lugano, Mondsee e Starnberg) e cinque fiumi (Adige, Drome, Soča, Steyr e Wertach) selezionati come siti pilota nel progetto Eco-AlpsWater. Questa ampia indagine nella Regione alpina ha evidenziato le debolezze e la potenziale implementazione dei nuovi approcci all'interno e tra paesi, nel contesto dei precedenti processi di intercalibrazione.

Requisiti della EU-WFD e della CH-WPO

I paesi della Regione alpina, appartenenti all'UE, adottano metodi regionali/nazionali basati sulla WFD. Negli ultimi anni sono stati effettuati dei processi di intercalibrazione (IC) che hanno permesso un'armonizzazione degli approcci tra i paesi (ad es. per il fitoplancton). Nonostante in ogni paese siano utilizzati indici differenti, in tutti la valutazione dello stato ecologico è definita attraverso cinque classi di qualità (Elevato, Buono, Sufficiente, Scarso, Cattivo) per un corretto confronto dei corpi idrici: <https://ec.europa.eu/environment/pubs/pdf/factsheets/water-framework-directive.pdf>

In Svizzera è stato sviluppato un sistema basato su moduli e livelli (Modular Stepwise Procedure) che prevede classi di qualità così come il sistema definito nella WFD. Sulla base della WPO, l'Ufficio federale dell'ambiente (UFAM) ha sviluppato dei metodi per la determinazione dello stato ecologico attraverso l'uso di elementi di qualità biologica (EQB). Tuttavia, questi protocolli rappresentano delle linee guida per i Cantoni, che hanno il potere legislativo di decidere i termini della loro applicazione sul proprio territorio. Ad oggi, sono stati pubblicati solo i metodi per l'analisi delle diatomee e dei pesci nei corsi d'acqua. Tuttavia, ogni Cantone nel corso degli anni ha applicato anche protocolli interni (ad es. per il fitoplancton) e la standardizzazione a livello federale è attualmente in corso.



Inoltre, le acque transfrontaliere (Svizzera-UE) sono sotto il controllo di commissioni internazionali (es. CIP AIS, CIPEL, IGKB) che hanno obiettivi specifici e prevedono diversi tipi di indicatori di qualità, a volte in contrasto con i requisiti della WFD e della WPO. Per esempio, nel Lago di Lugano (Svizzera e Italia) le condizioni di riferimento variano a seconda delle direttive coinvolte: nella WFD, si dovrebbe raggiungere o mantenere un buono stato ecologico; nella WPO, si dovrebbe raggiungere uno stato ecologico simile al naturale, con una diversità e abbondanza di specie tipiche delle acque non inquinate o poco inquinate; nella CIP AIS lo stato di riferimento è rappresentato da condizioni mesotrofiche. Pertanto, i diversi sistemi adottati in Svizzera per la valutazione della qualità delle acque sono un chiaro esempio della necessità di attivare procedure finalizzate ad una maggiore armonizzazione degli approcci.

Oltre alla Svizzera, l'indagine condotta nel progetto dapprima nei laghi e corsi d'acqua pilota e poi in altri corpi d'acqua addizionali e rappresentativi di tutta la Regione alpina ha evidenziato anche delle differenze tra i paesi dell'UE nell'applicazione della WFD. In alcuni paesi, la standardizzazione dei metodi per alcuni EQB è ancora in fase di sviluppo o non ancora iniziata. Le principali differenze riguardano il fitobentos, il cui metodo è in fase di ottimizzazione. A seguire, riportiamo una sintesi dell'applicazione dei metodi per la valutazione della qualità delle acque basati sugli EQB (Tabella 1) e similarità e differenze nei metodi applicati (Tabella 2) nella Regione alpina.

Tabella 1. Una sintesi dell'applicazione dei metodi per la valutazione della qualità dell'acqua basati su EQB nella Regione alpina (fitoplancton, diatomee bentoniche e microalghe, e pesci).

Regione alpina		Fitoplancton	Diatomee bentoniche	Microalghe bentoniche (escluse le diatomee)	Pesci
Austria	Laghi	sì	no	sì	sì
	Fiumi		sì	sì	sì
France	Laghi	sì	no*	no	sì
	Fiumi		sì	no	sì
Italy	Laghi	sì	sì	no	sì
	Fiumi		sì	sì †	sì
Germany	Laghi	sì	sì	no	sì
	Fiumi		sì	no	sì
Slovenia	Laghi	sì	sì	sì ††	sì
	Fiumi		sì	sì ††	sì
Switzerland	Laghi	sì°	no	no	no
	Fiumi		sì	no	sì

* metodo in fase di sviluppo

° metodo applicato a livello cantonale

† le microalghe bentoniche si considerano nel monitoraggio delle macrofite dei fiumi quando formano aggregati macroscopici

†† limitato ad alcuni gruppi algali



Il confronto dettagliato dei metodi per gli EQB adottati nei laghi e corsi d'acqua pilota del progetto ha mostrato una buona coerenza, che supporta la proposta di armonizzazione. Come riportato nella tabella precedente, il metodo adottato per il monitoraggio del fitoplancton nei laghi è quasi interamente condiviso tra i paesi della Regione alpina, ad eccezione della frequenza di campionamento. Come discusso in precedenza, invece il monitoraggio del fitobentos è in fase di ottimizzazione, e alcuni paesi applicano questo EQB esclusivamente per lo studio dei corsi d'acqua. Inoltre, alcuni paesi analizzano anche le alghe verdi filamentose (ad es. la Slovenia), mentre la maggior parte di essi considerano esclusivamente le diatomee bentoniche. Altri due aspetti fondamentali variano nel monitoraggio del fitobentos: il numero di stazioni e la frequenza di campionamento. Queste caratteristiche variano anche nel monitoraggio dei pesci.

Tabella 2. Similarità e differenze nei metodi di biomonitoraggio di laghi e corsi d'acqua nella Regione alpina (fitoplancton, fitobentos e pesci).

Elementi biologici		Similarità	Differenze
Fitoplancton	Laghi	Punto di campionamento (max. profondità) Profondità di campionamento (epilimnio/prof. eufotica) Biovolume (Utermöhl) e Clorofilla-a (ISO) Livello di identificazione (Specie)	Frequenza di campionamento
	Fiumi	Periodo di campionamento Caratteristiche del sito di campionamento Tipo di substrato Habitat Livello di identificazione (Specie/Genere)	Comunità biologica (microalghe bentoniche in aggiunta alle diatomee) Numero di stazioni Frequenza di campionamento
Fitobentos	Laghi	Periodo di campionamento Tipo di substrato Habitat Livello di identificazione (Specie/Genere)	Comunità biologica (microalghe bentoniche in aggiunta alle diatomee) Numero di stazioni Frequenza di campionamento
	Fiumi	Periodo di campionamento Caratteristiche del sito di campionamento Tipo di substrato Habitat Livello di identificazione (Specie/Genere)	Comunità biologica (microalghe bentoniche in aggiunta alle diatomee) Numero di stazioni Frequenza di campionamento
Pesci	Laghi	Periodo di campionamento Strategia di campionamento Livello di identificazione (Specie)	Numero di stazioni (superficie/profondità)
	Fiumi	Periodo di campionamento Strategia di campionamento Habitat Livello di identificazione (Specie)	Numero di stazioni Frequenza di campionamento



Le differenze evidenziate supportano l'uso delle tecnologie HTS per il miglioramento e l'armonizzazione degli approcci di biomonitoraggio nella Regione alpina. Oltre alle potenzialità delle tecnologie HTS nello studio della biodiversità, la metagenomica potrebbe aiutare ad esempio ad aumentare la copertura spazio-temporale e tassonomica nel monitoraggio, riducendo i tempi e i costi delle analisi. Per questo motivo, al fine di esplorare a fondo la biodiversità degli ecosistemi acquatici e ampliare le liste di specie, i protocolli EAW sono stati adattati al monitoraggio tradizionale (WFD/WPO). Questo processo è stato possibile grazie alla cooperazione con gli observers e gli stakeholder del progetto, che hanno fornito feedback e suggerimenti per l'ottimizzazione degli approcci proposti.

Approcci di monitoraggio di nuova generazione

L'integrazione dei metodi innovativi basati sull'analisi dell'eDNA e tecnologie HTS nel monitoraggio per la valutazione della biodiversità e dello stato ecologico dei corpi idrici è stata accolta positivamente dagli stakeholders e dagli enti competenti. Sono stati in particolare identificati i seguenti potenziali vantaggi e opportunità:

- Un singolo campionamento fornisce più informazioni
- Aumento della copertura spazio temporale nel monitoraggio
- Possibilità di campionare aree difficilmente raggiungibili o ambienti complessi
- Analisi di una maggiore biodiversità, includendo quei gruppi biologici la cui tassonomia è complessa e richiede tempo e quei taxa che ancora non vengono monitorati. Si possono quindi ottenere liste tassonomiche più estese e rispondere ad ulteriori domande ecologiche.
- Identificazione di specie alloctone e autoctone (per es. specie rare o di recente introduzione)
- Identificazione di patogeni e vettori virali
- Tecniche meno invasive (per es. pesci o ecosistemi vulnerabili)
- Tecniche rapide ed economiche (analisi simultanea di numerosi campioni)

Tutti questi aspetti favorevoli supportano l'uso dell'approccio eDNA come strumento complementare ai metodi esistenti per la valutazione dello stato ecologico e la gestione delle acque, e come un sistema per facilitare l'armonizzazione degli approcci UE e CH. Per raggiungere questo obiettivo, sono necessarie strategie nazionali, tra cui una standardizzazione degli approcci basati sull'eDNA, la creazione di banche dati di riferimento esaustive, e l'acquisizione di nuove competenze da parte delle agenzie ambientali incaricate del monitoraggio della qualità delle acque. In conclusione, l'approccio innovativo transnazionale rappresenta un elemento strategico volto a migliorare la protezione, la conservazione e la connettività ecologica degli ecosistemi dello Spazio Alpino, ed inoltre possiede il potenziale di applicazione su ampia scala a livello europeo.



VII. FAQ – prospettive generali e scientifiche

Abbiamo raccolto le domande più frequenti (frequently asked questions, FAQ) sull'approccio basato sul metabarcoding durante i nostri incontri con gli stakeholders. Qui forniamo risposte più generali, ma potete trovare anche risposte più mirate nella nostra pagina web dedicata alle FAQ ([FAQ Catalogue](#)).

Perché sono stati usati diversi primer nell'approccio di metabarcoding Eco-AlpsWater?

Abbiamo utilizzato diverse coppie di primers perché sono state utilizzate diverse regioni target del DNA per distinguere gli organismi. Le relazioni filogenetiche degli organismi biologici indicatori come batteri, microalghe e pesci non è stretta.

Cosa impedisce di raggiungere una risoluzione tassonomica fine (a livello di specie) con l'approccio di metabarcoding Eco-AlpsWater per le microalghe?

Le microalghe appartengono a phyla molto diversi dell'albero evolutivo. Pertanto, abbiamo usato marker generalisti per rilevare l'intera comunità microbica (batteri e microalghe). Questi marker hanno identificato molte specie sconosciute, ma al tempo stesso non sono riusciti a rilevare gruppi circoscritti di specie indicatrici tradizionali. Inoltre, molte specie descritte in letteratura non sono ancora rappresentate nei database di riferimento molecolare.

Come confrontare le liste tassonomiche con un mix di specie, generi e ordini?

Entrambi i metodi HTS e microscopia ottica possono rilevare lo stesso genere, ma specie diverse, oppure fermarsi al solo genere. Lo strumento "taxa analysis tool" del progetto Eco-AlpsWater fornisce tabelle di corrispondenza a livello di genere o specie separatamente per cianobatteri ed eucarioti.

Come interpretare il nome della specie associata a diverse sequenze di DNA negli output del metabarcoding?

Il numero di sequenze di DNA (amplicon sequence variants, ASV, o oligotipi), che appartengono a una specie unica (taxon), è un indicatore della diversità genetica intra-specifica (intra-taxon). Lo strumento di analisi dei taxa Eco-AlpsWater riunisce tutte le sequenze che appartengono allo stesso taxon e aggrega il risultato in un record "presente".

Come seleziono i miei taxa target? Vedo le liste di output del metabarcoding con molti taxa, che però non conosco.

I nomi dei taxa nelle liste di output del metabarcoding sono aggiornati, e quindi molti nomi possono essere nuovi per l'utente. Gli utenti hanno familiarità solo con quelli del monitoraggio tradizionale in cui i nomi dei taxa spesso sono sinonimi dei nomi aggiornati dei taxa e raggruppati in una sistematica



tradizionale, non sempre aggiornata. Per permettere il confronto tra le liste, i codici comuni e i nomi dei taxa per il fitoplancton e le diatomee bentoniche sono usati nello strumento "taxa analysis tool" del progetto Eco-AlpsWater.

Per quanto tempo l'eDNA resiste in acqua? L'eDNA di diversi organismi resiste per tempi diversi? Per quanto tempo un organismo morto può espellere il suo eDNA?

Con il termine "DNA ambientale" (eDNA) intendiamo nel nostro progetto l'intero materiale ereditario di tutti gli organismi che sono (o sono stati) presenti in un ambiente. Questo materiale genetico può derivare direttamente dalle cellule dei microrganismi che vengono raccolti insieme all'acqua (per esempio alghe microscopiche o batteri). In organismi più grandi (ad es. pesci o esseri umani), il DNA viene rilasciato nell'ambiente attraverso le secrezioni corporee, la pelle morta, i capelli e altro materiale organico e può essere conservato sotto forma di molecole di DNA nell'ambiente acquatico per diversi giorni o addirittura settimane. La stabilità del DNA nell'ambiente acquatico dipende dalle condizioni dell'ambiente (temperatura, pH, ossigeno, luce altre sostanze nell'acqua). Se il DNA è intrappolato nei sedimenti sul fondo dei corpi idrici, può rimanere lì per anni o decenni; in alcuni casi anche millenni, e può essere usato per le ricerche paleoecologiche.

Perché avete escluso le macrofite e gli invertebrati bentonici da tutti i parametri biologici?

A causa di vincoli finanziari del progetto, questi due elementi biologici, altrimenti estremamente importanti, non sono stati inclusi.

Può il gene 18S rRNA rilevare Euglena e le altre euglenales?

In generale, nessuna coppia di primers può amplificare allo stesso modo le sequenze di tutti i protisti. La coppia di primers specifica che è stata scelta per amplificare il gene dell'rRNA 18S non è stata in grado di rilevare le euglenales nei campioni di acqua. Invece, stiamo usando le informazioni dal gene rRNA 16S presente nei cloroplasti per rilevare questo gruppo.

Quale livello tassonomico è raggiungibile con i marker scelti nel progetto?

Ciò dipende dai gruppi di organismi e dalle regioni genetiche selezionate e dalla completezza dei database di riferimento. Mentre i marcatori genetici per le diatomee sono altamente curati e specializzati, i marcatori per i batteri e il fitoplancton sono più generali. Pertanto, il primo marcatore (rbcl) può fornire classificazioni maggiormente dettagliate, mentre il secondo gruppo di marcatori (16S e 18S rRNA) rileva principalmente generi o ranghi tassonomici superiori. Per identificare gli organismi a livello di specie, dovrebbero essere utilizzati primers molto specifici in relazione a specifici database di riferimento tassonomico. Per sfruttare appieno le informazioni presenti nelle sequenze, dovrebbero inoltre essere eseguite ulteriori analisi filogenetiche a supporto e complemento delle classificazioni ottenute dalla pipelines bioinformatiche o dalle analisi BLAST.



Quali taxa sono stati rilevati per ogni marker nella serie di dati prodotti nel progetto Eco-AlpsWater?

L'elenco completo dei taxa e dei genotipi rilevati utilizzando la metodologia HTS nella serie di dati prodotta nel progetto Eco-AlpsWater è riportato nella lista tassonomica HTS di ogni marker. Se ci focalizziamo sulle specie o generi degli elementi biologici (collegati ai codici comuni Eco-AlpsWater), abbiamo rilevato 88 taxa di cianobatteri, 582 taxa di fitoplancton (esclusi i cianobatteri), 226 taxa di diatomee e 54 taxa di pesci, molti dei quali con diversi genotipi. Le liste sono incluse nello strumento "taxa analysis tool" del progetto Eco-AlpsWater.

Quali requisiti logistici sono necessari quando si campiona l'eDNA da campioni di plancton?

Nel progetto Eco-AlpsWater viene raccomandato l'uso di filtri incapsulati sterili (Sterivex), bottiglie DNA-free e guanti per ridurre le contaminazioni, ma tutti i dettagli sono descritti nel nostro video YouTube e nei protocolli di campionamento. Nei nostri test, la conservazione dei filtri a -20°C fino all'estrazione del DNA per un massimo di 9 mesi ha avuto successo.

Chi mi aiuta a interpretare i risultati HTS quando dei taxa sconosciuti vengono rilevati?

Ulteriori analisi, come le query BLAST, possono fornire una comprensione più profonda dei taxa e dei gruppi tassonomici strettamente correlati. Migliori database genetici di riferimento, che sono curati per un gruppo tassonomico specifico e/o eco-regioni, possono aumentare l'accuratezza delle classificazioni delle specie.

In cosa consiste l'analisi BLAST eseguita per i cianobatteri?

Per i cianobatteri e altri gruppi tassonomici, l'assegnazione automatica dei taxa è stata migliorata utilizzando sequenze di riferimento prese dalla letteratura specializzata, ovvero utilizzando degli isolati (morfologicamente descritti) e blast manuali per le sequenze ASVs dei cianobatteri. I cambiamenti nel nome dei taxa per le sequenze 16S (ASVs) dei cianobatteri derivate dalle analisi BLAST sono stati contrassegnati nello strumento "taxa analysis tool" del progetto Eco-AlpsWater.

Come funziona il metodo per l'eDNA dei pesci basato sulle cartucce filtranti VigiDNA®?

VigiDNA® è il nome del prodotto delle cartucce filtranti utilizzate nel progetto Eco-AlpsWater per analizzare la biodiversità dei pesci nelle acque alpine. Queste cartucce filtranti incapsulate (VigiDNA®, Spygen®) sono utilizzate per filtrare grandi volumi di acqua (30 litri e oltre) raccolti nelle zone litorali dei laghi o al centro dei corsi d'acqua. Dopo la filtrazione, la cartuccia filtrante è riempita con una soluzione conservante e mantenuta a temperatura ambiente fino all'estrazione del DNA.



Quale tipo di fiume è adatto all'analisi con il sistema VigiDNA®?

Fondamentalmente, questo sistema è adatto a qualsiasi tipo di fiume e permette di filtrare fino a 30 litri di acqua con una sola cartuccia. Tuttavia, l'uso in fiumi con un maggiore carico di particelle nell'acqua potrebbe essere impegnativo, poiché i sedimenti fini possono causare l'intasamento del filtro prima che i 30 litri desiderati siano stati filtrati. Pertanto, è consigliabile scegliere con cura i periodi da campionare. Per esempio, i campioni non dovrebbero essere raccolti durante o poco dopo eventi alluvionali.

Quale coppia di primers è stata utilizzata per l'analisi dell'eDNA dei pesci?

Per il sequenziamento dei campioni di eDNA dei pesci, sono stati utilizzati i primers MiFish-U. Questa coppia di primers è regolarmente utilizzata negli studi di metabarcoding dei pesci.

Il rilevamento dell'eDNA può essere assegnato ad una sezione specifica del fiume?

Questo dipende dal progetto di campionamento. Poiché l'eDNA viene trasportato a valle, solo le specie di pesci che si trovano a monte del punto di campionamento possono essere rilevate nelle analisi.

Si può dedurre il numero di individui dalla frequenza delle sequenze rilevate per ogni specie?

No, ad oggi non è possibile stimare con precisione le abbondanze assolute di diverse specie di pesci basate sul numero di sequenze rilevate.

Quali approcci sono stati utilizzati nel progetto Eco-AlpsWater per la valutazione dell'eDNA dei pesci?

Sono stati utilizzati 3 approcci diversi. L'approccio VigiDNA, in cui 30 litri di acqua sono stati filtrati attraverso una cartuccia filtrante chiusa. L'approccio di campionamento puntuale Sterivex® (0.45 µm di porosità), in cui 2 litri d'acqua sono stati raccolti all'inizio, a metà e alla fine di ogni transetto campionato con VigiDNA nella zona litorale dei laghi. Ed infine un approccio di campionamento puntuale GFC (filtro in fibra di vetro, porosità nominale di 1.2 µm), in cui sono stati raccolti 5 litri d'acqua nei siti di campionamento tradizionali.



Unisciti al network nello spazio alpino Eco-AlpsWater:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/en/project-results/Eco-AlpsWater-alpine-network>

e segui tutte le nostre attività Eco-AlpsWater!



Questa brochure è stata creata come parte del progetto Eco-AlpsWater, che è stato in parte finanziato dal Fondo Europeo Sviluppo Regionale della Comunità Europea (sostegno EU: € 1,447,666.54). Il progetto è stato implementato all'interno del Programma INTERREG Spazio Alpino per la Cooperazione Transnazionale (2014-2020).