

Eco-AlpsWater



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

Priority 3: Liveable Alpine Space. SO3.2 - Enhance the protection, the conservation and the ecological connectivity of Alpine Space

Metodi di campionamento per la metagenomica



ARPAV

Dipartimento Regionale Laboratori

Chiara Zampieri

Giorgio Franzini, Giampaolo Fusato, Federica Giacomazzi

Roma – 16 ottobre 2019

FITOPLANCTON



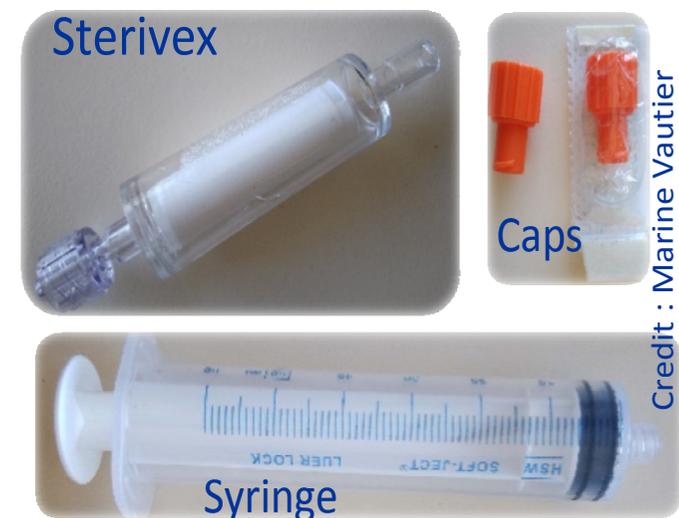
- confronto delle liste di fitoplancton risultanti dai metodi di campionamento e analisi tradizionali con le liste risultanti dall'analisi dell'eDNA
- la strategia di campionamento è simile a quella tradizionale incentrato sulla zona eufotica, tuttavia la procedura per la filtrazione e la conservazione è adattata per i campioni di DNA
- il protocollo è parte del deliverable fornito dal WP1 del Progetto EcoAlpsWater
- tutti i membri del consorzio EcoAlpsWater (che coinvolge 12 partner) hanno contribuito all'ottimizzazione di questo protocollo

FITOPLANCTON



Materiali specifici per la preparazione di campioni per analisi di eDNA:

- guanti
- filtri Sterivex (0.22 μm) e relativi tappi
- siringhe sterili con attacco Luer (50 ml)
- contenitori e sacchetti sterili
- borsa termica con ghiaccio



Credit : Marine Vautier

FITOPLANCTON



precauzioni specifiche:

- ridurre le contaminazioni durante tutte le fasi, usando guanti, contenitori e sacchetti sterili;
- ridurre l'esposizione alla luce solare, se possibile.

dove e quando:

- stazioni di monitoraggio già utilizzate, zona eufotica
- una volta al mese per 2 anni per i 6 laghi pilota e almeno 1 volta per anno durante il periodo estivo per 2 anni per gli altri siti

FITOPLANKTON



Metodo di campionamento:

- raccolta campione di acqua rappresentativa della zona eufotica;
- omogeneizzare delicatamente l'acqua del campione & riempire la siringa (100 ml);
- collegare la siringa con il filtro Sterivex e filtrare (lentamente) il campione di acqua attraverso l'unità Sterivex;

FITOPLANCTON



Eco-AlpsWater

European Regional Development Fund



Metodo di campionamento:

- filtrare da 100 ml a 1 litro: il volume di acqua filtrata dipende dal carico microbico e torbidità del campione d'acqua;
- ripetere la filtrazione (con la stessa siringa e filtro sterivex) per filtrare quanto più volume possibile e annotare il volume finale (il processo di filtrazione non dovrebbe durare più di 15 minuti);
- chiudere ingresso e uscita del filtro con i relativi tappi;
- posizionare lo Sterivex in un sacchetto, conservarlo nel ghiaccio e congelare il prima possibile a -20°C

FITOPLANCTON



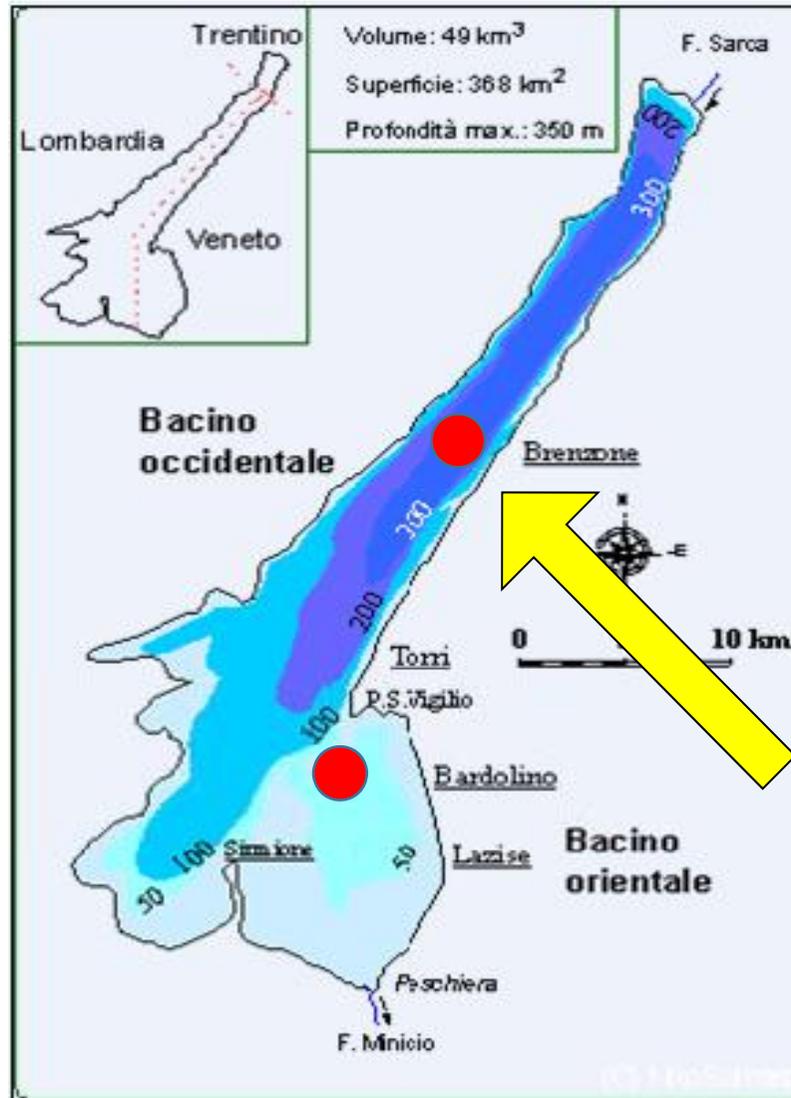
- etichettare il campione con: “ Plancton ” , “ Nome del lago ” , "Stazione", "Layer", “ Data ” , “ volume (mL) ” e compilare un foglio di campo

Lake Name		
-----------	--	--

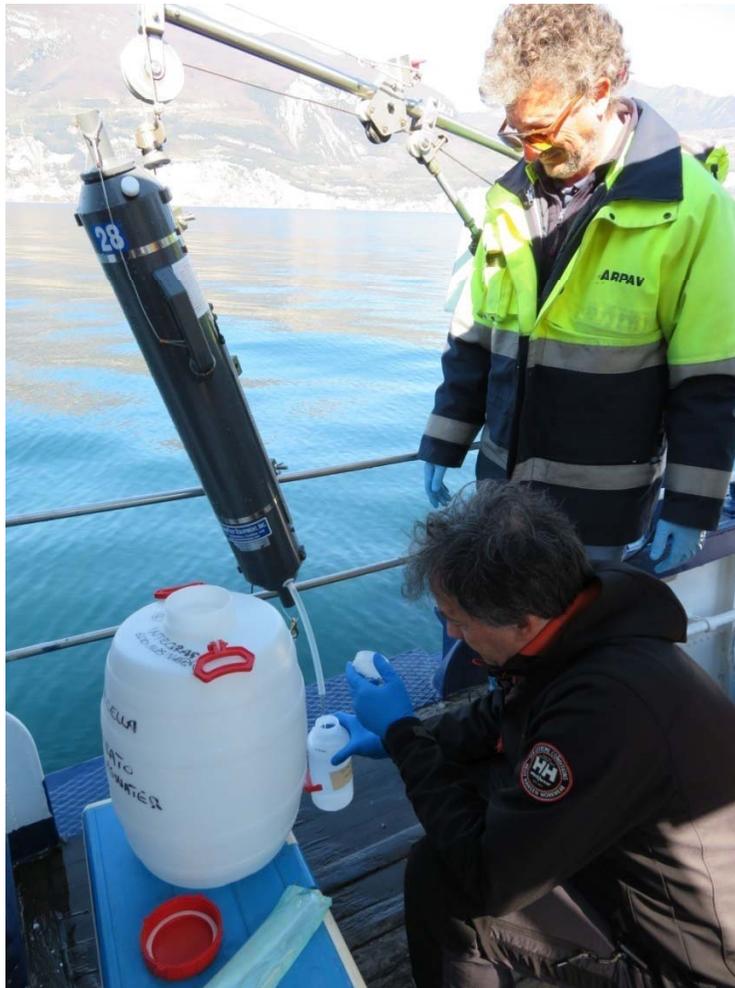
		Specific comments
Lake Station		
GPS Coordinates	Longitude (X) : Latitude (Y):	
Sampling date & time		
Secchi depth		
Euphotic zone (depth in m)	<input type="checkbox"/> Sensor measurement : <input type="checkbox"/> Secchi depth conversion factor :	

DNA filtration		Specific comments
Vol. of water filtered (mL)		
Time of filtration		
Duration of filtration (min)		
Location of filtration	<input type="checkbox"/> On-site <input type="checkbox"/> laboratory	
Color of filter		

FITOPLANCTON



FITOPLANCTON



DIATOMEAE



- confronto delle liste di diatomee risultanti dai metodi di campionamento e analisi tradizionali con le liste risultanti dall'analisi dell'eDNA
- la strategia di campionamento è in accordo con la norma UNI 13946:2014 per l'analisi di routine di diatomee bentoniche dai fiumi e laghi
- il protocollo è parte del deliverable fornito dal WP1 del Progetto EcoAlpsWater
- tutti i membri del consorzio EcoAlpsWater (che coinvolge 12 partner) hanno contribuito all'ottimizzazione di questo protocollo

DIATOMEE

Materiali specifici per la preparazione di campioni per analisi di eDNA:

- spazzolini sterili
- guanti
- baccinelle sterili
- etanolo assoluto e acqua millipore
- provette Falcon sterili (50 ml)



DIATOMEE



quando e dove campionare sui fiumi:

- i campionamenti devono essere fatti durante la stagione di basso flusso del corpo idrico in condizioni di acqua limpida (attenzione agli eventi di secca o di alluvione)
- stazioni preesistenti definite dalle agenzie ambientali responsabili del monitoraggio del fiume

quando e dove campionare sui laghi:

- i campionamenti devono essere effettuati durante l'estate, visto che è la stagione con l'eterogeneità più alta tra le comunità presenti lungo il litorale (attenzione all'ombreggiamento del sito, al vento e alle fluttuazioni del livello dell'acqua)
- stazioni preesistenti definite dalle agenzie ambientali responsabili del monitoraggio del lago

DIATOMEE



Metodo di campionamento su fiumi e laghi:

- precauzioni per assicurare la sterilità in tutte le fasi;
- metodo applicabile solo in presenza di sassi, ciottoli;
- procedere con il campionamento classico e dal materiale biologico ottenuto (miscela di biofilm e acqua) ricavare il subcampione per l'analisi del DNA in questo modo:

DIATOMEAE



Metodo di campionamento:

- prelevare la miscela di biofilm e acqua dal vassoio e riempire la provetta fino a 10 ml;
- aggiungere etanolo assoluto fino a 50 ml (aggiungere ~ 40 ml di etanolo assoluto)
- agitare per omogeneizzare, etichettare
- conservare i campioni a 4 ° C al buio per un massimo di 1 mese, oppure congelarli a -20 o -80 ° C per un massimo di 3 mesi

DIATOMEE



European Regional Development Fund

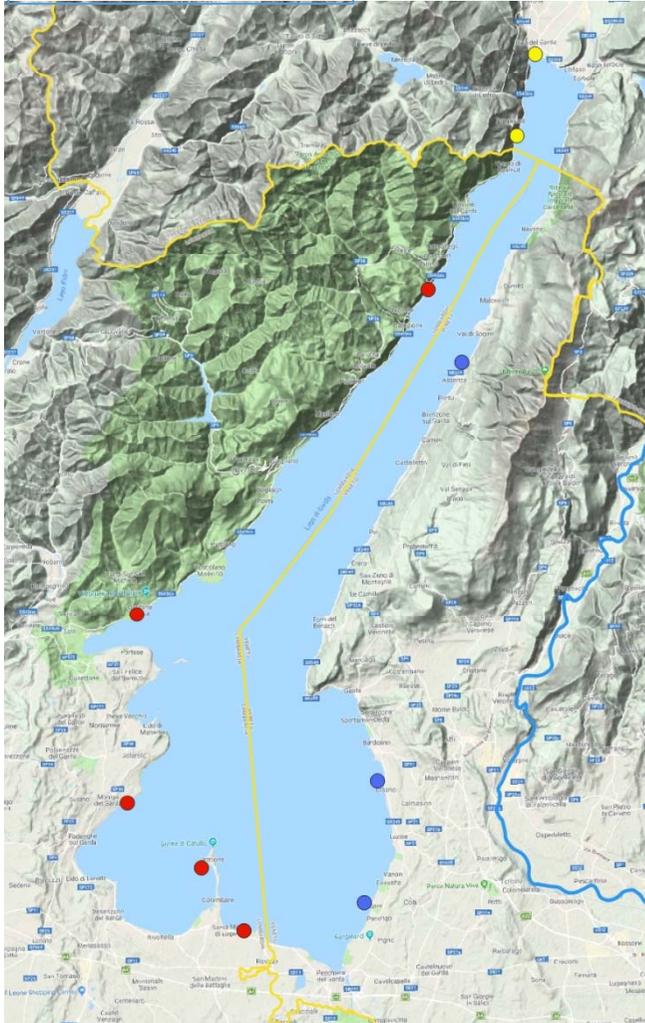


Biofilm sampling - river		ECO-ALPSWATER INTERREG	
Station code			
Name of the river			
Name of the sampling site			
Sampling date			
Time			
Sampling person name			
Location of biofilm sampling vs limnometric scale		GPS coordinates	
Height on limnometric scale (cm)		X:	
		Y:	
Sampling at the planned site <input type="checkbox"/> yes / <input type="checkbox"/> no			
Comment about the sampled site:		Position VS site of GPS measure	
Access to site (explain)			
Precise location (River kilometre, nearest place, municipality...):			
Average width of the water (m) <i>(estimated / measured)</i>			
Average sunshine of the sampled site <10% / 10 à 50% / 50 à 90% / >90%			
Previous hydrological situation Water raisedays before / no significant rain since days / other :			
Apparent hydrological situation flood / full or nearly full bed / medium water / low water / water holes, puddles / no water			
Mean Flow Velocity (estimate)			
Flow-off amount (estimate)			
Observations about the riverbed:			
recalibration		channelisation	
reprofiling		dredging	
rectification		cattle in minor bed	
Clogging clogging of the bottom by mud: Yes / No			
clogging of bottom by sand: Yes / No or other:			
Presence Weir causing a reach upstream: Yes / No			
Ford: Yes / No			
Discharge (Current discharge, discharge forecast (to the extent identifiable) :			
Plant prolifération: <input type="checkbox"/> yes / <input type="checkbox"/> No			
Other observations on the site and its environment			
Comments on sampling: sampling conditions: good / complicated (depth, turbidity)			
Présence of algae on substrates Yes / No <i>if</i>			
yes, on the sampled substrates: Yes / No			
Kind of algae filamentous, turf, in plates, encrusting			
Overall degree of covering of phytobenthos [%]			
Occurrence of other groups of aquatic plant organisms (lichens, mosses, macrophytes)			
Choriotope/habitat distribution [%] estimate			
Presence of sediments Yes / No <i>if</i>			
yes, on the sampled substrates: Yes / No			
Number of substrates sampled:			
Kind of substrates sampled Natural hard substrates: blocks of- 25cm, stones (6-25cm), pebbles (1-6cm)			
Non-natural hard substrates (tile, brick, concrete, metal), plants:			
Sampling material: brush / knife / hoe / hand (plant expression)			
Current facies lotic / lentic			
Morphodynamic facies sampled Lotic channel, Lentic channel, Border, Dead Water, Current, ...			
waterfall			
Distance to bank:			
Depth			
Notes:			

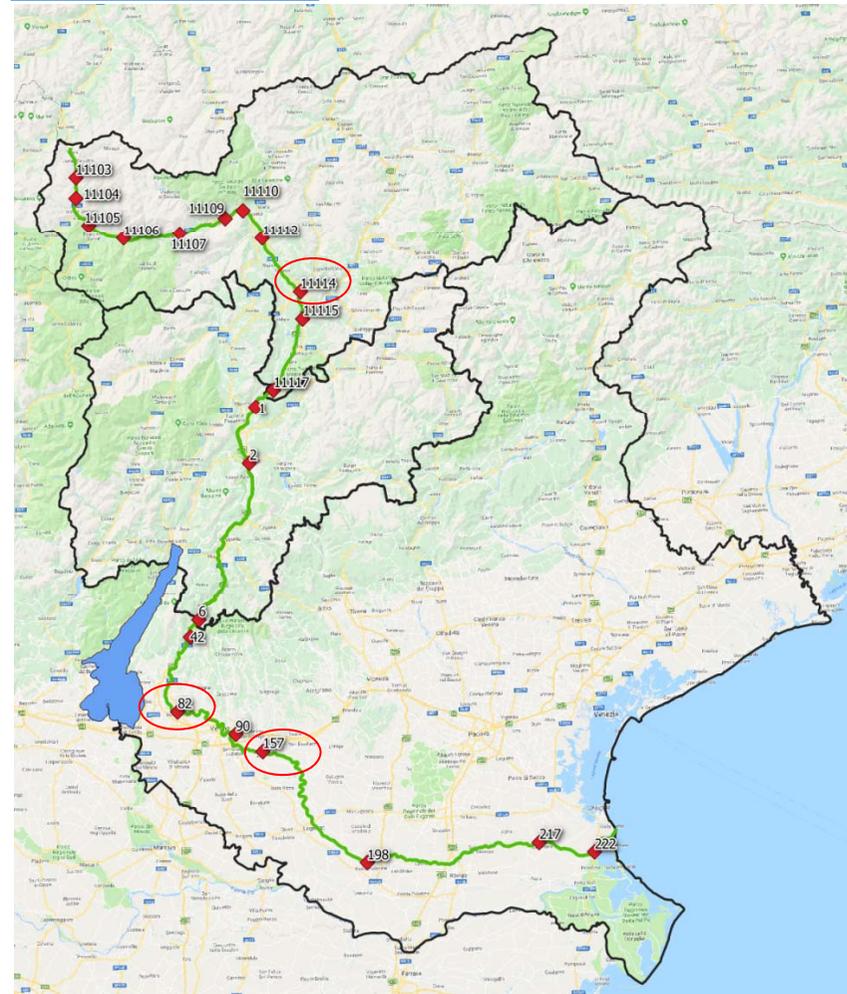
- Predisporre documentazione fotografica e fogli di campo con dati di accompagnamento

DIATOMEE

Lago di Garda



Fiume Adige



DIATOMEE



PESCI



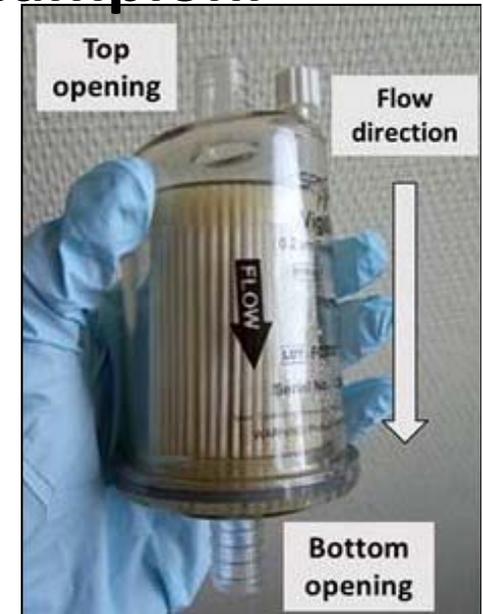
- confronto delle liste di pesci risultanti dai metodi di campionamento e analisi tradizionali con le liste risultanti dall'analisi dell'eDNA
- il campionamento è basato su due principi: 1) raccolta di grandi volumi di acqua (30 l) lungo la linea di costa dei laghi o lungo il flusso principale dei fiumi per rappresentare il corpo idrico e aumentare la possibilità di raccogliere DNA; 2) utilizzo di filtri chiusi per limitare la potenziale contaminazione; la strategia di campionamento varia tra laghi e fiumi e ogni partner deve definirla, sulla base della realtà locale e tenendo conto dei principi generali;
- il protocollo sarà parte del deliverable fornito dal WP1 del Progetto EcoAlpsWater
- tutti i membri del consorzio EcoAlpsWater (che coinvolge 12 partner) stanno contribuendo all'ottimizzazione di questo protocollo

PESCI

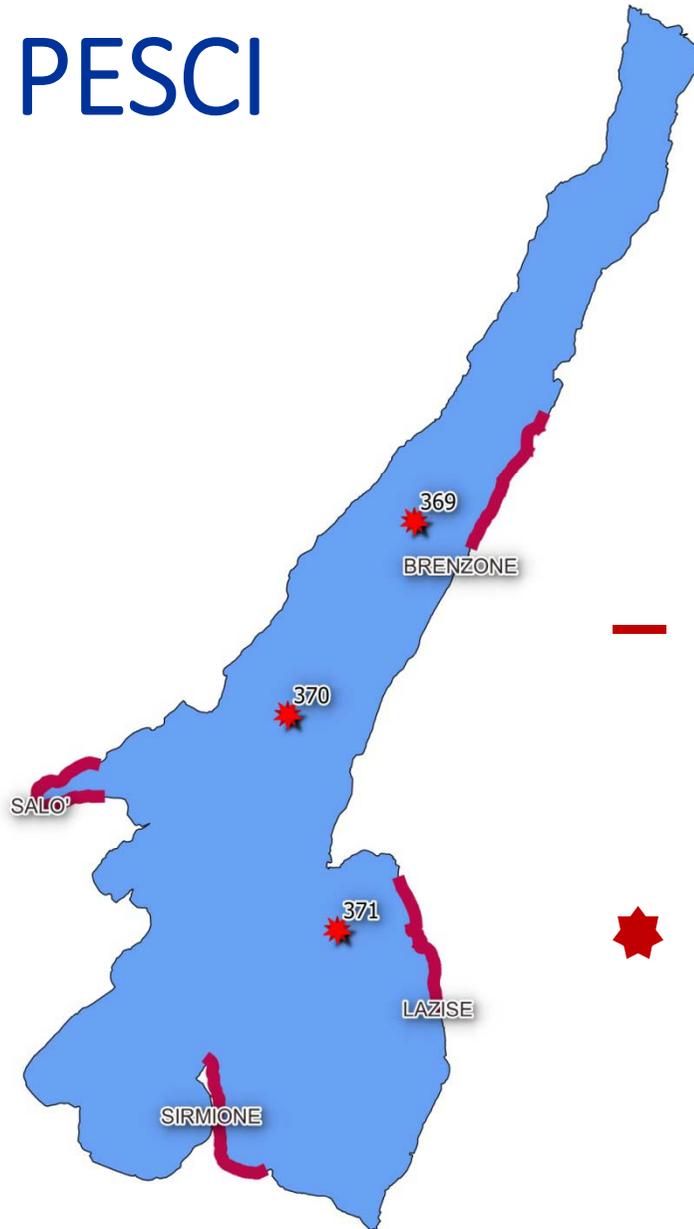


Materiali specifici per la preparazione di campioni per analisi di eDNA:

- kit Spygen contenente:
 - ✓ filtro vigiDNA (0.45 μm) e relativi tappi
 - ✓ tubo in silicone
 - ✓ guanti
 - ✓ soluzione buffer per la conservazione
- sistema di pompaggio a flusso costante (1 l/min)
- borsa termica con ghiaccio



PESCI



Garda - quando e dove:

una volta all'anno (tarda estate) per
2 anni

- Campioni integrati lungo la costa
4 x ≥ 30 L di acqua campionata su transetti di 5 km
(usare 1 filtro per transetto)
- ★ Campioni integrati in zona profonda
3 x 10 L di acqua campionata in zona profonda
(usare 1 filtro per tutti e 3 i campioni)

PESCI



Eco-AlpsWater

European Regional Development Fund



Adige- quando e dove:

- 3 stazioni, posizionate lungo il flusso principale (Bolzano, Trento e Verona);
- campionare 2 repliche da 30 l di acqua da ogni stazione;
- una volta all'anno (estate/autunno) per almeno 2 anni

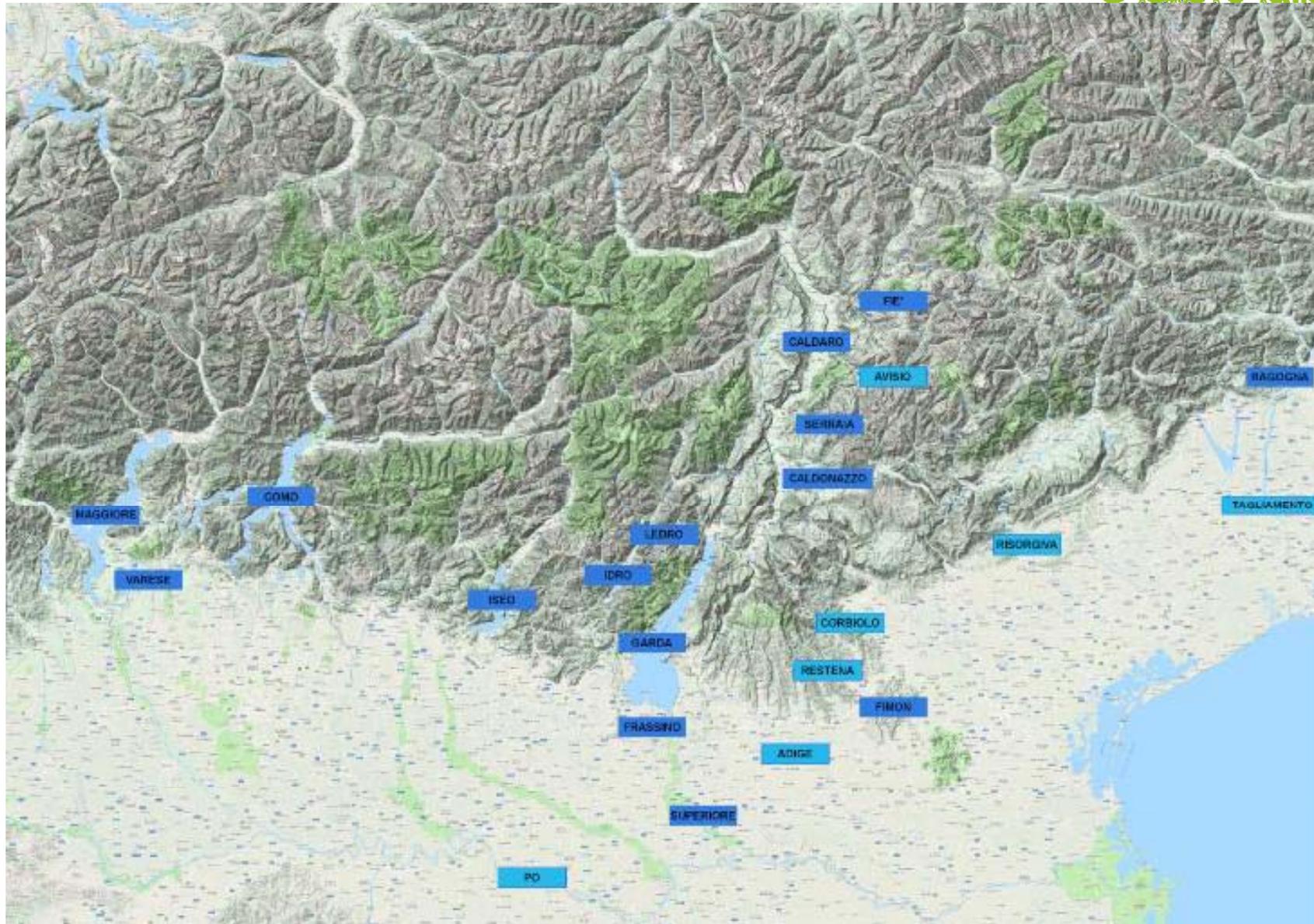
CIANOTOSSINE



Metodo per il campionamento di biomasse algali in acque lacustri e biofilm (laghi e fiumi) da utilizzare per l'estrazione e analisi di cianotossine:

- **Campionamento di acqua di lago:** 2,5 l in bottiglia di vetro scura + 2 l in bottiglia di plastica scura (per peso secco) dallo stesso campione di acqua usato per le analisi dell'eDNA (conservare a 4°C e analizzare entro 12 ore)
- **Campionamento di biofilm su laghi e fiumi:** da un altro set di pietre, raccolte nello stesso sito scelto per i campioni di eDNA, grattare con un bisturi e raccogliere 10 ml + 10 ml (per peso secco) in due provette FALCON (conservare a 4°C e analizzare entro 12 ore)

SITI PILOTA E AGGIUNTIVI



LAGHI ITALIANI MONITORATI



SITI PILOTA		FP (mensile, 2 anni)	DIA (1 campionamento, 2 anni)	PESCI (1 campionamento, 2 anni)	CIANOTOSSINE PELAG + BENT
1	Garda	x	x	x	x
SITI AGGIUNTIVI		FP (1 campionamento, 2 anni)	DIA	Pesci (1 campionamento, 2 anni)	CIANOTOSSINE PELAGICHE
1	Iseo (Lombardia)	x			x
2	Como (Lombardia)	x		x	x
3	Maggiore (Piemonte/Lombardia/CH)	x			x
4	Caldaro (Bolzano)	x			x
5	Caldonazzo (Trentino)	x			x
6	Fié (Bolzano)	x			x
7	Fimon (Veneto)	x			x
8	Frassino (Veneto)	x			x
9	Idro (Trentino/Lombardia)	x			x
10	Ledro (Trentino)	x		x	x
11	Mantova Superiore (Lombardia)	x			x
12	Ragogna (Friuli)	x			x
13	Serraia (Trentino)	x			x
14	Varese (Lombardia)	x			x

FIUMI ITALIANI MONITORATI



SITI PILOTA		DIA (1 campionamento, 2 anni)	PESCI (1 campionamento, 2 anni)	CIANOTOSSINE BENTONICHE
1	Adige	x	x	x
SITI AGGIUNTIVI		DIA (1 anno)	Pesci (1 anno)	CIANOTOSSINE BENTONICHE
1	Corbiolo	x	x	x
2	Restena	x	x	x
3	Risorgiva delle Fontane Bianche	x	x	x
4	Avisio	x	x	x
5	Po		x	
6	Tagliamento	x	(x)	x

Metodi per la metagenomica



Short movie presenting the plankton sampling for eDNA analyses: <https://www.youtube.com/watch?v=du5dfjNQr1E>

Short movie presenting the biofilm sampling for eDNA analyses: <https://youtu.be/6Q48nSMjNA>