



Interreg



Alpine Space

Eco-AlpsWater

European Regional Development Fund

Tehnične smernice za eDNA monitoring alpskih voda

2021

ZA DELEŽNIKE IN KONČNE UPORABNIKE



Eco-AlpsWater

Inovativno ekološko vrednotenje in strategija
upravljanja z vodami za zaščito ekosistemskih
storitev v alpskih jezerih in rekah

UREDNIKA Tina Eleršek

AVTORJI

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

RECENZIJA Hans Rund

SLIKE Nacionalni inštitut za biologijo (Maša Zupančič, Tina Eleršek), ARPAV (Giorgio Franzini), LFUI (Hans Rund) in FEM (Nico Salmaso)

SHEMATSKI PRIKAZI Nico Salmaso, Marine Vautier

GRAFIČNO OBLIKOVANJE Tina Eleršek

IZDAL IN ZALOŽIL Nacionalni inštitut za biologijo

Avtorske pravice © Nacionalni inštitut za biologijo 2021
Elektronska izdaja
Ljubljana, 2021

INFO tina.elersek@nib.si

Protokoli za vse korake
eDNA monitoringa!
Protokoli so trenutno
najsodobnejši, vendar
bodo zaradi nenehnih
revizij in tehničnih
izboljšav v bližnji
prihodnosti optimizirani.

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in
univerzitetni knjižnici v Ljubljani
[COBISS.SI-ID 90445571](https://cobiss.si)
ISBN 978-961-7144-11-6 (PDF)

Interreg
Alpine Space
Eco-AlpsWater
European Regional Development Fund





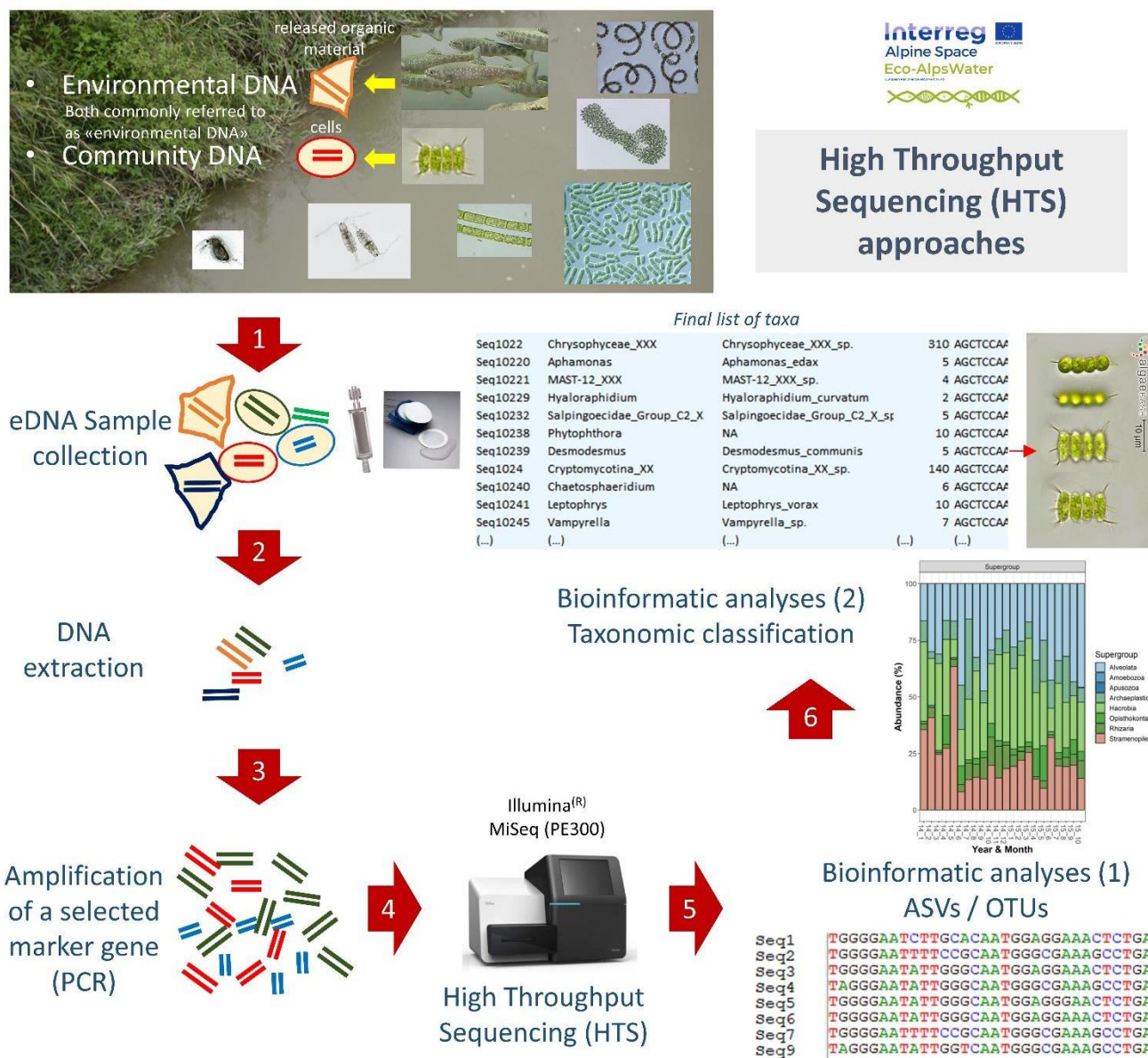
Contents

I. Najsodobnejše metode za analizo okoljske DNA v jezerih in rekah	4
II. Protokoli za vzorčenje (Slika 1, korak 1).....	7
Vzorčenje planktona.....	7
Vzorčenje biofilma v rekah in jezerih	8
Vzorčenje ribje eDNA v rekah in jezerih.....	9
III. Protokoli za izolacijo eDNA (Slika 1, korak 2)	10
Izolacija DNA iz planktona	10
Izolacija DNA iz biofilma	11
Izolacija ribje eDNA (3 metode)	12
IV. Protokoli za pripravo knjižnic (Slika 1, koraki 3-4)	14
Protokoli za pripravo knjižnic za diatomeje	14
Protokoli za pripravo knjižnic za bakterije	15
Protokoli za pripravo knjižnic za protiste	16
Protokoli za pripravo knjižnic za ribe	17
V. Protokoli za bioinformatično obdelavo odčitkov DNA (Slika 1, koraki 5-6)	17
Bioinformatični cevovod za diatomeje (gen RbcL)	18
Bioinformatični cevovod za bakterije (gen 16S rRNA)	19
Bioinformatični cevovod za protiste (gen 18S rRNA)	20
VI. Usklajevanje pristopov Evropske unije in Švice	21
Primerjava EU-WFD in CH-WPO.....	21
Pristopi monitoringa naslednje generacije	24
VII. Pogosta vprašanja – splošen in znanstven vidik	25

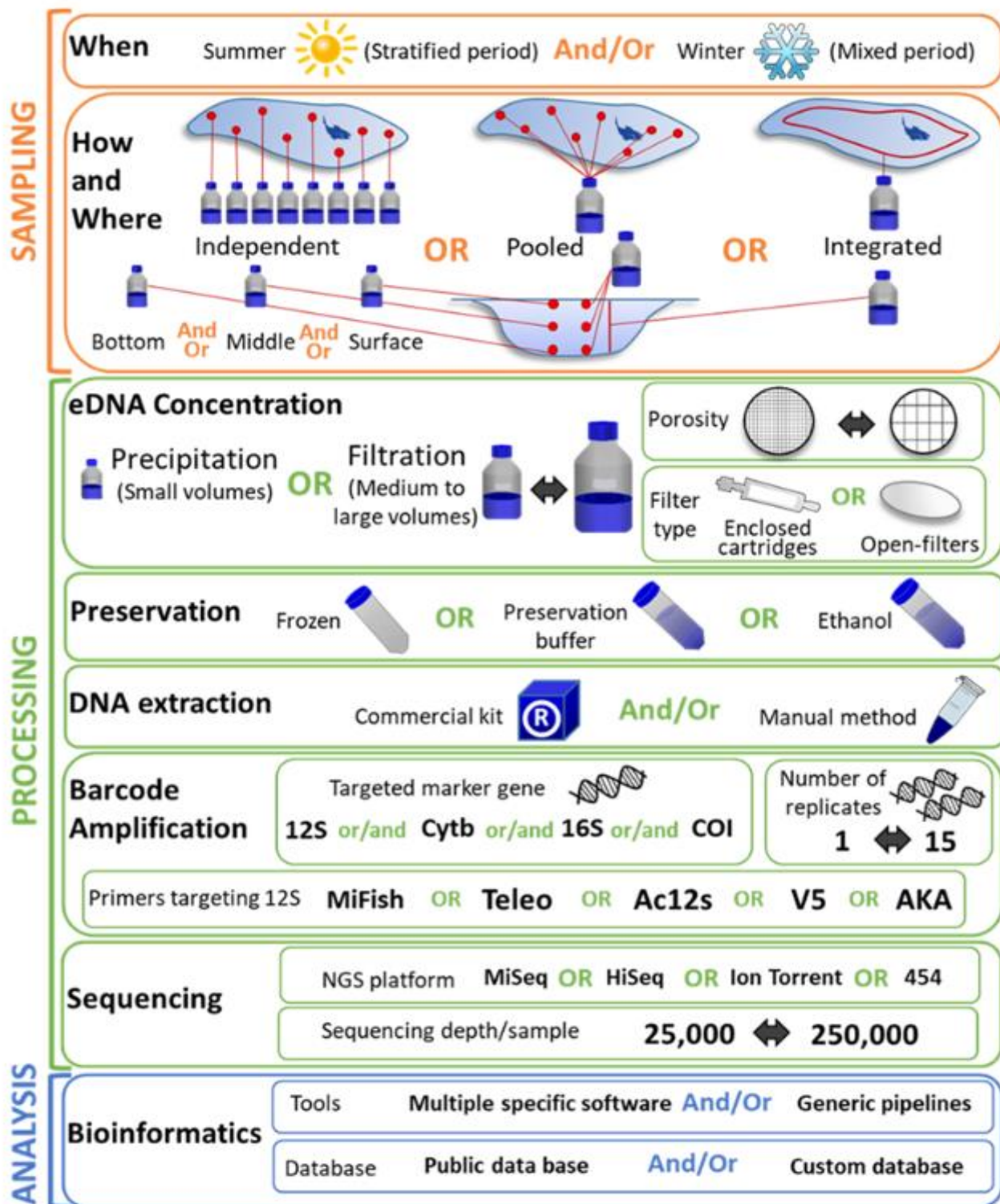


I. Najsodobnejše metode za analizo okoljske DNA v jezerih in rekah

Površinske vode v jezerih in rekah zagotavljajo dobrine in storitve ključnega pomena za ljudi; zaščita in ohranjanje teh vodnih ekosistemov je zato pomemben izziv. Biomonitoring vodnih okolij je danes podlaga za večino upravljanja in ohranjanja površinskih voda in je zaradi močnih antropogenih pritiskov, ki vplivajo na stanje jezer in rek, postal ena od glavnih nalog v Evropi. Učinkovito vrednotenje kakovosti oziroma stanja vodnih ekosistemov zahteva izčrpne podatke o različnih vodnih organizmih (od mikroalg do rib), ki se uporabljajo kot indikatorji stanja ekosistemov. Ustrezne metrike za ocenjevanje biotske raznovrstnosti slonijo na bioindikatorskih organizmih in njihovi identifikaciji na nivoju vrste, na podlagi česar sestavimo taksonomske sezname in indekse kakovosti voda. Ti pristopi zahtevajo visoko raven taksonomskega strokovnega znanja in so včasih invazivni (npr. električni ribolov), dolgotrajni, tehnično zapleteni in zato tudi dragi, kar omejuje časovno in prostorsko pokritost njihove uporabe. V zadnjem času se kot rešitev za te pomanjkljivosti pojavljajo visokozmogljive genetske metode, kot je metabarkodiranje okoljske DNA (eDNA). Takšen biomonitoring nove generacije ima številne prednosti pred tradicionalnim pristopom; hitrost, primerljivost rezultatov in nizke stroške, saj ponuja možnost monitoringa biotske raznovrstnosti v vodnih okoljih z neinvazivnim pristopom, ki ga je precej enostavno standardizirati. eDNA je DNA, zbrana iz okoljskih vzorcev (v našem primeru voda ali biofilm), kar vključuje DNA, ki jo najdemo v živih celicah (npr. bakterije, mikroalge), in DNA, ki se sprošča v okolje iz različnih organizmov (npr. ribe). Iz vzorcev eDNA lahko pomnožimo kratke regije DNA, imenovane »barkode«, jih sekvenciramo z uporabo tehnologij visokozmogljivega sekvenciranja (HTS) in jih primerjamo z referenčno knjižnico. To omogoča identifikacijo taksonov, ki so prisotni v vzorcu vode ali biofilma. Čeprav je bilo metabarkodiranje eDNA že prepoznano kot zelo obetavno za biomonitoring naslednje generacije, metodologije še niso standardizirane. Preden se lahko ta pristop uveljavi v rutinskem monitoringu jezer in rek, je potrebno vsak korak eDNA analiz normalizirati in ovrednotiti na evropski ravni. Eden od glavnih ciljev projekta Eco-AlpsWater je formalizirati standardne protokole eDNA za bakterije, mikroalge in ribe ter jih uporabiti v alpski regiji na pilotnih jezerih in rekah. Kot je prikazano na Sliki 1, navedeni najsodobnejši protokoli vključujejo informacije za vsak korak analize eDNA, tj. za vzorčenje, izolacijo DNA in laboratorijsko pripravo vzorcev (vključno z izbiro barkod in pomnoževanjem PCR), pa tudi za sekvenciranje in bioinformatično obdelavo, ki omogoča oblikovanje taksonomskih seznamov. Čeprav imajo vsi protokoli enako število korakov, jih je treba prilagoditi za različne biološke elemente. Primer z osnovnimi koraki in metodami, uporabljenimi za ribe, je prikazan na Sliki 2. Konzorcij Eco-AlpsWater je glede na pregled obstoječe literature izbral najprimernejše metodologije, kar je pomagalo formalizirati ustrezne pristope eDNA analiz, ki jih je mogoče prenesti v rutinski monitoring celinskih voda. Glavna vprašanja, ki jih obravnavamo v tej publikaciji, so: (i) kdaj, kako in kje vzorčiti za eDNA, (ii) kako koncentrirati in shranjevati eDNA vzorce, (iii) katera metoda izolacije DNA je najprimernejša, (iv) katere barkode je treba uporabiti glede na cilj biomonitoringa in (v) katere tehnologije sekvenciranja in bioinformatične cevovode je treba izbrati, da pridobimo robustne taksonomske sezname za preučevane biološke skupine.



Slika 1. Povzetek glavnih korakov v analizi eDNA v ekosistemih površinskih voda (jezer in rek). Slika prikazuje primer pomnoževanja, sekvenciranja in klasifikacije protistov (rdeče, modre in temno zelene sekvence DNA), koraki pa so enaki tudi za druge vodne organizme. Kljub temu vsak biološki element zahteva prilagoditev postopkov na vsakem koraku (glej npr. Slika 2).



Slika 2. Povzetek glavnih korakov in metod uporabljenih za metabarkodiranje ribje eDNA v ekosistemi površinskih voda (jezer in rek).



II. Protokoli za vzorčenje (Slika 1, korak 1)

Vzorčenje planktona

Vzorčenje planktona iz jezer za molekularne analize

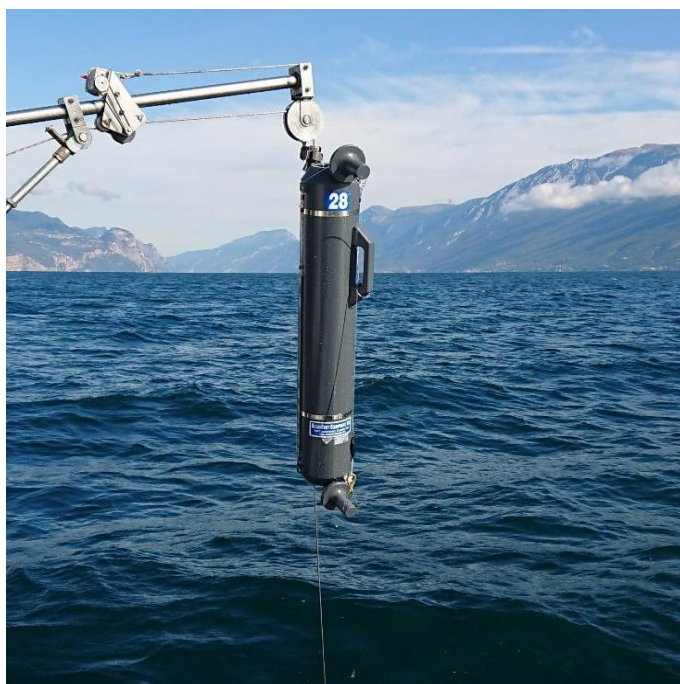
Cilj tega protokola je ponuditi zanesljivo in ponovljivo metodo za vzorčenje mikroplanktona iz jezer za analizo DNA. S tem in ostalimi protokoli želi konzorcij Eco-AlpsWater spodbuditi vpeljavo visokozmogljivega sekvenciranja (HTS) okoljske DNA (eDNA) v biomonitoring in ocenjevanje ekološkega stanja vodnih teles. Predlagana metoda v okviru projekta Eco-AlpsWater je namenjena primerjanju taksonomskih seznamov na podlagi DNA s tradicionalnimi seznammi ter širšemu raziskovanju mikroplanktonske raznovrstnosti (vključno z bakterijami) z eDNA analizami. Strategija vzorčenja je podobna kot pri klasičnem raziskovanju fitoplanktona s poudarkom na eufotični coni (Slika 3), vendar pa je postopek filtracije in shranjevanja prilagojen za vzorce DNA.

Protokol:

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.xn6fmhe](https://doi.org/10.17504/protocols.io.xn6fmhe)

Kratek posnetek s prikazom vzorčenja planktona za eDNA analize

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



Slika 3. Vzorčevalnik Niskin v Gardskem jezeru, namenjen za vzorčenje vode na točno določeni globini.



Vzorčenje biofilma v rekah in jezerih

Vzorčenje biofilma za molekularne in mikroskopske analize

Cilj tega protokola je ponuditi zanesljivo in ponovljivo metodo za vzorčenje mikrofitobentosa in drugih mikroorganizmov v biofilmu za uporabo tako v DNA analizah kot tudi za mikroskopsko štetje. Terenski protokol je optimiziran za rutinsko vzorčenje v skladu s smernicami CEN (NF EN 13946) in tehničnim poročilom CEN (FprCEN/TR 17245) za analizo bentoških diatomej v rekah (npr. Slika 4) in v jezerih. Predlagana metoda v okviru projekta Eco-AlpsWater je namenjena primerjanju taksonomskih seznamov na podlagi DNA s tradicionalnimi sezname na podlagi mikroskopije.

Protokol za vzorčenje biofilma v jezerih:

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

Protokol za vzorčenje biofilma v rekah:

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

Kratek posnetek s prikazom vzorčenja biofilma za eDNA analize

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



Slika 4. Vzorčenje biofilma s sterilizirano ščetko in rokavicami v reki Bistrici.



Vzorčenje ribje eDNA v rekah in jezerih

Vzorčenje ribje eDNA v jezerih in rekah za molekularne analize

Cilj tega protokola je ponuditi zanesljivo in ponovljivo metodo za vzorčenje rib iz rek in jezer za analizo DNA. S tem in ostalimi protokoli želi konzorcij Eco-AlpsWater spodbuditi vpeljavo visokozmogljivega sekvenciranja (HTS) okoljske DNA (eDNA) v biomonitoring in ocenjevanje ekološkega stanja vodnih teles v alpski regiji za ribe (npr. Slika 5). Predlagana metoda v okviru projekta Eco-AlpsWater je namenjena primerjanju taksonomskih seznamov na podlagi DNA s tradicionalnimi seznammi rib. Opisani so trije različni pristopi vzorčenja, ki se razlikujejo v vrsti filtra, številu vzorcev in volumnu prefiltrirane vode na vzorec (cf. Slika 2). Vsaka od teh metod in pripadajočih postopkov izolacije DNA (opisane v poglavju III) ima svoje prednosti in slabosti, in najustreznejša izbira je odvisna od raziskovalnega vprašanja. Treba pa je poudariti, da so vse metode in protokoli še v fazi razvoja.

Protokol:

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



Slika 5. Riba Perca fluviatilis.



III. Protokoli za izolacijo eDNA (Slika 1, korak 2)

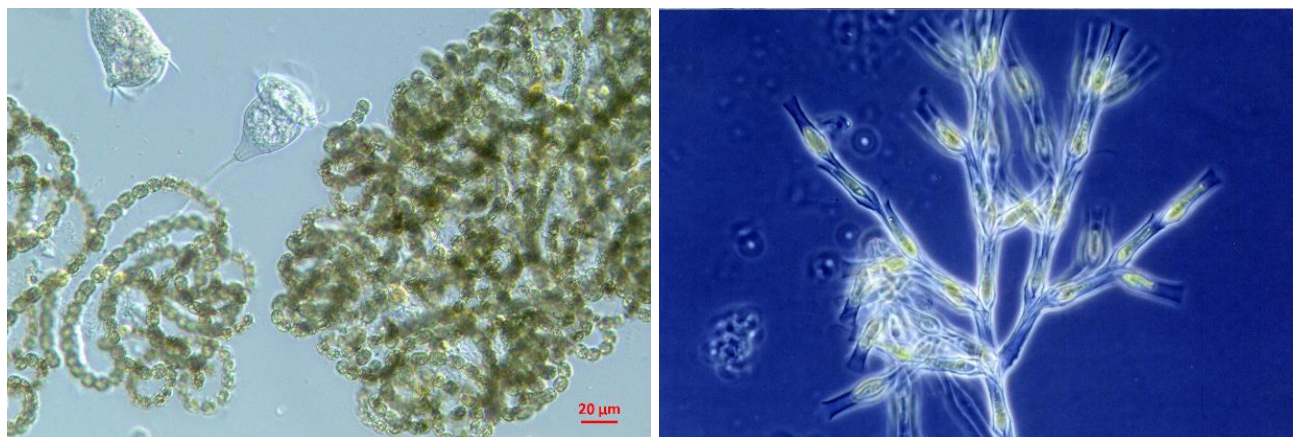
Izolacija DNA iz planktona

Protokol Eco-AlpsWater s Sterivex filtri in kompletom za izolacijo DNeasy® PowerWater Sterivex QIAGEN Kit

Ta protokol je del postopka za DNA analize, ki smo ga v projektu Eco-AlpsWater uporabili za karakterizacijo planktonske raznovrstnosti v jezerih. Tradicionalno so se analize planktona izvajale z mikroskopskim opazovanjem, tehnologije visokozmogljivega sekvenciranja (HTS) pa ponujajo možnost hitrega pregleda okoljskih vzorcev in lahko upoštevajo tudi raznovrstnost številnih taksonov, ki v tradicionalnem pristopu niso bili vključeni. Tu je opisan korak izolacije DNA. To je ključen korak za zagotavljanje ustreznih rezultatov; DNA je namreč shranjena v celici planktona (Slika 6), zato morajo biti metode za celično lizo in izolacijo DNA učinkovite, da omogočijo nepristransko izolacijo nukleinskih kislin tudi iz vrst s trdnimi celičnimi stenami. V projektu Eco-AlpsWater smo vzorce planktona iz jezer prefiltrirali s filtri Sterivex® (Sterivex® GP 0.22 µm) in shranili pri -20 °C, kot je opisano v protokolu. Izbrana metodologija za izolacijo DNA je zato prilagojena vrsti filtra, ki se uporablja za vzorčenje planktona (tj. filter Sterivex®). V navedenem protokolu se uporablja komplet DNeasy® PowerWater Sterivex® (QIAGEN) s posebnimi prilagoditvami, prilagojenimi izolaciji planktonske DNA.

Protokol:

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



Slika 6. Fitoplankton iz Gardskega jezera. Levo: filament cianobakterije *Dolichospermum lemmermannii* s pritrjenimi vorticellidi. Desno: zlato rjava alga *Dinobryon divergens*. Z izolacijo DNA pridobimo genomsko DNA iz vseh organizmov prisotnih v vzorcu.



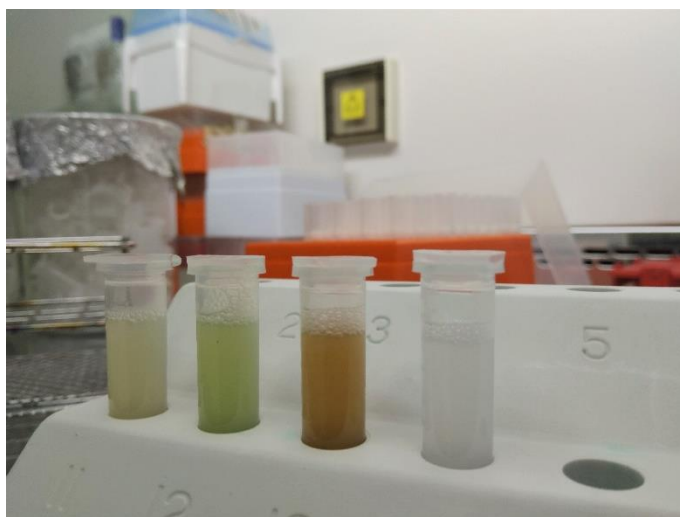
Izolacija DNA iz biofilma

Protokol Eco-AlpsWater s kompletom za izolacijo NucleoSpin® Soil kit (MACHEREY-NAGEL)

Tu opisan metodološki korak je izolacija DNA, ključen korak pri pridobivanju ustreznih rezultatov, saj lahko izbrana metoda vpliva na molekularne taksonomske sezname. Izbira metodologije za izolacijo DNA iz biofilma temelji na predhodnih raziskavah, kjer so avtorji preizkusili pet metod izolacije DNA z različnimi vrstami celične lize in čiščenja DNA (na čistih kulturah diatomej in okoljskih vzorcih iz jezer in rek). V projektu Eco-AlpsWater smo biofilm po vzorčenju iz jezer ali rek (npr. Slika 7) shranili v etanolu v 50 mL epruветah za centrifugiranje Falcon pri 4 °C za največ tri mesece pred izolacijo DNA (izolacija mora biti opravljena v enem mesecu po vzorčenju). Navedeni protokol izolacije DNA je bil uporabljen v več nedavnih raziskavah metabarkodiranja diatomej (npr. Vasselon in sod. 2017, 2018). Postopek temelji na protokolu, prilagojenem iz kompleta NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL) s posebnimi prilagoditvami za izolacijo iz biofilma.

Protokol:

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bd52i88e](https://doi.org/10.17504/protocols.io.bd52i88e)



Slika 7. Izolacija DNA iz biofilma različnih vodnih okolij.



Izolacija ribje eDNA (3 metode)

(1) Protokol Eco-AlpsWater za izolacijo ribje eDNA s filtri za filtriranje VigiDNA®, prilagojen po protokolu NucleoSpin® Soil kit (MACHEREY-NAGEL)

Izbira te metodologije za izolacijo ribje eDNA temelji na predhodnih raziskavah z določenimi prilagoditvami za projekt Eco-AlpsWater. Za integrirano vzorčenje eDNA smo vzorce pobrali s filtrom za filtriranje VigiDNA® (0.45-µm), ki je namenjena filtriranju velikih volumnov vode (30 litrov). Po filtraciji smo v filter dodali pufer za shranjevanje in jo do izolacije DNA shranili na sobni temperaturi (največ en mesec po vzorčenju). Protokol za izolacijo DNA je bil prilagojen po protokolu NucleoSpin® Soil kit (MACHEREY-NAGEL) z določenimi spremembami.

Protokol:

https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/dt1.1.2.--8.2-fish_dna_extraction_vigidna.pdf

(2) Protokol Eco-AlpsWater za izolacijo ribje eDNA s filtri Sterivex® napolnjenih s pufrom za shranjevanje s kompletom NucleoSpin® Soil kit (MACHEREY-NAGEL)

Izbira te metodologije za izolacijo ribje eDNA temelji na predhodnih raziskavah in je prilagojena za filtre Sterivex®. Za točkovno vzorčenje ribje eDNA smo pobrali 2 litra vodnih vzorcev in jih prefiltrirali čez filtre Sterivex® (0.45 µm), nato smo filtre napolnili s pufrom za shranjevanje in jih do izolacije DNA shranili na sobni temperaturi (največ en mesec po vzorčenju). Protokol za izolacijo DNA je bil prilagojen po protokolu NucleoSpin® Soil kit (MACHEREY-NAGEL) z določenimi spremembami.

Protokol:

https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/dt1.1.2.--8.1-fish_dna_extraction_sterivex.pdf



(3) Izolacija ribje eDNA z GFC filtrov s kompletom DNeasy PowerWater® Kit

Za potrebe primerljivosti smo uporabili še eno dodatno metodologijo za izolacijo ribje eDNA, ki se je v okviru projekta Eco-AlpsWater izkazala za učinkovito. Za točkovno vzorčenje ribje eDNA smo pobrali 5 litrov vzorcev vode iz alpskih vodnih teles (npr. Slika 8) in jih prefiltrirali čez filter GFC (1.2 μm). Po filtraciji smo jih shranili pri -20 °C do izolacije DNA. Izolacija DNA je bila izvedena po protokolu proizvajalca (Qiagen) za analizo filtrov (vključno z GFC) s kompletom DNeasy PowerWater kit.



Slika 8. Mlada potočna postrv (Salmo trutta) v alpski reki.



IV. Protokoli za pripravo knjižnic (Slika 1, koraki 3-4)

Protokoli za pripravo knjižnic za diatomeje

*PCR pomnoževanje genov *rbcL* za bioinformatične analize in taksonomsko klasifikacijo diatomej (Bacillariophyta, Slika 9)*

Potencial metabarkodiranja diatomej za ocenjevanje kakovosti celinskih voda je bil prikazan že v številnih raziskavah. Izbira ustreznega markerskega gena in regije za barkodiranje je ključna pri raziskavah biotske raznovrstnosti in pri natančni klasifikaciji. Gen *rbcL* se je izkazal kot ustrezen taksonomski marker pri monitoringu bentoških diatomej, prav tako pa je za ta gen na voljo tudi dobro vzdrževana referenčna baza podatkov za določanje vrst (R-Syst::diatom). Postopki za vzorčenje biofilma iz rek in jezerskih obal ter izolacijo DNA v projektu Eco-AlpsWater so predstavljeni v prejšnjih poglavjih. Spodaj predstavljamo še nadaljnje korake pri analizi DNA (pomnoževanje PCR izbranih barkod, laboratorijsko pripravo knjižnice za sekvenciranje s tehnologijo MiSeq). Ta protokol je bil uporabljen v nedavnih raziskavah metabarkodiranja diatomej za ocenjevanje ekološkega stanja rek.

Protokol:

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bd94i98w](https://doi.org/10.17504/protocols.io.bd94i98w)



Slika 9. Različne vrste diatomej pod svetlobnim mikroskopom (*Diatoma*, *Achnanthidium*, *Navicula*).



Protokoli za pripravo knjižnic za bakterije

PCR pomnoževanje genov 16S rRNA za bioinformatične analize in taksonomsko klasifikacijo bakterij in cianobakterij

Ta protokol opisuje osnovne elemente, ki smo jih uporabili za identifikacijo bakterij v okviru projekta Eco-AlpsWater. Analizirali smo DNA izolirano iz vzorcev jezerske vode in biofilma iz rek ter jezerskih obal (npr. Slika 10). Za identifikacijo bakterij smo uporabili marker 16S rRNA, ki se pogosto uporablja za taksonomsko klasifikacijo in filogenetske analize bakterijskih združb. Za tarčno regijo smo izbrali približno 460 bp dolg odsek DNA znotraj variabilne regije V3–V4 in ga pomnožili s PCR v genomske DNA iz okoljskih vzorcev. S takšno pripravo knjižnice smo poleg širokega nabora bakterijskih razredov zajeli tudi cianobakterije, ki so med najpomembnejšimi biološkimi elementi v biomonitoringu vodnih teles za pitno vodo in rekreativno uporabo. Začetni oligonukleotidi za bakterije so: 341F (5' CCTACGGGNGGCWGCAG 3') in 805Rmod (5' GACTACNVGGGTWTCTAATCC 3') z adapterji za tehnologijo Illumina (ang. 'overhang' adapterji). Ta par začetnih oligonukleotidov se uporablja po vsem svetu za raziskave bakterijske raznovrstnosti v vodnih okoljih. Pri pripravi knjižnice smo sledili standardnemu protokolu, ki je opisan v spodnjem dokumentu.

Protokol:

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



Slika 10. Prekomerna razrast cianobakterij vrste *Planktothrix rubescens* v jezeru Ledro (italijanske Alpe).



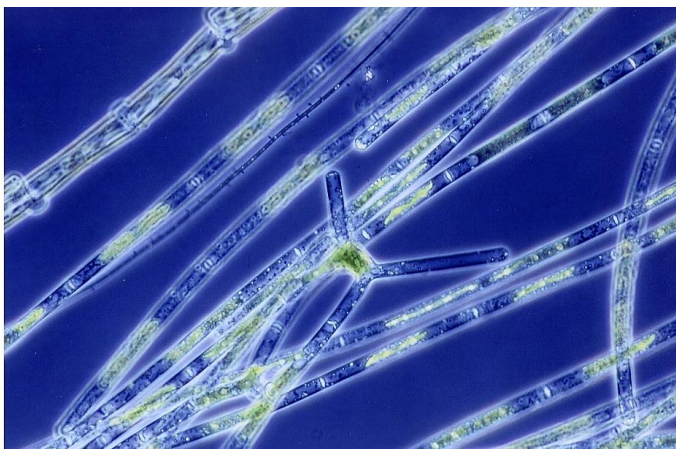
Protokoli za pripravo knjižnic za protiste

PCR pomnoževanje genov 18S rRNA za bioinformatične analize in taksonomsko klasifikacijo protistov (vključno z mikroalgami)

Protisti so polifiletska skupina evkariontskih organizmov, ki vključuje tudi organizme bolj sorodne rastlinam, glivam ali živalim kot ostalim protistom (npr. Slika 11). Poleg heterotrofnih protistov in mikroskopskih gliv so v to skupino uvrščeni tudi fotosintezni in miksotrofni protisti ("alge"), ki so razpršeni v različnih nadskupinah skupaj s številnimi drugimi praživalmi. Izjema je le skupina *Archaeplastida*, ki tvori svojo skupino. V tem protokolu so opisani glavni elementi, ki smo jih uporabili za identifikacijo protistov v projektu Eco-AlpsWater. Analizirali smo DNA izolirano iz vzorcev jezerske vode in biofilma iz rek ter jezerskih obal. Za identifikacijo protistov smo uporabili marker 18S rRNA. Za tarčno regijo smo izbrali približno 380 bp dolg odsek DNA znotraj variabilne regije V4 gena 18S rRNA in jo pomnožili s PCR ob uporabi začetnih oligonukleotidov: TAREuk454FWD1 (5' CCAGCASCYGC GGTAATTCC 3') in TAREukREV3_modified (5' ACTTTCGTTCTTGATYRATGA 3'). Ta par začetnih oligonukleotidov je zelo razširjen v raziskavah raznovrstnosti mikroevkariontov v vodnih okoljih. Pri pripravi knjižnice smo sledili standardnemu protokolu, ki je opisan v spodnjem dokumentu.

Protokol:

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



Slika 11. Zelena mikroalga *Mougeotia* sp. iz Gardskega jezera, Italija; širina filamentov je približno 7 μ m.



Protokoli za pripravo knjižnic za ribe

PCR pomnoževanje genov 12S rRNA za bioinformatične analize in taksonomsko klasifikacijo rib

Cilj tega dokumenta je pripraviti podroben protokol priprave knjižnic za sekvenciranje s tehnologijo Illumina za eDNA metabarkodiranje ribjih združb v celinskih vodah (npr. Slika 12). Protokol smo predhodno preverili in ovrednotili v interkalibracijskem testu, nato pa smo ga uporabili na Platformi za sekvenciranje in genotipiziranje na znanstveni inštituciji FEM (Italija) za analizo vzorcev pobranih v letu 2019 za projekt Eco-AlpsWater. Trenutna verzija protokola je kljub temu še odprta za izboljšave, mi pa še vedno testiramo ponovljivost in robustnost izboljšanih protokolov.

Protokol:

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



Slika 12. Rečna jegulja (Anguilla Anguilla), kači podobna riba selivka.



V. Protokoli za bioinformatičko obdelavo odčitkov DNA (Slika 1, koraki 5-6)

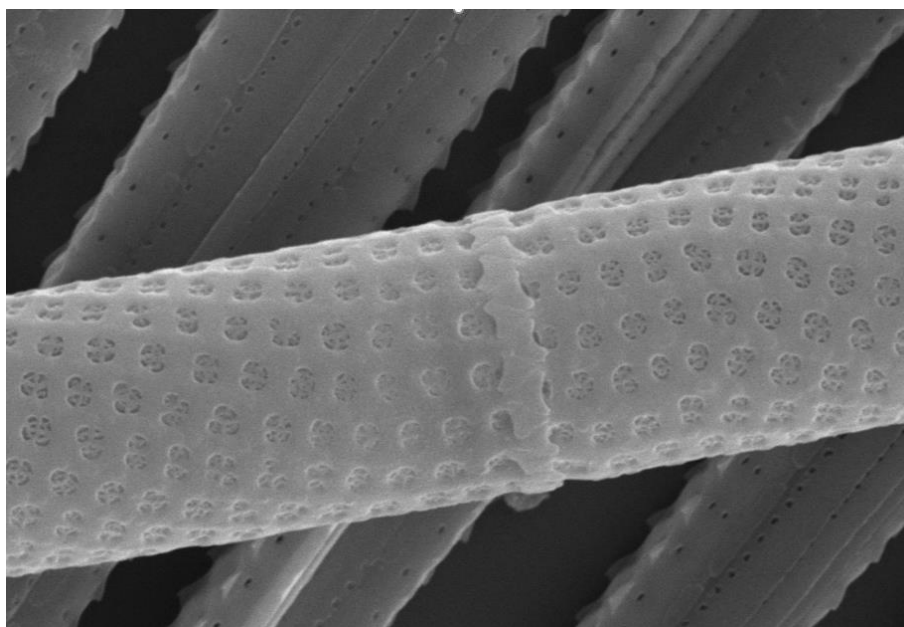
Bioinformatički cevovod za diatomeje (gen *RbcL*)

Bioinformatički cevovod za DNA metabarkodiranje diatomej s programsko opremo "Mothur", MiSeq, rbcL, 312 bp

V tem protokolu so podrobno opisani glavni bioinformatički postopki, ki smo jih uporabili za obdelavo podatkov sekvenciranja visoke zmogljivosti (HTS) pri metabarkodiranju diatomej. S tem in ostalimi bioinformatičskimi protokoli želi konzorcij Eco-AlpsWater spodbuditi vpeljavo HTS okoljske DNA v biomonitoring in ocenjevanje ekološkega stanja vodnih teles (jezer in rek, kjer so diatomeje pomemben biološki element, npr. Slika 13).

Protokol:

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



Slika 13. Mikrografija diatomej *Aulacoseira granulata* (spredaj) in *Fragilaria crotonensis* (zadaj) iz Gardskega jezera, posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom.



Bioinformatički cevovod za bakterije (gen 16S rRNA)

Bioinformatička obdelava za bakterije (vključno s cianobakterijami) na podlagi gena 16S rRNA s cevovodom DADA2

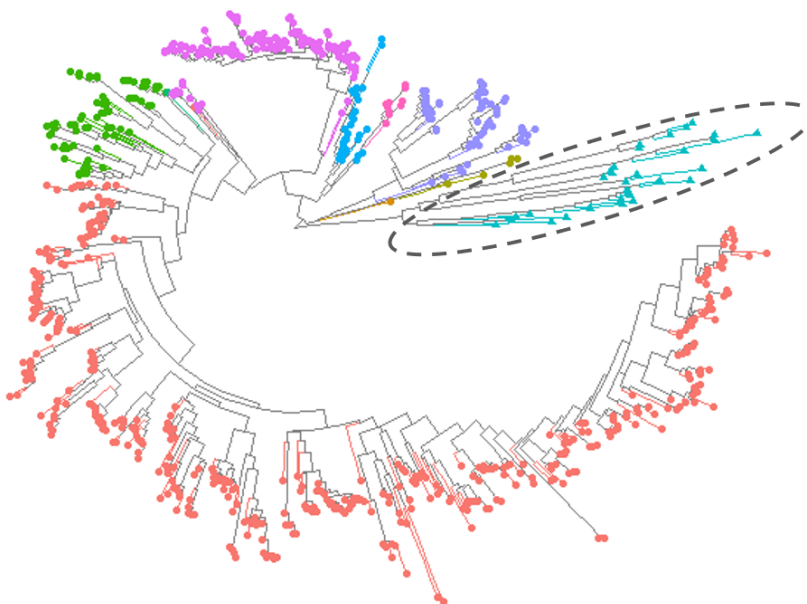
V tem protokolu so podrobno opisani glavni bioinformatički postopki, ki smo jih uporabili za obdelavo podatkov sekvenciranja visoke zmogljivosti (HTS) gena 16S rRNA z namenom določevanja bakterij in cianobakterij (Slika 14). Cevovod temelji na identifikaciji točnih sekvenc (ASV, ang. 'Amplicon Sequence Variant') s pristopom DADA2. S tem in ostalimi bioinformatičskimi protokoli želi konzorcij Eco-AlpsWater spodbuditi vpeljavo HTS okoljske DNA v biomonitoring in ocenjevanje ekološkega stanja jezer in rek. Protokol in testne datoteke so na voljo za prenos na platformi Zenodo.

Protokol:

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

Testne datoteke:

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



Slika 14. Filogenetsko drevo na podlagi poravnave zaporedij gena 16S rRNA (približno 400 bp), pridobljenih s tehnologijo HTS v alpski regiji. Za analizo so bile uporabljene le najbolj številčne sekvence (ASV). V primerjavi s tradicionalnimi pristopi ponuja okoljska metagenomika možnosti za raziskovanje skupin organizmov, ki jih prej nismo mogli zaznati, npr. nefotosinteznih bakterij (siva črtkana črta). Druge bolj številčne skupine vključujejo Cyanobacteriales (oranžna), Limnotrichales (zelena) in Synechococcales (vijolična).



Bioinformatški cevovod za protiste (gen 18S rRNA)

Bioinformatška obdelava za protiste (vključno z mikroalgami) na podlagi gena 18S rRNA s cevovodom DADA2

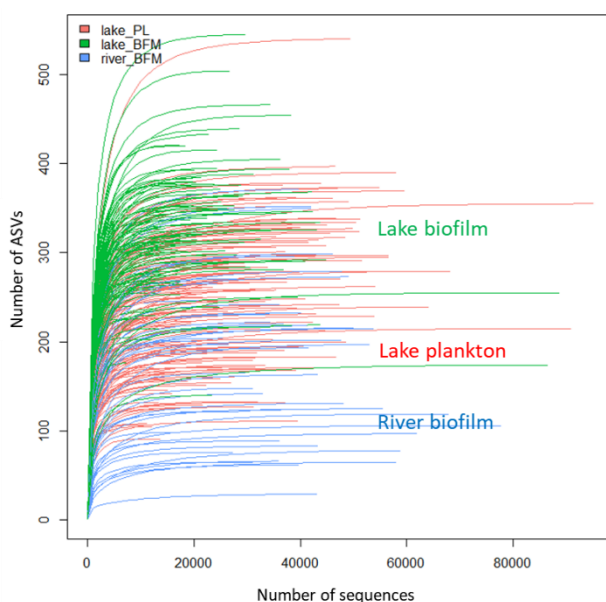
V tem protokolu so podrobno opisani glavni bioinformatški postopki, ki smo jih uporabili za obdelavo podatkov sekvenciranja visoke zmogljivosti (HTS) gena 18S rRNA za metabarkodiranje protistov in mikroalg (Slika 15). Cevovod temelji na identifikaciji točnih sekvenc (ASV, ang. 'Amplicon Sequence Variant') s pristopom DADA2. S tem in ostalimi bioinformatškimi protokoli želi konzorcij Eco-AlpsWater spodbuditi vpeljavo HTS okoljske DNA v biomonitoring in ocenjevanje ekološkega stanja jezer in rek. Protokol in testne datoteke so na voljo za prenos na platformi Zenodo.

Protokol:

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

Testne datoteke:

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



Slika 15. Rarefakcijska krivulja protistov in gliv prikazuje, kako se s povečanjem števila sekvenc poveča tudi število ASV-jev. Rarefakcija se uporablja za oceno številčnosti ASV-jev ob izbranem številu sekvenc in tako omogoča normalizacijo številčnosti med različnimi vzorci. Na grafu vsaka krivulja predstavlja en vzorec. V povprečju lahko največje število ASV-jev najdemo v biofilmu jezer.



VI. Usklajevanje pristopov Evropske unije in Švice

Eden glavnih ciljev projekta Eco-AlpsWater je vpeljava skupnih pristopov in protokolov za monitoring kakovosti voda v alpski regiji na mednarodnem nivoju. Večina držav na tem območju sledi nacionalnim ali regijskim metodologijam, ki so v skladu z Vodno direktivo Evropske unije (WFD). Kljub temu med posameznimi državami obstajajo številne razlike. Po drugi strani pa Švica, ki ni članica EU, uporablja metode v skladu s švicarskim odlokom o varovanju voda (WPO). Zato priporočamo uskladitev pristopov za ocenjevanje kakovosti voda med vsemi državami alpske regije. V projektu EAW smo ovrednotili, kje in na kakšen način bi lahko inovativni pristopi na osnovi eDNA in tehnologije HTS zapolnili vrzeli in utrdili šibke točke tradicionalnih metod. Cilj tega je razvoj pristopa monitoringa naslednje generacije, ki bo enak v vseh državah alpske regije.

V projektu Eco-AlpsWater smo izbrali pilotna območja – šest ključnih jezer (Blejsko jezero, Gardsko jezero, jezera Bourget, Lugano, Mondsee in Starnberg) ter pet ključnih rek (Adiža, Drome, Soča, Steyr in Wertach), – ki smo jih uporabili za primerjavo različnih metod za ocenjevanje ekološkega stanja na podlagi bioloških elementov kakovosti (fitoplankton, fitobentos in ribe). S to obsežno raziskavo smo izpostavili šibke točke novih pristopov in potencial za njihovo implemetacijo znotraj posameznih držav in v mednarodnem okviru, v kontekstu predhodnih procesov interkalibracije.

Primerjava EU-WFD in CH-WPO

Države alpske regije, ki so članice EU, uporabljajo regionalne oz. nacionalne metode, ki temeljijo na WFD. V zadnjih letih so bili izvedeni procesi interkalibracije, ki so omogočili uskladitev pristopov med posameznimi državami (npr. za fitoplankton). Kljube temu, da različne države uporabljajo različne indekse, vse podajo oceno ekološkega stanja v obliki petih razredov kakovosti (zelo dobro, dobro, zmerno, slabo, zelo slabo). To omogoča ustrezno primerjavo stanja vodnih teles (<https://ec.europa.eu/environment/pubs/pdf/factsheets/water-framework-directive.pdf>).

V Švici je bil razvit pristop (ang. 'Swiss Modular Stepwise Procedure'), ki vključuje kakovostne razrede, primerljive s tistimi v WFD. Zvezna pisarna za okolje (FOEN) je oblikovala metodologijo za ocenjevanje ekološkega statusa z biološkimi elementi kakovosti (BEK) na podlagi WPO. Vendar pa ta metodologija služi le kot smernica za kantone, ki imajo zakonodajno moč odločanja o uporabi te metodologije na svojem območju. Trenutno so objavljene le metode za diatomeje in ribe v rekah. Kljub temu je vsak kanton z leti razvil tudi svoje interne protokole (npr. za fitoplankton), poteka pa tudi proces standardizacije na zveznem nivoju. Poleg tega so čezmejne vode (Švica–EU) pod nadzorom mednarodnih komisij (npr. CIP AIS, CIPEL, IGKB), ki imajo različne cilje in vključujejo različne vrste indikatorjev ekološkega stanja, včasih v nasprotju z zakonodajo WFD in WPO. Primer tega je jezero Lugano na meji med Švico in Italijo, kjer se referenčni pogoji razlikujejo med različnimi predpisi. Glede na WFD je potrebno doseči in ohranjati dobro ekološko stanje; cilj WPO je ekološko stanje blizu naravnega z biotsko raznovrstnostjo in številčnostjo vrst, značilnima za neonesnažene ali malo



onesnažene vode; cilj CIP AIS pa je mezotrofno stanje. Različni pristopi za ocenjevanje kakovosti vode v Švici so jasen primer potrebe po homogenizaciji predpisov.

Razlike pa niso prisotne le v Švici. Raziskava, ki smo jo opravili najprej na ključnih jezerih in rekah in jo nato razširili še na celotno alpsko regijo, je pokazala tudi razlike v izvajanju WFD med različnimi državami EU. V nekaterih državah standardizacija metod za določene BEK še poteka ali pa se sploh še ni začela. Največje razlike so pri fitobentosu, ki v različnih državah vključuje različne skupine; povečini diatomeje, ponekod tudi druge skupine bentoških mikroalg. Spodnji tabeli prikazujeta povzetek uporabe metod BEK za ocenjevanje kakovosti voda (Tabela 1) in podobnosti ter razlike v alpski regiji (Tabela 2).

Tabela 1. Povzetek uporabe metod BEK za ocenjevanje kakovosti voda v alpski regiji (fitoplankton, bentoške diatomeje in mikroalge, ribe).

Alpske regije Metode BEK		Fitoplankton	Bentoške diatomeje	Bentoške mikroalge (vključno z diatomejami)	Ribe
Avstrija	Jezera	da	ne	da	da
	Reke		da	da	da
Francija	Jezera	da	ne*	ne	da
	Reke		da	ne	da
Italija	Jezera	da	da	ne	da
	Reke		da	da †	da
Nemčija	Jezera	da	da	ne	da
	Reke		da	ne	da
Slovenija	Jezera	da	da	da ††	da
	Reke		da	da ††	da
Švica	Jezera	da °	ne	ne	ne
	Reke		da	ne	da

* metoda v razvoju

° metoda razvita na nivoju kantona

† bentoške mikroalge se upoštevajo pri spremljanju rečnih makrofitov, kadar tvorijo makroskopske agregate

†† le za izbrane skupine alg

Natančna primerjava značilnosti metod BEK, ki se uporabljajo v ključnih jezerih in rekah, je pokazala veliko usklajenost, kar nakazuje na izvedljivost homogenizacije. Kot je navedeno v Tabeli 2, je metoda za monitoring fitoplanktona v vseh državah skoraj enaka z izjemo pogostosti vzorčenja. Monitoring fitobentosa je, kot že omenjeno, še v postopku uvajanja in nekatere države ta BEK spremljajo izključno v rekah. Poleg tega nekatere države (npr. Slovenija) spremljajo tudi nitaste zelene alge, medtem ko večina upošteva le diatomeje. Število vzorčnih mest in pogostost vzorčenja se pri monitoringu fitobentosa med državami razlikujeta. Prav tako se ta elementa razlikujeta pri monitoringu rib, kar nakazuje, da imajo tradicionalne metode še prostor za izboljšave.



Tabela 2. Podobnosti in razlike v monitoringu jezer in rek v alpski regiji za fitoplankton, fitobentos in ribe.

Biološki elementi		Podobnosti	Razlike
Fitoplankton	Jezera	Vzorčna točka (največja globina) Globina vzorčenja (epilimniji/eufotična cona) Biovolumen (Utermöhl) in klorofil a (ISO) Identifikacija na nivoju vrste	Pogostost vzorčenja
	Reke	Čas vzorčenja Substratni tipi Habitat Identifikacija na nivoju vrste ali rodu	Biološke združbe (fitobentos izven skupine diatomej) Število vzorčnih mest Pogostost vzorčenja
Fitobentos	Jezera	Čas vzorčenja Značilnosti vzorčnih mest Substratni tipi Habitat Identifikacija na nivoju vrste ali rodu	Biološke združbe (fitobentos izven skupine diatomej) Število vzorčnih mest Pogostost vzorčenja
	Reke	Čas vzorčenja Strategija vzorčenja Identifikacija na nivoju vrste	Število vzorčnih mest (na površini/globini)
Ribe	Jezera	Čas vzorčenja Strategija vzorčenja Identifikacija na nivoju vrste	Število vzorčnih mest
	Reke	Čas vzorčenja Strategija vzorčenja Habitat Identifikacija na nivoju vrste	Pogostost vzorčenja

Prikazane razlike govorijo v prid uporabi HTS za izboljšanje in homogenizacijo pristopov v alpski regiji. Poleg potenciala HTS pri raziskavah biotske raznovrstnosti bi lahko metagenomika pomagala tudi pri povečanju časovne, prostorske in taksonomske pokritosti monitoringa na račun zmanjšanja trajanja in stroškov analiz. Inovativni protokoli, predstavljeni v tej publikaciji, so bili prilagojeni za tradicionalni monitoring na podlagi WFD in WPO z namenom bolj temeljitih raziskav biotske raznovrstnosti vodnih ekosistemov in bolj celovitega seznama taksonomskih skupin. To smo lahko dosegli le s pomočjo sodelovanja z opazovalci in deležniki, ki so nam pomagali s povratnimi informacijami za prilagoditev novih pristopov.



Pristopi monitoringa naslednje generacije

Vpeljavo inovativnih metod na podlagi analiz eDNA in NGS v pristopih monitoringa naslednje generacije za ocenjevanje biotske raznovrstnosti in ekološkega stanja vodnih teles so deležniki in odločevalci pozitivno sprejeli. Izpostavili so naslednje prednosti in priložnosti:

- Več informacij, ki jih lahko pridobimo iz enega vzorčenja
- Večja prostorska in časovna pokritost monitoringa
- Potencial za vzorčenje odročnih lokacij in raziskave kompleksnih okolij
- Raziskovanje večjega dela biotske raznovrstnosti, vključno z biološkimi skupinami z zapleteno taksonomijo in s taksonomskimi skupinami, ki še niso vključene v monitoring, s čimer lahko pridobimo bolj celovit taksonomski seznam in odgovorimo na dodatna ekološka vprašanja
- Zaznavanje tujerodnih in redkih vrst
- Zaznavanje patogenov in prenašalcev bolezni
- Manj invazivne metode vzorčenja (npr. za ribe in ranljive ekosisteme)
- Manjši časovni in finančni vložek (možnost analize številnih vzorcev)

Vse te izpostavljene prednosti podpirajo uporabo metod na podlagi eDNA kot dopolnilnega orodja obstoječim metodam za ocenjevanje ekološkega stanja in upravljanje voda, pa tudi kot načina za lažje usklajevanje metodologij EU in Švice. Za doseg tega cilja so potrebne nacionalne strategije, vključno s standardizacijo metod na osnovi eDNA, vzpostavitvijo celovitih referenčnih baz podatkov in pridobivanjem novih kompetenc na tem področju v okoljskih agencijah, odgovornih za izvajanje monitoringa voda. Za zaključek, mednarodni inovativni pristopi predstavljajo strateški element, katerega cilj je izboljšati zaščito, ohranjanje in ekološko povezanost ekosistemov alpske regije, in ki ima potencial za uporabo tudi v širšem evropskem prostoru.



VII. Pogosta vprašanja – splošen vidik

Zbrali smo pogosto zastavljena vprašanja o metabarkodiranju, ki so se pojavljala na srečanjih z deležniki. Splošne odgovore nanje lahko preberete spodaj, bolj poglobljene odgovore z znanstvenega vidika pa najdete na naši spletni strani ([FAQ Catalogue](#)).

Zakaj za metabarkodiranje uporabljate več različnih začetnih oligonukleotidov?

Več različnih začetnih oligonukleotidov potrebujemo, ker uporabljamo različne tarčne regije za razločevanje organizmov. Tarčni organizmi, kot so bakterije, mikroalge in ribe, genetsko med seboj niso bližnje sorodni.

Zakaj pri mikroalgah z metabarkodiranjem ne morete doseči visoke taksonomske ločljivosti (do nivoja vrste)?

Mikroalge spadajo v različna debla na evolucijskem drevesu. Zato smo uporabili splošne markerje, s katerimi smo lahko zaznali globalne mikrobne združbe. S temi markerji smo lahko zaznali veliko skritih vrst, po drugi strani pa je to onemogočilo zaznavanje nekaterih skupin tradicionalnih indikatorskih vrst.

Kako lahko primerjamo sezname taksonomskih skupin, ki vsebujejo taksone na nivoju vrste, rodu in redu?

Pri HTS in mikroskopiji lahko pride do zaznave istega rodu, vendar različnih vrst. Eco-AlpsWater orodje za analizo taksonov oz. 'Taxa Analysis Tool' omogoča prikaz tabel, kjer sta omenjeni metodi primerjani na nivoju vrste ali na nivoju rodu, ločeno za cianobakterije in za evkarionte.

Kako naj interpretiramo ime vrste, ki se pojavi ob več različnih sekvencah v rezultatih metabarkodiranja?

Število DNA sekvenc (ASV), ki pripadajo eni vrsti (taksonu), odraža genetsko raznolikost znotraj vrste (taksona). Eco-AlpsWater 'Taxa Analysis Tool' združi vse sekvence, ki pripadajo istemu taksonu, v en vnos.

Kako naj najdem svoj tarčni takson? V rezultatih metabarkodiranja vidim veliko taksonomskih imen, ki so mi nepoznana.

Taksonomska imena na seznamih metabarkodiranja so najnovejša, zato so lahko nekatera biološka imena za uporabnike neznana. Ti so običajno seznanjeni le z imeni, ki se uporabljajo v tradicionalnem monitoringu. Ta tradicionalna imena so včasih združena v skupine glede na zastarelo sistematiko, v nekaterih primerih pa se pojavljajo sinonimi z aktualnimi imeni. Za primerjavo seznamov si lahko v Eco-AlpsWater 'Taxa Analysis Tool' pomagata s poenotenimi kodami.



Kako dolgo eDNA ostane v vodi? Je eDNA različnih organizmov različno obstojna? Koliko časa po odmrtnju lahko organizmi še izločajo eDNA?

Z izrazom “okoljska DNA” (eDNA) v našem projektu označujemo celoten dedni material vseh organizmov, ki so (ali so bili) v tem okolju prisotni. Ta genetski material lahko izhaja neposredno in celic mikroorganizmov, ki jih vzorčimo skupaj z vodo (npr. mikroskopske alge ali bakterije). Pri večjih organizmih (npr. ribe ali ljudje) pa se prenaša v okolje skozi telesne izločke, odmrlo kožo ali dlakami in se lahko ohrani v obliki prostih molekul DNA še nekaj dni ali celo nekaj tednov. Obstojnost DNA v vodnih okoljih je odvisna od okoljskih pogojev (temperature, pH, vsebnosti kisika, svetlobe in drugih snovi v vodi). Če je DNA ujeta v sedimentih na dnu vodnih teles, lahko tam ostane tudi več let ali desetletij, v nekaterih primerih celo tisočletij, kar odpira vrata paleoekološkim raziskavam.

Zakaj med biološkimi parametri niste vključili tudi makrofitov in bentoških nevretenčarjev?

Zaradi finančnih omejitev projekta smo morali ta dva biološka elementa, ki sta sicer zelo pomembna, izključiti.

Ali lahko 18S zazna vrste iz rodu Euglena in druge evglenofite?

Izkazalo se je, da izbrani začetni oligonukleotidi za pomnoževanje gena 18S rRNA ne morejo zaznati evglenofitov v vodnih vzorcih. Namesto tega smo uporabili podatke gena 16S iz kloroplastov, da smo lahko kljub temu zaznali tudi to skupino organizmov.

Klasifikacijo na katerem taksonomskem nivoju lahko dosežemo s posameznimi markerji?

Medtem ko so bili genetski markerji za ribe in diatomeje zelo specializirani, pa so bili markerji za bakterije in fitoplankton bolj splošni. To pomeni, da smo lahko v prvi skupini dosegli klasifikacijo na nivoju vrste, v drugi skupini pa večinoma na nivoju rodu ali na višjih taksonomskih nivojih. Za identifikacijo organizmov na vrstnem nivoju bi bilo treba uporabiti zelo specifične začetne oligonukleotide in specifične taksonomske referenčne baze podatkov. Potrebne bi bile tudi nadaljnje filogenetske analize, da bi dosegli res optimalne rezultate.

Katere taksonne ste zaznali s posameznimi markerji v projektu Eco-AlpsWater?

Celotni sezname taksonov in genotipov, ki smo jih zaznali s HTS v projektu Eco-AlpsWater, so dostopni na seznamih HTS taksonomije pri posameznem markerju. Če se osredotočimo na vrste ali rodove posameznih bioloških komponent (v povezavi z enotnimi kodami), smo zaznali 88 cianobakterijskih, 582 ostalih fitoplanktonskih (brez cianobakterij), 226 diatomejskih in 54 ribjih taksonov; številni izmed njih so imeli več različnih genotipov. Seznami so dostopni v orodju Eco-AlpsWater ‘Taxa Analysis Tool’.

Kakšne so logistične potrebe za vzorčenje eDNA iz planktona?

V projektu Eco-AlpsWater predlagamo uporabo: sterilnih zaprtih filtrov (Sterivex®), steklenic brez DNA in rokavic za zmanjšano možnost kontaminacije. Podrobnosti so na voljo v YouTube posnetku (podpoglavje o vzorčenju) in v protokolih za vzorčenje. V naših analizah je bila izolacija DNA uspešna do 9 mesecev po vzorčenju s shranjevanjem filtrov v globoko zamrznjeni obliki.



Kam se lahko obrnem za pomoč pri interpretaciji rezultatov HTS v primeru neznanih taksonov?

Dodatne analize, npr. BLAST, lahko ponudijo dodatno razumevanje v primeru bližnje sorodnih taksonomskih skupin. Točnost klasifikacije posameznih vrst lahko izboljšajo tudi dopolnjene referenčne baze genetskih podatkov, namenjene specifični taksonomski skupini ali ekoregiji.

Zakaj ste pri cianobakterijah uporabljali BLAST?

Za cianobakterije, pa tudi za druge biološke skupine, smo samodejno taksonomsko določitev še izboljšali z uporabo referenčnih sekvenc iz taksonomske literature, npr. s primerjavo pridobljenih cianobakterijskih ASV-jev z morfološko opisanimi izolati (sevi). Pri določenih ASV-jih za 16S, kjer je zaradi analize z BLASTn prišlo do spremembe imena taksona, je to označeno v Eco-AlpsWater 'Taxa Analysis Tool'.

Kako deluje metoda VigiDNA® za vzorčenje ribje eDNA?

VigiDNA® je ime filtrov, ki smo jih uporabili v projektu Eco-AlpsWater za analizo ribje raznovrstnosti v alpskih vodah. Ti zaprti filtri (VigiDNA®, Spygen®) so namenjene filtraciji večjih volumnov vode (30L), zbrane ob jezerskih obalah ali na sredini rek. Po filtraciji smo filtre napolnili s pufrom za shranjevanje in shranili na sobni temperature do izolacije DNA.

Kakšne reke so primerne za analizo s sistemom VigiDNA®?

Ta sistem je primeren za kakršenkoli tip rek in z njim lahko prefiltriramo do 30 litrov vode z enim filtrom. Vzorčenje pa je lahko oteženo v rekah z visoko vsebnostjo trdnih delcev, saj lahko drobni sediment zamaši filter preden prefiltriramo vseh 30 litrov. Zato priporočamo premišljeno načrtovanje vzorčenja, npr. ne v času poplav ali tik po njih.

Katere začetne nukleotide ste uporabili za analizo ribje eDNA?

Za sekvenciranje vzorcev ribje eDNA smo uporabili začetne oligonukleotide Mi-Fish-U, ki se pogosto uporabljajo za metabarkodiranje rib.

Ali lahko rezultate eDNA analiz povežemo s specifičnim odsekom reke?

To je odvisno od zasnove vzorčenja. eDNA se v rekah vedno prenaša s tokom navzdol, zato lahko zaznamo le ribe, ki se pojavljajo gorvodno od mesta vzorčenja.

Ali lahko na podlagi pogostosti sekvenc DNA posameznih vrst sklepamo tudi o njihovi številčnosti?

Ne, za zdaj takšne analize še ne omogočajo pridobivanja podatkov o absolutni številčnosti posameznih vrst rib na podlagi števila odčitkov DNA.

Katere pristope za analizo ribje eDNA ste uporabili v projektu Eco-AlpsWater?

Uporabili smo tri različne pristope: (i) VigiDNA®, kjer smo prefiltrirali 30 litrov vode skozi zaprti filter; (ii) Sterivex® točkovno vzorčenje, kjer smo vzorčili po 2 litra vode na začetku, na sredini in na koncu vsakega transekt jezerske obale, ki je bil uporabljen za VigiDNA® vzorčenje; (iii) GFC (ang. 'glass fiber filter') točkovno vzorčenje, kjer smo vzorčili 5 litrov vode na tradicionalnih vzorčnih točkah.



Pridružite se naši mreži 'Eco-AlpsWater Alpine Network' na:

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

in še naprej spremljajte naše aktivnosti!



Interreg
Alpine Space
Eco-AlpsWater
European Regional Development Fund



Interreg
Alpine Space
Eco-AlpsWater
European Regional Development Fund



Ta brošura je nastala v okviru projekta Eco-AlpsWater, ki ga delno financira Evropska unija iz Evropskega sklada za regionalni razvoj (podpora EU: 1.447.666,54 €). Projekt je bil izveden v okviru transnacionalnega programa Interreg Območje Alp za obdobje 2014-2020.