

EKOLOŠKO STANJE POVRŠINSKIH VODA

ECOLOGICAL STATUS OF SURFACE WATERS

NOV PRISTOP K VREDNOTENJU EKOLOŠKEGA STANJA VODA NA PODLAGI ANALIZ OKOLJSKE DNA (eDNA)

New approach of ecological status assessment with environmental DNA (eDNA)

Aleksandra Krivograd Klemenčič,
Tadeja Šter, Špela Remec Rekar

Ekološko stanje voda ugotavljamo na podlagi spremljanja vrstne sestave in številčnosti bioloških elementov kakovosti (fitobentos, fitoplankton, makrofiti, makroalge, bentoški nevretenčarji in ribe). Poleg rastlinskih in živalskih združb v okviru ekološkega stanja voda spremljamo tudi stanje njihovega življenjskega okolja s spremljanjem splošnih fizikalno-kemijskih in hidromorfoloških elementov ter posebnih onesnaževal.



Slika 1. *Pediatrum simplex* var. *echinulatum*, predstavnik fitoplanktona. Foto: Remec-Rekar Š.
Figure 1. *Pediatrum simplex* var. *echinulatum*, representative of phytoplankton. Photo: Remec-Rekar Š.



Slika 2. *Cyclotella meneghiniana*, predstavnica fitobentosa. Foto: Krivograd Klemenčič A.
Figure 2. *Cyclotella meneghiniana*, representative of phytobenthos. Photo: Krivograd Klemenčič A.

Določanje vrstne sestave in številčnosti bioloških elementov kakovosti skladno z Vodno direktivo (2000/60/ES) je časovno zelo zahteven proces, ki ga lahko opravljajo le visoko usposobljeni strokovnjaki. Poleg vzorčenja, ki zahteva posebno in drago opremo (npr. plovilo, specializirane mreže, vzorčevalnike) in je za večino bioloških elementov kakovosti zelo zahtevno in dolgotrajno, je potrebno še veliko ur oz. dni klasičnega taksonomskega dela v laboratoriju, da dobimo rezultat – oceno ekološkega stanja vodnega telesa na posameznem merilnem mestu za posamezen element kakovosti. Zaradi vsega zgoraj naštetega je vedno več raziskav na področju ekološkega stanja voda usmerjenih v iskanje dopolnilnih alternativnih rešitev na podlagi novodobnih genetskih pristopov, s katerimi bi lahko dopolnili vrednotenje ekološkega stanja voda na hitrejši, enostavnejši in s tem cenejši način.

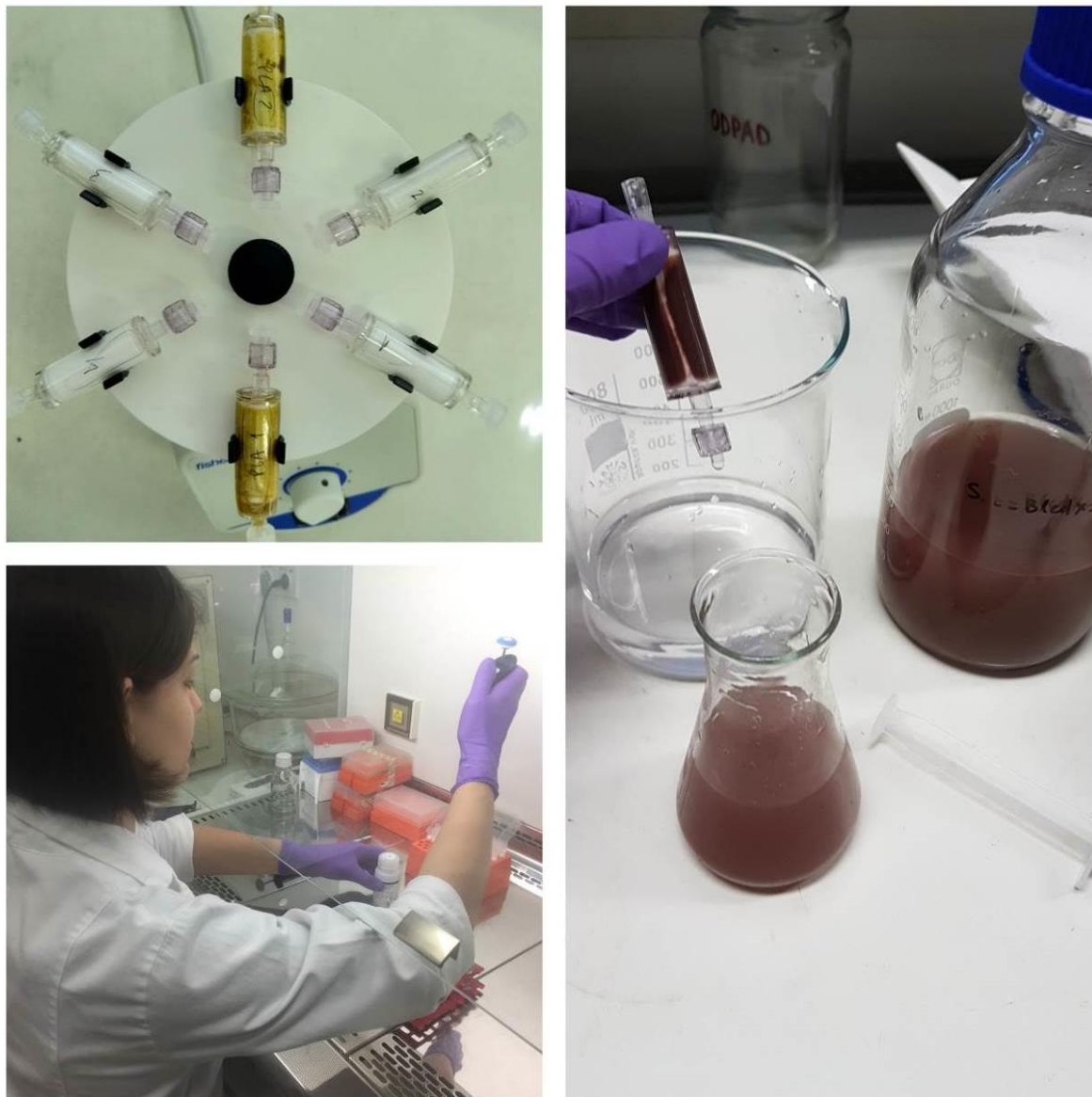
Novodobni genetski pristopi vrednotenja ekološkega stanja temeljijo na analizah okoljske deoksiribonukleinske kisline (DNA) (environmental DNA; eDNA). DNA je dedni material v organizmih, ki vsebuje vse informacije, ki so potrebne za življenjske funkcije celice. Vsak organizem ima svoje edinstveno zaporedje molekul, imenovanih nukleotidi, ki gradijo DNA. Na podlagi zaporedja nukleotidov v DNA ločimo različne skupine organizmov (npr. bakterije, alge, ribe), različne vrste znotraj iste skupine organizmov in tudi posamezne organizme znotraj iste vrste.



Slika 3. Vzorčenje za eDNA analize fitoplanktona, fitobentosa in rib na Blejskem jezeru (zgoraj in desno spodaj) in reki Soči (levo spodaj), poletje 2019. Foto: Remec-Rekar Š.
 Figure 3. Sampling for eDNA analysis of phytoplankton, phytobenthos and fish at Lake Bled (above and below right) and at Soča River (below left), summer 2019. Photo: Remec-Rekar Š.

eDNA je celoten genetski material, ki ga lahko najdemo v nekem okolju. DNA iz organizmov se v okolje sprošča preko iztrebkov, urina, sluzi, spolnih celic itd. Z analizami eDNA v vzorcu vode zaznamo organizme, ki so trenutno prisotni v izbranem okolju. S sekvenciranjem DNA preberemo zaporedje nukleotidov, ki ga nato primerjamo z genomskimi knjižnicami (znana zaporedja nukleotidov pri posameznih vrstah) in na podlagi tega določimo vrste organizmov, ki jim genetski material pripada. Vzorčenje vode za analize eDNA je za določene biološke elemente kakovosti, kot so ribe, enostavnejše od klasičnega vzorčenja bioloških elementov kakovosti, vendar je zaenkrat sekvenciranje še precej drag postopek, ki še ni optimiziran za vsa vodna okolja. Poleg tega genomske knjižnice še niso izpopolnjene do te mere, da bi bilo možno na podlagi eDNA prepoznati posamezne vrste tudi za nižje skupine organizmov, kot so npr. alge in cianobakterije. Tudi razvoj ustreznih indeksov na podlagi genetskih sekvenc za izračune obremenjenosti vodnih teles (trofičnost, saprobnost, degradiranost okolja, itd.) je še v teku.

Analiza eDNA je obetaven pristop biomonitoringa nove generacije s katero bi se lahko nadgradilo obstoječe klasične metode vrednotenja ekološkega stanja voda. Zaenkrat se na ravni Evropske unije še ne razmišlja o zamenjavi klasičnih taksonomskih pristopov z novodobnimi genetskimi analizami, saj je potrebno še precej raziskav preden bodo postopki toliko razviti, da se bodo lahko prenesli v prakso.



Slika 4. Izolacija DNA iz okoljskih vzorcev na Nacionalnem inštitutu za biologijo. Foto: Zupančič M., Zabukovnik J.
Figure 4. DNA isolation from environmental samples at National Institute of Biology in Slovenia. Photo: Zupančič M., Zabukovnik J.

Sektor za ekološko stanje voda (Urad za stanje okolja) Agencije RS za okolje sodeluje pri razvoju metodologij vrednotenja ekološkega stanja na podlagi analiz eDNA preko sodelovanja v razvojnem EU projektu Eco-AlpsWater, ki se izvaja v okviru transnacionalnega programa Območje Alp. Nekaj osnovnih informacij o projektu je podanih na koncu tega prispevka.

Temeljna cilja projekta Eco-AlpsWater sta (a) primerjava tradicionalnih načinov vrednotenja ekološkega stanja jezer in vodotokov (kot se izvajajo skladno z Vodno direktivo v okviru rednega dela Sektorja za ekološko stanje vode na ARSO) z naprednimi analizami sekvenciranja eDNA (ki se razvijajo v okviru projekta Eco-AlpsWater) in (b) priprava priporočil za nadgradnjo (izboljšavo) tradicionalnih

načinov vrednotenja ekološkega stanja znotraj alpskega območja. Zaradi obsežnosti se projekt osredotoča le na biološke elemente kakovosti fitoplankton, fitobentos in ribe.

Leto 2019 je bilo namenjeno predvsem vzorčenju. Pilotni območji v Sloveniji sta Blejsko jezero in reka Soča. Poleg obeh pilotnih območij je bilo v projekt vključenih še 10 merilnih mest na vodotokih in 4 merilna mesta na jezerih oz. zadrževalnikih. Na vseh merilnih mestih smo poleg klasičnega vzorčenja bioloških elementov izvedli tudi vzorčenje za analizo eDNA (slika 3). Skupno smo na območju Slovenije nabrali 28 vzorcev za analizo fitoplanktona, 23 vzorcev za analizo fitobentosa in 4 vzorce za analizo rib, nabrali smo tudi enako število vzorcev za eDNA. Na sektorju za ekološko stanje voda smo izvedli tradicionalne taksonomske analize, izolacija eDNA iz okoljskih vzorcev je bila izvedena na Nacionalnem inštitutu za biologijo (slika 4), nato pa smo vzorce izolirane eDNA poslali v laboratorije različnih projektnih partnerjev v nadaljnjo obdelavo. Podoben način analiz so izvedle tudi okoljske agencije iz ostalih držav programa Območja Alp (Avstrija, Nemčija, Francija, Švica in Italija). V naslednjem koraku sledi primerjava rezultatov tradicionalnih taksonomskih analiz z rezultati analiz eDNA. Na podlagi dobljenih rezultatov in primerjave obeh postopkov vrednotenja ekološkega stanja voda bomo pripravili priporočila za nadgradnjo tradicionalnih metod monitoringa ekološkega stanja in izpopolnitev v okviru projekta razvitih metodologij analize eDNA.

Novembra 2019 smo slovenski partnerji projekta Eco-AlpsWater organizirali peto srečanje projektnih partnerjev na Bledu. Srečanja so se udeležili predstavniki vseh 12 partnerskih organizacij. Okoljske agencije smo predstavile podrobnosti z vzorčenja in izpostavile teme, kjer je še prostor za izboljšave v okviru projekta razvitih metodologij vzorčenja posameznih bioloških elementov za analizo eDNA. Preko diskusije vseh projektnih partnerjev so bile pripravljene iztočnice za nadgradnjo obstoječih metodologij. Pripravljen je bil tudi podrobnejši plan analize zbranih vzorcev, tako s klasičnimi taksonomskimi metodami, kot z novodobnimi genskimi metodami z analizo eDNA.



Slika 5. Peto srečanje partnerjev projekta Eco-AlpsWater, ki je potekalo od 20. do 21. novembra 2019 na Bledu.
Figure 5. 5th Eco-AlpsWater Project Meeting which was held from 20–21 November 2019 at Bled in Slovenia.

Nekaj osnovnih informacij o projektu Eco-AlpsWater

Projekt Eco-AlpsWater s polnim naslovom »Inovativno ekološko vrednotenje in strategija upravljanja z vodami za zaščito ekosistemskih storitev v alpskih jezerih in rekah/Innovative Ecological Assessment and Water Management Strategy for the Protection of Ecosystem Services in Alpine Lakes and Rivers« se izvaja v okviru transnacionalnega programa sodelovanja Območje Alp za obdobje 2014–2020. Sodi v prednostno os »Življenjski prostor Območja Alp – Izboljšanje varovanja, ohranitve in ekološke povezanosti Območja Alp«. Vodilni partner projekta je Fondazione Edmund Mach (FEM) iz Trento, Italija. V projektu sodeluje še 11 projektnih partnerjev in sicer raziskovalne inštitucije in okoljske agencije pristojne za monitoring iz Slovenije, Italije, Avstrije, Nemčije, Švice in Francije. Slovenska partnerja pri projektu sta ARSO in Nacionalni inštitut za biologijo. Projekt se je pričel 17. 4. 2018 in bo trajal do 16. 4. 2021. Skupna vrednost projekta je 1.804.494,95 EUR, delež Agencije RS za okolje pa znaša 121.554,65 EUR.



Slika 6. Prvo srečanje partnerjev projekta Eco-AlpsWater, ki je potekalo od 11. do 12. junija 2018 v kraju S. Michele all'Adige, Italija.

Figure 6. Kick-off meeting of Eco-AlpsWater project 11–12 June 2018, S. Michele all'Adige, Italy.

Več informacij o projektu je dostopnih na spletni strani projekta: www.alpine-space.eu/eco-alpswater

Kontaktne osebe na ARSO:

dr. Aleksandra Krivograd Klemenčič, vodja projekta (aleksandra.krivograd-klemencic@gov.si)

mag. Špela Remec-Rekar, namestnica vodje projekta (spela.remec-rekar@gov.si)

Tadeja Šter, projektna pisarna (tadeja.ster@gov.si)

SUMMARY

Slovenian Environment Agency is participating in Eco-AlpsWater project (Interreg Alpin Space; www.alpine-space.eu/eco-alpswater) with duration from April 2018 to April 2021. There are 12 partner institutions involved in Eco-AlpsWater from all six countries of Alpine region (Italy, Germany, Austria, France, Switzerland, and Slovenia).

The aim of the project is development and implementation of innovative tools for the evaluation of ecological status of Alpine lakes and rivers to improve the traditional monitoring approaches according to Water Framework Directive. The investigations are focussed on the study of phytobenthos, phytoplankton, and fish. Innovative tools are based on advanced DNA sequencing techniques. The new approach will make use of Next Generation Sequencing to analyze environmental DNA (eDNA) in waterbodies which allow rapid species identification at low costs.

In 2019 parallel sampling using traditional and innovative (eDNA) methods was implemented in Slovenian lakes, reservoirs, and rivers as well as in other countries in Alpine region. Innovation based on analysis of more than 500 collected environmental samples with Next Generation Sequencing will provide solid information to support suggestions for the improvement of traditional monitoring approaches.