



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DEL MOLISE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE
Dipartimento di Bioscienze e Territorio
Laboratorio Environmetrics
Pesche (Isernia)

P.S.R. 2014/2020 – Operazione 7.6.1
Studi e investimenti finalizzati alla tutela dell'ambiente e del patrimonio culturale
e alla conservazione della biodiversità

Linee guida per il monitoraggio di specie delle acque dolci dell'Italia centrale tramite tecniche di DNA ambientale

Simone Giovacchini e Anna Loy

30 settembre 2023



Responsabile scientifico
Anna Loy

Citazione consigliata

Giovacchini S., Loy A. 2023. Linee guida per il monitoraggio di specie delle acque dolci dell'Italia centrale tramite tecniche di DNA ambientale. Relazione tecnica realizzata nell'ambito del P.S.R. 2014/2020 - Operazione 7.6.1 Studi e investimenti finalizzati alla tutela dell'ambiente e del patrimonio culturale e alla conservazione della biodiversità.

Le presenti Linee guida scaturiscono da un lavoro di ricerca finanziato nell'ambito del **PSR 2014/2020 - Operazione 7.6.1**, riguardante 'Studi e investimenti finalizzati alla tutela dell'ambiente, del patrimonio culturale e alla conservazione della biodiversità'. Il progetto, dal titolo **'Implementazione di un protocollo di rilevamento multispecifico e sorveglianza di specie di interesse unionale nelle acque dolci del Lazio attraverso DNA ambientale e modelli di connettività'**, è stato realizzato con il sostegno del FEASR.

Sommario

1. Introduzione.....	3
2. L'ecologia del DNA ambientale. Ripercussioni sulla strategia e sulle tecniche di campionamento.....	6
2.1 Produzione e detectability	7
2.2 Persistenza e degradazione.....	8
2.3 Trasporto e diffusione.....	11
2.4 DNA disponibile al rilevamento.....	13
2.4.1 Inibizione.....	14
2.4.2 Contaminazione	14
3. Selezione delle specie	16
Finalità di gestione	17
Aspetti pratici.....	17
Valutazioni di carattere scientifico.....	18
3.1 Rilevamento mono- o multispecifico	19
Rilevamento di singole specie.....	19
Rilevamenti multispecifici	19
4. Selezione dei siti di campionamento	22
Ecologia delle specie	22
5. Quando campionare: stagionalità e fenologie.....	24
6. Campionamento e di filtrazione.....	26
6.1 Campionamento dell'acqua ambientale	26
6.1.2 Localizzazione dei punti di prelievo di acqua ambientale	26
6.1.3 Quantità di acqua.....	28
6.1.4 Aspetti pratici e considerazioni tecniche	29
6.2 Campionamento delle variabili ambientali	30
6.3 Filtrazione del campione di acqua ambientale	31
6.3.1 Materiale del filtro	31
6.3.2 Dimensione dei pori	32
6.3.3 Filtrazione in campo o in laboratorio	33
6.3.4 Conservazione del DNA ambientale.....	34
6.3.4 Rilevamento dei parametri ambientali	35
7. Estrazione del DNA ambientale	36
8. Considerazioni finali sulle metodologie di campionamento	37
Bibliografia	39

1. Introduzione

Il ritmo vertiginoso con il quale stiamo assistendo alla continua perdita di biodiversità è diventato sempre più serrato nel corso degli ultimi decenni. A farne le spese sono gli ecosistemi di tutto il globo ed il capitale naturale che supporta la vita umana sul pianeta. Ma gli impatti antropici che hanno portato a queste conseguenze deleterie non si sono concentrati in maniera omogenea sui diversi ambienti naturali. Tra questi, gli ecosistemi d'acqua dolce rappresentano probabilmente il più minacciato sul pianeta (Dudgeon 2002).

La conoscenza dello stato in cui versa un ambiente è fondamentale per comprendere con quali azioni effettuare dei programmi di recupero ecosistemico che prendano in considerazione anche le componenti biologiche. Il continuo monitoraggio degli ambienti acquatici, ad esempio, permette di conoscere con frequenza cadenzata lo status delle specie in pericolo. Spesso, tuttavia, i monitoraggi non sono indirizzati al rilevamento di una delle minacce più impattanti delle acque dolci, ossia l'invasione pressoché ubiquitaria da parte delle specie alloctone. Tale questione è di vitale importanza per la salute dei sistemi delle acque interne poiché è stato ampiamente dimostrato che un intervento di rimozione rapida delle prime popolazioni colonizzatrici è il metodo più efficace nel contrastare la banalizzazione delle comunità biologiche operata dall'avvento di questa tipologia di specie (Kluever et al. 2023). A tal fine è doveroso impostare una serie di programmi di sorveglianza per monitorare l'ingresso delle specie invasive che più probabilmente possono occorrere negli habitat di interesse. La difficoltà nell'effettuare dei campionamenti mirati al rilevamento subitaneo di eventuali eventi di neo-colonizzazione è determinata dal fatto da questioni di carattere tecnico-scientifico, ed in particolare, alla sensibilità del metodo di campionamento prescelto.

Le tecniche che convenzionalmente si applicano al campionamento della fauna di acqua dolce si mostrano spesso poco sensibili nel rilevare le popolazioni a basse densità, una condizione tipica dei primi stadi delle colonizzazioni. Tali metodi in genere implicano la cattura degli individui, tramite nasse o reti nel caso dei rettili o la pesca tramite elettrostordimento nel caso dei pesci, o di entrare in contatto indiretto captando le vocalizzazioni, nel caso degli anfibi. La cattura nello specifico è un metodo specie-specifico o taxon-specifico che difficilmente porta ad una valutazione integrata della comunità animale. Richiede, inoltre, uno sforzo campionario molto intenso e la manipolazione diretta causa stress negli individui o può danneggiarli.

Le tecniche genomiche basate sul rilevamento del DNA ambientale sono un metodo non invasivo assolutamente valido per indagare la presenza delle specie animali e vegetali su ampie aree ed in tempi brevi. Esse possono applicarsi a matrici ambientali di diversa natura: acqua, aria, suolo, neve, biofilm. La loro potenzialità è dettata dal fatto che prescindono dall'entrare in contatto diretto con gli organismi o che non prevedono tempi di ricerca nella ricerca indiretta di segni di presenza. Questo è particolarmente utile nel rilevare specie rare che vivono a basse densità demografiche o che manifestano comportamenti elusive o siano difficilmente contattabili, per esempio per le dimensioni ridotte. Inoltre, offre la possibilità di poter analizzare contemporaneamente la presenza di più specie, anche se queste appartengono a *taxa* molto differenti tra di loro, e quindi di chiarire, in parte, alcuni aspetti della comunità animale di una determinata area.

Il DNA ambientale offre due tipologie di approccio allo studio della biodiversità: quello *specie-specifico* e quello rappresentato dal *metabarcoding*. L'approccio specie-specifico permette di effettuare studi che possono essere mirati sia al rilevamento di una specie singola che a quello di più specie in contemporanea. Il risultato che ne deriva è la determinazione di un dato di presenza/assenza relativo alla selezione delle specie

che si intende indagare. Questo fa sì che spesso tali studi siano orientati verso specie criptiche o rare, oppure verso specie invasive nei primi stadi invasivi in maniera da allertare le autorità gestionali e tentare di contenere la popolazione o di eradicarla. Il quadro generale che restituisce l'approccio specie-specifico è quello relativo alla conoscenza di pochi elementi della comunità animale e vegetale, la cui determinazione tassonomica è però molto elevata in accuratezza.

L'approccio *metabarcoding* offre una visione della composizione della comunità di un biotopo completamente diversa. È una metodologia che restituisce un quadro della biodiversità più generico e ampio, ma di minor dettaglio, con una determinazione che può fermarsi solo al livello di Famiglia. La comunità di un biotopo è quindi descritta in toto, ma da una prospettiva tassonomica. Se ne può desumere una quantificazione della diversità biologica ma non si possono determinare con sicurezza quali specie compongono la comunità.

Le tecniche basate sul DNA ambientale offrono uno strumento prezioso per il monitoraggio speditivo e contemporaneo di molti taxa anche elusivi, criptici o filogeneticamente distanti, utili all'aggiornamento delle banche dati, alla ricostruzione di areali di distribuzione, alla definizione di indici di ricchezza e abbondanza di specie, allo studio delle comunità, e al rilevamento precoce di specie esotiche e patogeni

Le potenzialità di tale metodo sono tali da essere adottate come routine dagli Enti locali degli Stati Uniti per il monitoraggio delle acque (USGS - United States Geological Survey). Indici di biodiversità aggregati basati su eDNA sono stati anche proposti per i monitoraggi richiesti dalle normative sulla tutela delle acque (Apothéloz-Perret-Gentil et al. 2021; Curtis 2022).

Anche in Europa si sta tentando di seguire questa direzione e di inserire il DNA ambientale tra le tecniche impiegate per il monitoraggio delle acque previsti dalla Direttiva Acque (2000/60/CEE), per il monitoraggio demografico delle specie soggette a prelievo e per le valutazioni d'impatto ambientale.

Tuttavia, per ottenere risultati affidabili applicando queste tecniche e poterle integrarle all'interno del quadro operativo dei monitoraggi, è necessario standardizzare le metodiche e calibrarle con i metodi tradizionali (Pilliod et al. 2019).

Negli ultimi anni la comunità scientifica sta concentrando gli sforzi per colmare le lacune conoscitive sulle dinamiche che regolano il DNA ambientale, la cui comprensione è di fondamentale importanza nell'aumentare l'accuratezza dei parametri che si intende misurare. Il ruolo della ricerca si esplica anche nella messa a punto e sperimentazione di nuove tecnologie che consentiranno di ottenere risultati sempre più rapidi, accurati e a costi più ridotti. tra questi, sequenziatori di campo, approcci metagenomici che non prevedono l'utilizzo della fase di PCR (Polymerase Chain Reaction) e strumenti per il rilievo rapido delle specie. Tuttavia, già al giorno d'oggi le potenzialità delle tecniche basate sul DNA ambientale, appurate da un'incredibile quantità di letteratura scientifica, costituiscono uno strumento pronto per essere posto al servizio degli enti pubblici preposti al monitoraggio della biodiversità e degli ambienti naturali.

Con questo documento ci proponiamo di presentare delle linee guida che consentano di pianificare e realizzare progetti di monitoraggio di specie in acque dolci secondo un approccio eDNA specie-specifico.

Nell'impostazione di uno studio di DNA ambientale possono insorgere alcune problematiche di carattere strategico, logistico, scientifico, tecnologico ed economico. Un flusso di lavoro tipico di un progetto di rilevamento del DNA ambientale è illustrato in Fig. 1. Per ciascuna fase del lavoro devono essere attentamente valutate e risorse necessarie, i tempi e le problematiche che possono insorgere.

Ognuna di queste fasi verrà esplicitata più in dettaglio nei capitoli seguenti di questo documento, corredato di alcuni dati derivati da uno studio realizzato dall'Università del Molise nell'ambito di progetto finanziato dalla Regione Lazio su fondi del Programma di Sviluppo Rurale (PSR) 2014/2020 del Lazio (Misura 7.6.1).

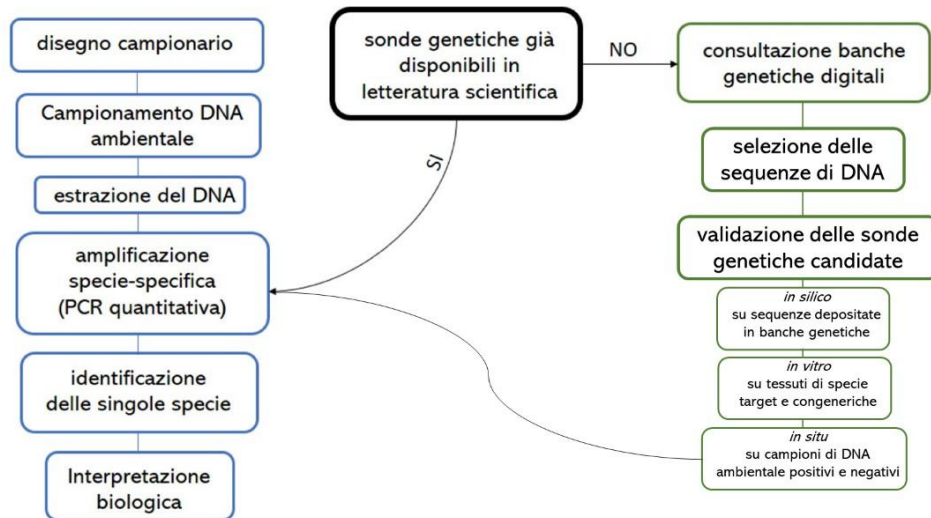


Figura 1. Flusso di lavoro di uno studio di rilevamento di specie attraverso le tecniche basate sul DNA ambientale.

2. L'ecologia del DNA ambientale. Ripercussioni sulla strategia e sulle tecniche di campionamento.

Il *DNA ambientale* (o *environmental DNA*, d'ora in avanti eDNA) può presentarsi sotto forma di molecole di DNA rilasciate nell'ambiente da un organismo attraverso i suoi essudati cellulari (pelle, peli, cellule intestinali contenute nelle feci, urina, sangue, saliva, lacrime) (Rees et al. 2014). Un secondo modo in cui si può presentare l'eDNA è sotto forma di DNA protetto all'interno degli organelli subcellulari (mitocondri, nucleo, ribosomi per l'rRNA) dopo che le cellule sono andate incontro a degradazione. Una terza fonte di eDNA è costituita dal DNA libero disperso direttamente nella matrice ambientale. Il DNA ambientale, definito in tale maniera come *DNA extra cellulare* o *extra-organismo*, viene così distinto dal DNA costituito da cellule o interi organismi che vengono campionati insieme al campione ambientale, detto *DNA organismico*.

La probabilità di rilevare il DNA ambientale di una determinata specie è influenzata da fattori biotici e abiotici (Randall et al. 2023). Il rilascio di DNA può variare da specie a specie e in relazione alla biomassa, abbondanza, livelli di attività, stadi vitali e densità delle popolazioni (Rees et al. 2014, Goldberg et al. 2016, Stewart 2019). Anche differenze nel grado di dispersione del DNA nell'ambiente possono comportare una variabilità nella probabilità di rilevamento nel tempo e nello spazio (Randall et al. 2023). Tali fattori includono la stagione (Goldberg et al. 2011, Buxton et al. 2017b, Franklin et al. 2018, Takahashi et al. 2018), la tipologia del corso d'acqua (lentico o lotico, Deiner et al. 2016, Hanfling et al. 2016), il pH (Strickler et al. 2015, Seymour et al. 2018), la torbidità (Wineland et al. 2019), la temperatura dell'acqua (Takahara et al. 2012, Strickler et al. 2015, Buxton et al. 2017b, Saito and Doi 2021), il substrato (Buxton et al. 2017a) e l'esposizione a radiazioni (Pilliod 2014, Strickler et al. 2015).

Tali parametri descrivono in qualche modo una sorta di "ecologia" del DNA ambientale, perché hanno un effetto diretto su:

- produzione del DNA ambientale
- modalità di trasporto e mobilitazione del DNA nell'ambiente
- degradazione del DNA
- inibizione del DNA

Questi fattori devono essere combinati con i parametri che influiscono sulla presenza delle specie, sia in termini spaziali (habitat idonei) che temporali (fenologia delle specie).

Tenere in considerazione questi fattori è estremamente importante in quanto possono influenzare l'interpretazione dei risultati.

A differenza dei metodi che restituiscono dati puntuali di presenza di una specie (osservazioni dirette o indirette) in un determinato periodo, il DNA ambientale comporta un certo grado di incertezza sia sull'effettiva localizzazione del punto di origine del DNA sia sull'intervallo temporale in cui il DNA è stato rilasciato (Randall et al. 2023).

Negli studi basati su dati molecolari esiste inoltre la possibilità di incorrere nelle cosiddette *false-assenze* (la specie non è rilevata laddove è presente) e *false presenze* (la specie è rilevata laddove non è presente). Le false assenze possono essere indotte da una degradazione precoce del DNA o da una sua bassa concentrazione, mentre le false presenze sono principalmente causate dalla mobilitazione di DNA tra ambienti diversi, per cause antropiche o naturali, o dalla contaminazione tra campioni durante lo studio (Kéry e Schmidt 2008).

In Fig. 2 sono riassunti i fattori che influenzano la probabilità di rilevamento del DNA ambientale.

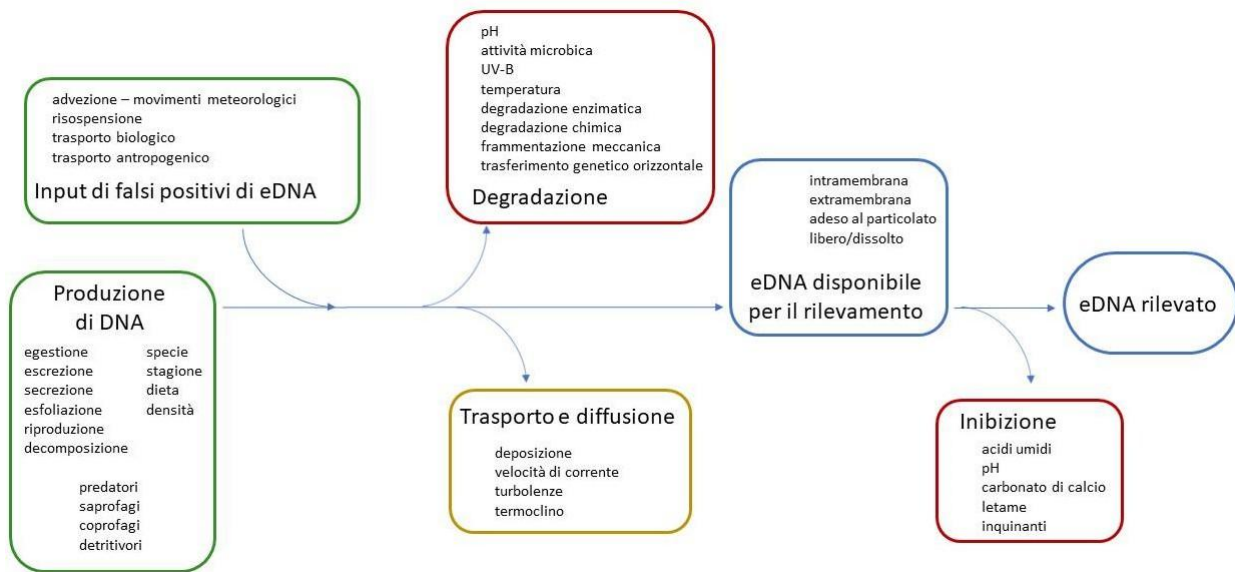


Figura 2. Fattori biotici e abiotici che influenzano la probabilità di rilevamento (*detectability*) del DNA ambientale (modificato da Strickler et al. 2015; Barnes e Turner 2016;).

Nelle sezioni che seguono tratteremo in maniera più approfondita come ottimizzare un campionamento di DNA ambientale

2.1 Produzione e *detectability*

Il DNA ambientale viene perso in natura principalmente sotto forma di cellule e tessuti che poi si frammentano e rilasciano DNA nell'ambiente. All'interno degli ambienti acquatici, cellule e tessuti vengono persi tramite feci, un meccanismo di dispersione importante soprattutto per rilevare gli organismi terrestri, secrezioni mucose della pelle (es. anfibi, pesci), carcasse in decomposizione, saliva, uova e spermatozoi (Martellini et al. 2005; Ficetola et al. 2008; Jerde et al. 2011). Tutto questo determina quella che viene definita la produzione del DNA ambientale. La probabilità di rilevamento (*detectability*) di una specie tramite l'utilizzo di DNA ambientale aumenta in relazione alla produzione di DNA da parte delle specie. L'aumento delle concentrazioni di DNA ambientale diminuisce la probabilità di rilevare false assenze.

Tra le variabili che sono maggiormente correlate con un aumento di produzione del DNA ambientale vi è la biomassa della popolazione dell'organismo target, ed in particolare la dimensione della popolazione (Pilliod et al. 2014, Maruyama et al. 2014). La correlazione tra dimensione di popolazione e numero di copie di eDNA disperse nella matrice ambientale è talmente evidente che il eDNA è stato anche utilizzato per effettuare stime di popolazione (Thomsen et al. 2012; Takahara et al. 2012; Pilliod et al. 2013; Levi et al. 2019). La relazione tra concentrazione di DNA ambientale e densità delle popolazioni deve però essere valutata con precauzione, dato che la quantità di DNA rilasciato nell'ambiente può anche essere in relazione alla fonte e non alla concentrazione di individui (es. nel caso di carcasse in acqua) (Randall et al. 2023)

La *detectability* è anche influenzata dal metabolismo delle specie. Cambiamenti nel metabolismo durante l'ontogenesi di determinate specie fanno sì che i giovani in crescita perdano più tessuti rispetto agli altri

segmenti della popolazione, e che il loro contributo nella produzione di DNA massimizzi la *detectability* nonostante i minori valori di biomassa (Maruyama et al. 2014; Iversen et al. 2015; Schmidt et al. 2021a). Cambiamenti nel metabolismo sono causati in maniera indiretta anche dalla variazione di fattori abiotici. Si può osservare, ad esempio, come una maggiore produzione di eDNA sia associata ad un aumento della temperatura dell'acqua. Questo fenomeno ha un carattere spiccatamente stagionale, a seguito delle variazioni della temperatura dell'aria, ed implica che durante la stagione estiva la produzione di eDNA da parte degli organismi aumenti in maniera massiccia rispetto all'inverno (Schmidt et al. 2021; Lacoursiere-Roussel et al. 2016). Anche per le piante è stato mostrato un fenomeno simile (Potè et al. 2009).

La *detectability* può variare anche in funzione del comportamento: tassi maggiori di produzione di DNA ambientale sono associati ad attività di alimentazione più pronunciate, ovvero individui che spendono più tempo nella ricerca e acquisizione del cibo (Klymus et al. 2014). In questi casi è probabile che il rilascio di una maggiore quantità di eDNA sia causato dalla maggiore attività di defecazione. Anche la presenza di fattori di stress può portare ad un aumento fino a 100 volte del numero di copie di eDNA (Sassoubre et al. 2016; Jo et al. 2019; Maruyama et al. 2014; Thalinger et al. 2021). Organismi che sono stressati, caldi e attivi rilasciano quindi quantità maggiori di eDNA.

La quantità di eDNA varia anche in relazione al gruppo tassonomico. Pesci, anfibi e molluschi rilasciano grandi quantità di DNA negli ambienti d'acqua dolce. Anche i mammiferi, tanto quelli semiacquatici che quelli terrestri (lagomorfi, ungulati, mustelidi, talpidi) sono rilevati in maniera efficiente, soprattutto tramite l'approccio eDNA metabarcoding (Jamwal et al. 2021; Broadhurst et al. 2021). I risultati sono molto eterogenei tra le diverse specie, ma evidenziano le potenziali applicazioni del fenomeno che descrive il fiume come un nastro trasportatore del DNA della fauna terrestre, probabilmente grazie al ruscellamento delle acque meteoriche sul terreno (Deiner et al. 2016; Sales et al. 2020 a,b).

Gli artropodi e i rettili invece sembrano essere più difficili da rilevare tramite le tecniche basate sul eDNA, probabilmente a causa del loro esoscheletro o del tegumento ipercheratinizzato, in particolare se presenti a basse densità (Treguier et al. 2014, Allan et al. 2020; Adams et al. 2019; Curtis 2020). È stato anche ipotizzato che gli animali ectotermi possono avere una probabilità di rilevamento minore a causa dei loro bassi tassi metabolici che portano a produrre quantità ridotte di eDNA (Bruce et al. 2021).

Ad alte densità di popolazione e con l'adozione di particolari protocolli e metodi di filtrazione ed estrazione (Geerts et al. 2018), gli approcci basati sul eDNA sono stati anche utilizzati per stimare l'abbondanza delle popolazioni di crostacei e rettili dulcacquicoli (Lam et al. 2019; Kakuda et al. 2019), e si stanno facendo progressi anche a densità molto esigue (King et al. 2022).

2.2 Persistenza e degradazione

Il DNA possiede una limitata stabilità chimica e quindi, a seconda delle condizioni ambientali, appena viene rilasciato nell'ambiente inizia a degradarsi (Lindahl 1993). La sua persistenza nell'ambiente dipende dalle caratteristiche del DNA (conformazione, lunghezza, associazione con altri organelli cellulari provvisti di ulteriori membrane di protezione come i mitocondri), dall'ambiente abiotico (temperatura, luce, pH, ossigeno, salinità, composizione dei substrati) e dalle componenti biotiche presenti nell'ambiente (composizione e attività della comunità microbica, enzimi extracellulari). Ulteriori forme di degradazione del DNA sono rappresentate dalla frammentazione meccanica (es. turbolenza delle acque) e dalla degradazione chimica (Barnes e Turner 2016).

Il DNA quando viene rilasciato inizia a frammentarsi prima meccanicamente e successivamente per l'intervento di enzimi extracellulari e di reazioni chimiche spontanee. Un frammento di tessuto iniziale si

riduce prima in più cellule, per poi separarsi nei vari organelli subcellulari ed infine viene ridotto in forma libera di DNA extracellulare (Harrison et al. 2019). L'intensità della degradazione permette di selezionare le tipologie di molecole verso cui indirizzare i campionamenti e di ottimizzare le strategie di raccolta del eDNA e (Turner et al. 2014; cfr. par. 2.4 DNA disponibile al rilevamento). Diversi compartimenti cellulari hanno infatti differenti tassi di decadimento e una diversa finestra temporale nelle quali il loro DNA è rilevabile (Shogren et al. 2018; Eichmiller et al. 2016b; Bylemans et al. 2018).

Quando viene rilevato tramite l'acqua, il DNA può perdurare da pochi giorni ad alcune settimane, fino anche ad un mese. In condizioni sperimentali, l'80% del DNA viene degradato nei primi 3 giorni ed il 90% nei primi 10 giorni, ma una quantità apprezzabile di eDNA (> 5%) può rimanere rilevabile fino a 58 giorni (4% del campione analizzato; Strickler et al. 2015). Esperimenti svolti in contesti naturali confermano una finestra temporale di persistenza del eDNA di 17 giorni, oltre la quale la probabilità di rilevamento è minore del 5% (Dejean et al. 2011). In generale, il tempo medio di persistenza è quindi una-due settimane. Tuttavia, il DNA l'intervallo temporale entro il quale il eDNA può rimanere rilevabile nell'ambiente acquatico dipende dai contesti ambientali (Dejean et al. 2011; Piaggio et al. 2014; Dunker et al. 2016).

Una prima grande differenza data dai contesti ambientali è rappresentata dalla **tipologia di habitat**. In acque correnti il DNA sembra persistere meno rispetto ai sistemi lentici, probabilmente perché viene fisicamente trasportato lontano dal punto dove viene rilasciato (cfr. par. 2.3 Trasporto e diffusione). La persistenza in ambienti lotici assume dei valori particolarmente bassi nei corsi d'acqua minori, nell'ordine di 1-2 giorni (24 ore: Deiner et al. 2016; 43 ore: Seymour et al. 2018; 48 ore: Balasingham et al. 2016). Tali valori di persistenza sono molto simili per specie appartenenti a taxa diversi, suggerendo che la dinamica di degradazione del DNA è simile tra le varie specie, un fenomeno particolarmente rilevante per i risvolti applicativi che le tecniche basate su eDNA possono avere sugli studi di comunità. Tuttavia, in ambiente lotico la maggior parte del DNA (> 90%) viene persa in tempi molto più ristretti, addirittura nelle prime 3 ore (Seymour et al. 2018) o nell'ordine di pochi minuti (Jerde et al. 2016; Wilcox et al. 2016).

Tra i fattori abiotici che influenzano la persistenza del DNA nell'ambiente vi è la penetrazione della **luce solare** nella colonna d'acqua. La luce solare può causare danni al DNA, soprattutto per la luce che ricade nello spettro delle radiazioni ultraviolette (Ravanat et al. 2001; Pilliod et al. 2014). La radiazione UV-B è la componente più energetica della radiazione solare che colpisce la superficie terrestre ed è considerata dai più la più pericolosa per l'ambiente acquatico. Tuttavia, essa penetra nella colonna d'acqua solo per pochi centimetri (Hader et al. 2003; Diffey et al. 2002). Al contrario, i raggi UV-A, che hanno una minor energia ed un effetto sulla degradazione del eDNA che viene ritenuto trascurabile, hanno una lunghezza d'onda tale che permette loro di penetrare in acqua a profondità maggiori. In dipendenza del particolato sospeso che assorbe tale lunghezza d'onda, essi possono penetrare da pochi centimetri nei laghi eutrofici fino a 10-20 metri in quelli oligotrofici (Kirk 1994). L'effetto della radiazione è ritenuto così significativo che la copertura algale, la cui presenza può concorrere a ridurre la penetrazione della luce solare, è un parametro che viene spesso valutato dagli esperti di eDNA negli studi sull'ecologia del DNA ambientale (Lance et al. 2017). In realtà, molti di questi studi hanno dimostrato che l'esposizione solare non ha alcun effetto diretto sulla *detectability* del eDNA, né in termini di UV-A né di UV-B, ma più in termini di aumento indiretto della temperatura dell'acqua sottoposta a radiazione solare (Andruszkiewicz et al. 2017; Machler et al. 2018). In questa maniera la radiazione solare acquisisce un'influenza particolarmente significativa sulla persistenza del eDNA solo in quegli ecosistemi acquatici sottoposti ad una radiazione consistente, come nel caso di ambienti ad elevate altitudini o più vicini all'equatore (Godar 2005).

La **temperatura dell'acqua**, infatti, sembra essere il fattore ambientale di maggiore importanza nel determinare i tempi di decadenza del eDNA. A maggiore temperatura, il DNA si degrada più velocemente (He et al. 2015; Strickler et al. 2015). Numerosi studi confermano questa ipotesi, e hanno dimostrato che il eDNA si conserva meglio in inverno rispetto all'estate (Lacoursière-Roussel et al. 2016; Pilliod et al. 2014). La

temperatura però ha un effetto diretto di denaturazione del eDNA solo a valori molto elevati (es. > 50 °C), che raramente si presentano nei contesti naturali delle latitudini intermedie e ancor più difficilmente possono avere un'influenza sulle acque e sul potere tampone che esse hanno in risposta agli stress termici. Non è chiaro, quindi, se la temperatura sia un fattore che causa in maniera *diretta* la degradazione del DNA rilasciato in ambiente, o se sia piuttosto un fattore che ha un'influenza *indiretta* su di altri fattori ambientali che promuovono la degradazione del eDNA in maniera causale. La temperatura, ad esempio, in molti casi di studio non è risultata significativa nel regolare la persistenza del eDNA (Andruszkiewicz et al. 2017; Seymour et al. 2018). È quindi probabile che i fattori chiave nel determinare la degradazione del eDNA nel corso del tempo siano altri, come l'attività microbica o il pH (Strickler et al. 2015; Tsuji et al. 2017; Machler et al. 2018; Seymour et al. 2018).

L'**attività microbica** è direttamente influenzata dalla temperatura. Alti tassi di attività microbica possono comportare una degradazione del DNA ad alti livelli a causa della alta attività metabolica dei microorganismi e della elevata reattività cinetica degli enzimi extracellulari appartenenti alla famiglia delle esonucleasi (Tsuji et al. 2017; Saito e Doi 2021). Recentemente è stato comprovato che l'attività microbica è con molta probabilità il fattore ambientale più importante nell'influenzare la persistenza del eDNA. La prova fattuale viene da studi nei quali è risultato che il DNA di pesci diminuisce esponenzialmente nel corso del tempo in campioni ambientali sia di acqua dolce che salata, ma non in campioni di acqua sterile (Eichmiller et al. 2016a; Saito e Doi 2021). Ci sono svariati meccanismi con la quale l'attività microbica diminuisce il tempo di persistenza del eDNA in acqua. Essa contribuisce direttamente all'idrolisi enzimatica producendo enzimi di degradazione (nucleasi esogene o esonucleasi) che scompongono il DNA in componenti minori (Lindahl 1993; Torti et al. 2015). Gli enzimi extracellulari come le nucleasi si trovano allo stato libero negli ecosistemi acquatici e possono essere rilasciate anche dai macroorganismi (Bochove et al. 2020; Nukuzawa et al. 2020). Il DNA inoltre può essere anche assimilato in maniera diretta dai microbi: in condizioni di scarsità di nutrienti, come nel caso del fosforo, i microbi possono secernere enzimi DNA-degradanti per convertire le catene di DNA in fosfato e prodotti di scarto secondari (purine e desossiribosio: Salter et al. 2019). Infine, alcuni prodotti di scarto dell'attività batterica, come l'urea, possono diminuire la stabilità della molecola di DNA ambientale, indebolendone i legami covalenti e facilitandone la degradazione (Yin et al. 2019). In alcuni casi, però, in particolare nelle piante, è stata descritta una influenza positiva da parte dell'attività microbica, che aumenta il rilascio di DNA da parte della materia vegetale nel sedimento fluviale ed incrementa la *detectability* (Potè et al. 2009).

Per quanto riguarda il **pH** delle acque, la *detectability* diminuisce improvvisamente al di sotto di un valore 6 di pH (Seymour et al. 2018; Schmidt et al. 2021). La struttura del DNA è infatti molto stabile in condizioni favorevoli (anossia e bassa umidità, con emivita stimata di 500 anni) ma decade molto rapidamente, nel giro anche di pochi minuti, in ambienti che presentano bassi valori di pH e alti livelli di ossigenazione (a causa dell'ossidazione e dell'idrolisi) (Lindahl 1993; Allentoft et al. 2012; Torti et al. 2015). In altri casi, però il DNA ambientale è stato rilevato anche a valori di pH più bassi (es. pH=4). Ciò suggerirebbe che anche il pH sia una variabile che influenza la persistenza del eDNA solo in sinergia con altri fattori ambientali (Strickler et al. 2015). Un'evidenza di questo è data da uno studio in ambiente controllato secondo la quale il pH non ha nessun effetto sulla persistenza del DNA (Bochove et al. 2020). Tra le variabili che possono interagire con il pH, ad esempio, vi sono i microorganismi. L'ambiente più favorevole per l'esplosione di un'attività microbica si osserva a valori di pH neutro, che di conseguenza porta ad una diminuzione della persistenza del DNA in ambiente (Strickler et al. 2015). Esiste, infine, anche un'interazione tra pH e tipologia di sedimento, in quanto

l'adsorbimento del eDNA da parte delle cariche elettrostatiche residue delle particelle di argilla viene facilitato a bassi valori di pH (Goldberg et al. 2015).

Anche il **sedimento** in sospensione può proteggere il DNA ed aumentarne i tempi di persistenza nell'ambiente (Taberlet et al. 2018; Gutierrez-Cacciabue et al. 2016). L'adesione al particolato di argilla, ad esempio, richiede fino a dieci volte la concentrazione di enzimi extracellulari per effettuare una degradazione del eDNA, poiché previene l'apertura della doppia elica o cambia la conformazione della molecola e rende il DNA non identificabile per gli enzimi che lo degradano e lo proteggono dal danno chimico (Khanna e Stotzky 1992; Stewart and Taylor 2020; Joseph et al. 2022). Il particolato di argilla e di sabbia inoltre assorbe anche gli stessi enzimi extracellulari, inibendoli o inattivandoli, e diminuendo la concentrazione degli enzimi attivi nell'ambiente (Khanna e Stotzky 1992).

La presenza di sedimento rende quindi il DNA più persistente, e facilita il rilevamento anche fuori dal periodo di attività della specie. Ad esempio, il eDNA di pesci migratori è stato rilevato in acqua solo per pochi giorni trascorsi dalla migrazione, mentre nel sedimento si è conservato fino a oltre quattro mesi (Sakata et al. 2020). Questo costituisce, tuttavia, una serie di svantaggi che si riflettono sulla risoluzione temporale dei dati di presenza, con possibilità di occorrere in false presenze in caso di mobilitazione di DNA antico ben preservato nei sedimenti del fondale.

Le molecole di eDNA si legano anche alle molecole della famiglia degli acidi umici. In laghi con alte concentrazioni di sostanze umiche, la concentrazione di enzimi richiesti per effettuare una degradazione efficace del DNA è 100-1000 volte maggiore rispetto alle forme libere di eDNA (Lance et al. 2017).

In condizioni di alta concentrazione di **ossigeno** la molecola di DNA si degrada rapidamente. Acque ossigenate come le acque correnti particolarmente turbolente (torrenti di alta montagna) potrebbero essere quindi condizioni sfavorevoli per la persistenza del DNA. Tuttavia, la concentrazione di ossigeno disciolto è un fattore che interagisce con altre variabili ambientali. Condizioni di stress ossidativo si osservano ad esempio in presenza di alte temperature. Queste condizioni promuovono la decomposizione della materia organica e la conseguente produzione di ossigeno reattivo, diminuendo la persistenza di eDNA (Harrison et al. 2019).

Infine, la presenza di alcuni **composti chimici**, come gli insetticidi (diazinone, esaclorocicloesano), diminuiscono la persistenza del eDNA causandone una degradazione diretta, deformando la struttura della molecola, e facilitando la degradazione da parte degli enzimi extracellulari presenti nell'ambiente (Eichmiller et al. 2014; Pourmoghadam et al. 2019). Anche gli antibiotici, che spesso si diffondono in acqua con le acque di scarico, formano dei complessi metallici che aumentano l'idrolisi di 5.2×10^7 volte e degradano rapidamente il DNA (Sreedhara et al. 2000; Sreedhara et al. 2001).

2.3 Trasporto e diffusione

Il DNA rilasciato in ambiente acquatico è soggetto ai moti ed alle correnti dei corpi idrici. Lo studio dell'idrologia è quindi di primaria importanza per comprendere le dinamiche di trasporto del eDNA e per poter inferire la presenza e la distribuzione spaziale delle specie a partire dal punto nel quale il loro eDNA viene rilevato.

Nei **laghi e nei sistemi lentici** la dispersione del DNA a livello spaziale è limitata nell'ordine del centinaio di metri (Ghosal et al. 2018; Goldberg et al. 2018; Dunker et al. 2016). A livello verticale della colonna d'acqua,

il DNA invece ha una maggiore mobilità dal momento che esso tende a depositarsi con la gravità e quindi ad accumularsi in profondità (MacIntyre et al. 1995; Turner et al. 2015). In particolare, è stato suggerito che la materia fecale ed il DNA residuo contenuto al suo interno tenda ad accumularsi negli strati bassi della colonna d'acqua. Pertanto, per campionare popolazioni vitali (DNA non antico) la strategia ottimale è quella di concentrarsi sul prelievo delle acque dagli strati superficiali (Wotton e Malmqvist 2001; Kamoroff e Goldberg 2018). Occorre considerare però che spesso i sistemi lentici nelle regioni mediterranee sono prevalentemente monomittici, con una circolazione delle acque ed un rimescolamento degli strati che avviene una volta l'anno. Questo può portare ad una omogeneizzazione nella distribuzione spaziale del eDNA, che quindi è più facilmente rilevabile, ma anche ad una mobilitazione del sedimento antico dal fondale. In estate, invece, le acque si stratificano a valori di densità diversi e la degradazione del DNA negli strati superficiali dell'epilimno è molto più rapida, mentre negli strati profondi (ipolimno) è praticamente nulla (Rawlence et al. 2014).

Nei **fiumi e nei sistemi lotici**, al contrario, la distribuzione spaziale del DNA viene resa più omogenea grazie alle turbolenze presenti in acqua che mischiano continuamente le colonne d'acqua (Pont et al. 2018). Il DNA tende quindi ad essere trasportato dalla corrente solo verso valle, ma la sua dinamica non è stata ancora ricostruita in maniera fedele. Dal momento che spesso le particelle di eDNA campionate sono di un diametro compreso tra 0.2 μm e 10 μm , le molecole di DNA possono essere assimilate alla categoria della materia organica definita particolato fine (0.5 μm – 1 mm). Alcuni modelli di trasporto del eDNA in ambito fluviale, infatti, sembrano descrivere dei risultati molto simili alla dinamica di trasporto del particolato fine della materia organica (Sassoubre et al. 2013; Allan e Castillo 2007; Webster et al. 1987). Tali modelli stimano una distanza di trasporto media del eDNA tra i 100 m e i 100 km (Jane et al. 2015; Wilcox et al. 2016; Deiner et al. 2016; Song et al. 2017; Pont et al. 2018). All'interno di questi modelli sembra relativamente facile incorporare il tempo di decadimento del DNA o la velocità di corrente per stimare le distanze di trasporto del eDNA, mentre è più difficile tenere in considerazione le altre variabili che condizionano il trasporto del eDNA, come la ritenzione e la risospensione, che invece viene ritenuta più stocastica. Anche nei corpi lotici il DNA tende a depositarsi per gravità sul fondo letto fluviale e a legarsi al sedimento di fondo (Turner et al. 2015). Tali molecole possono persistere nel substrato, essere trasportate nel flusso d'acqua iporreico, infiltrarsi in falda nelle acque soggette a carsismo (uscendo dal sistema fluviale per non essere più rilevabili in quel contesto ambientale) oppure possono essere risospese nella colonna d'acqua (Schogren et al. 2017; Turner et al. 2015). Alcuni lavori suggeriscono che la ritenzione del eDNA sia un fattore che limiti la dispersione del eDNA in maniera preponderante rispetto alla degradazione (Shogren et al. 2016; Shogren et al. 2018; Shogren et al. 2019). La risospensione invece comporta la presenza di falsi positivi per quanto riguarda la risoluzione temporale, e può anche essere una possibile spiegazione dei lunghi tempi di persistenza del DNA riscontrati nei casi di studio in maniera inaspettata (Tillotson et al. 2018).

I casi di studio sembrano suggerire che la distanza alla quale si può rilevare un segnale di eDNA sia specie-specifica. Per alcuni pesci sono state riscontrate distanze massime di rilevamento di eDNA che coincidono a 250 m, mentre per bivalvi del genere *Unio* la risoluzione spaziale del rilevamento è maggiore (9 km), fino ad avere distanze più elevate per anfibi (20 km) e per pesci (100 km) (Deiner et al. 2014; Jane et al. 2015; Villacorta-Rath et al. 2021; Pont et al. 2018). Tuttavia, le informazioni estrapolabili dai casi di studio per ricercare una definizione corretta della dinamica di trasporto non sono realistiche poiché l'utilizzo di diversi approcci non rende i dati confrontabili tra di loro, come nel caso ad esempio dell'uso di tecnologie che permettono di filtrare un volume di acqua 30 volte superiore allo standard. In altri casi viene suggerito che tutta la comunità fluviale DNA-rilevata cambi più o meno ogni chilometro o poco più (2-3 km: Civade et al. 2016).

Anche la stagionalità delle acque meteoriche ha un impatto sulla distanza alla quale viene rilevato il eDNA. Essa diminuisce sia durante i periodi di secca del fiume che durante i momenti di piena, in quest'ultimo caso probabilmente a causa di una forte diluizione (Jane et al. 2015; Staley et al. 2018). Durante i momenti di pioggia che non rappresentano delle vere e proprie piene è probabile che sia il momento migliore per poter campionare all'interno delle acque correnti anche le specie terrestri (Denier et al. 2016).

2.4 DNA disponibile al rilevamento

Il DNA può essere rilevato sottoforma di cellule o di organelli subcellulari, oppure può sottostare come DNA libero o adsorbito al particolato fine. Questi diversi stati nei quali si presenta il DNA hanno una dimensione delle molecole diversa tra loro. Comprendere lo stato in cui il DNA è presente in ambiente può essere determinante nell'elaborare una strategia di campionamento del eDNA vincente (Jo 2023).

La lunghezza del eDNA determina la superficie disponibile all'attacco degli enzimi e per di più influenza la capacità di legarsi ad altre particelle presenti nell'ambiente, che condiziona a sua volta la probabilità di persistenza, sia in maniera positiva che negativa (Wei et al. 2019). I sedimenti più fini come quelli di argilla sono i più efficienti nel ritenere il eDNA a causa dell'altra conduttività tra le particelle, di una maggiore area di legame offerta dalla superficie della particella rispetto ad altre classi granulometriche (es. sabbia), e per l'arricchimento in ossidrossidi di ferro che comporta un adsorbimento massimo di 10 µg/g di eDNA (Pedersen et al. 2015; Buxton et al. 2017; Sakata et al. 2020).

Nel eDNA raccolto con i filtri dalla dimensione dei pori maggiore è stato osservato il maggior tasso di danno genetico, implicando che le membrane delle cellule non proteggono necessariamente il DNA intracellulare dalla degradazione operata attivamente dalle DNasi presenti all'interno della cellula (Jo 2023). Questo è il motivo per il quale i frammenti di eDNA più lunghi permettono di effettuare inferenze temporali più precise riguardo agli organismi osservati. Se infatti il tempo di decadimento dei frammenti lunghi di DNA è molto breve, essi rappresentano un'informazione biologica raccolta praticamente in tempo reale (Jo et al. 2017; Jo et al. 2020). Al contrario, i frammenti di eDNA più corti (125 bp) hanno tempi di decadimento molto più lento di quello dei frammenti di eDNA più lunghi (716 bp). Questi sono gli ideali per rilevare specie rare, che sono poco distribuite e quindi più difficili da intercettare a livello spaziale con un campionamento o che semplicemente rilasciano poche quantità di DNA (Bista et al. 2017; Harrison et al. 2019).

Campionare le molecole di DNA mitocondriale permette di aumentare la capacità di rilevamento delle specie di interesse. I frammenti di DNA selezionati per creare le sonde genetiche, infatti, appartengono quasi sempre al gene mitocondriale che codifica per la Citocromo Ossidasi I. Rispetto al DNA nucleare che ha 2 copie per cellula, questa tipologia di regioni genetiche presenta una maggiore densità di DNA, avendo dalle 2 alle 10 copie per cellula (Barnes e Turner 2016). Questo aumento in densità di copie di DNA influenza quindi anche la persistenza del eDNA in ambiente, dal momento che svariati studi sottolineano come il **DNA mitocondriale** abbia un tasso di decadimento significativamente minore di quello del DNA nucleare (Jo et al. 2019a, 2019b; Harrison et al. 2019). Il DNA mitocondriale inoltre sembra avere una struttura cellulare più stabile, rendendolo uno strumento più efficace per la valutazione del destino del eDNA (Moushomi et al. 2019). La *detectability* dipende quindi fortemente anche dal metodo di acquisizione del eDNA e dal protocollo di estrazione scelto (Geerts et al. 2017). Ad esempio, il DNA extracellulare può passare attraverso filtri con pori più larghi di 0.2 µm (Matsui et al. 2001; Turner et al. 2014), mentre i filtri più comuni, dai pori di 0.45 µm, probabilmente intercettano solo il DNA che persiste all'interno delle cellule o dei mitocondri (Strickler et al. 2015).

2.4.1 Inibizione

Spesso può capitare che il eDNA che è presente nel campione si renda indisponibile al rilevamento durante le fasi di laboratorio (estrazione, amplificazione, PCR: Tsai et al. 1992). Questo è dovuto agli effetti di mascheramento da parte di svariate composti a cui le molecole di eDNA si possono legare (sedimento, alghe, acidi umici, composti organici dissolti, carbonati, tannini) o alla presenza di suoli contaminati da metalli pesanti o di letame di bestiame domestico (Nguyen et al. 2007a,b; Nguyen et al. 2010; Schrader et al. 2012; Pourmoghadam et al. 2019; Bruce et al. 2021). La rimozione degli inibitori è una fase prevista all'interno dei protocolli di estrazione del DNA, ma la sua efficacia è inibitore-specifica e dipende dalla tipologia di kit d'estrazione usato. Per saggiarne l'efficacia è sempre bene preventivare un test dell'inibizione (Bruce et al. 2021). Anche in questo caso, l'interpretazione dei risultati deve essere sempre fatta con responsabilità alla luce dei potenziali effetti che l'inibizione può avere sull'occorrenza dei falsi negativi.

2.4.2 Contaminazione

Al contrario degli effetti dell'inibizione, che generano errori di falsa assenza, vi sono alcune sorgenti di errore che possono contaminare il campione ambientale con DNA alloctono, generando dati di falsa presenza. Questa contaminazione può avvenire sia a livello spaziale, nel caso di DNA mobilitato tra aree diverse, che a livello temporale, nel caso ad esempio della risospensione di DNA antico.

Tra le sorgenti di input di eDNA alloctono, vi è quella relativa alla dieta dei predatori. Se la specie target è una preda all'interno della rete alimentare, il DNA di tale specie può essere rilasciato nelle feci del predatore a grande distanza dal punto in cui la specie occorre effettivamente, soprattutto se il predatore è una specie particolarmente mobile (es. volatili, carnivori apicali).

Anche la presenza di insediamenti umani porta ad avere false occorrenze, date per lo più da allevamenti, dagli animali domestici e dalle specie di compagnia di origine alloctona (se con DNA simile alla specie target) e dalle specie soggette a commercio per fini di consumo umano nei prodotti di supermercato e nella filiera alimentare il cui DNA viene rilasciato nelle acque domestiche ed industriali (durante la lavorazione e la pulitura), nonché negli scarichi fognari (dopo il consumo) (TES, 2019).

Considerare la specificità delle sonde usate è uno dei punti critici che si possono esaminare nell'effettuare un'interpretazione dei risultati consapevole. Il fenomeno della risospensione del eDNA, invece, è legato a fattori stocastici che però può in qualche maniera essere prevista tenendo sotto controllo variabili ambientali come quelle relative all'idrologia, alle caratteristiche dell'alveo, alla tipologia di sedimento e alla presenza di biofilm che possono ritenere o degradare l'eDNA (Wilcox et al. 2016; Shogren et al. 2017). Per ovviare alla contaminazione di origine antropica tra campioni diversi durante lo studio è consigliabile l'uso di materiale sterile e si può prevedere l'utilizzo di campioni di controllo intermedi tra un campione e l'altro per mezzo della filtrazione di acqua sterile (*blank samples* o *blind samples*).

Riassumendo, una campagna di rilevamento delle specie tramite il campionamento del loro eDNA pone diverse sfide tecniche legate alla bassa quantità di sequenze nucleotidiche presenti in ambiente, alla loro

distribuzione eterogenea nello spazio, al rischio di contaminazione, alla coamplificazione di inibitori della PCR che si riflettono nel disegno campionario e nelle metodologie selezionate.

È importante sottolineare come la *detectability* del DNA ambientale sia specie-specifica e stato-specifico e che le variabili ambientali agiscono diversamente sulle diverse molecole di DNA presenti nella matrice ambientale. Le componenti biotiche e abiotiche di un ecosistema interagiscono tra loro praticamente ad ogni stadio del processo che l'eDNA può affrontare in ambiente. Questa interconnessione tra *driving forces* genera un'influenza pressoché continua nella produzione di DNA, nella sua mobilitazione fino a determinarne i tempi di persistenza (Fig. 3). Questo non permette di predire facilmente il destino del eDNA nei vari contesti di studio, e comporta alcune difficoltà interpretative sull'origine del DNA stesso.

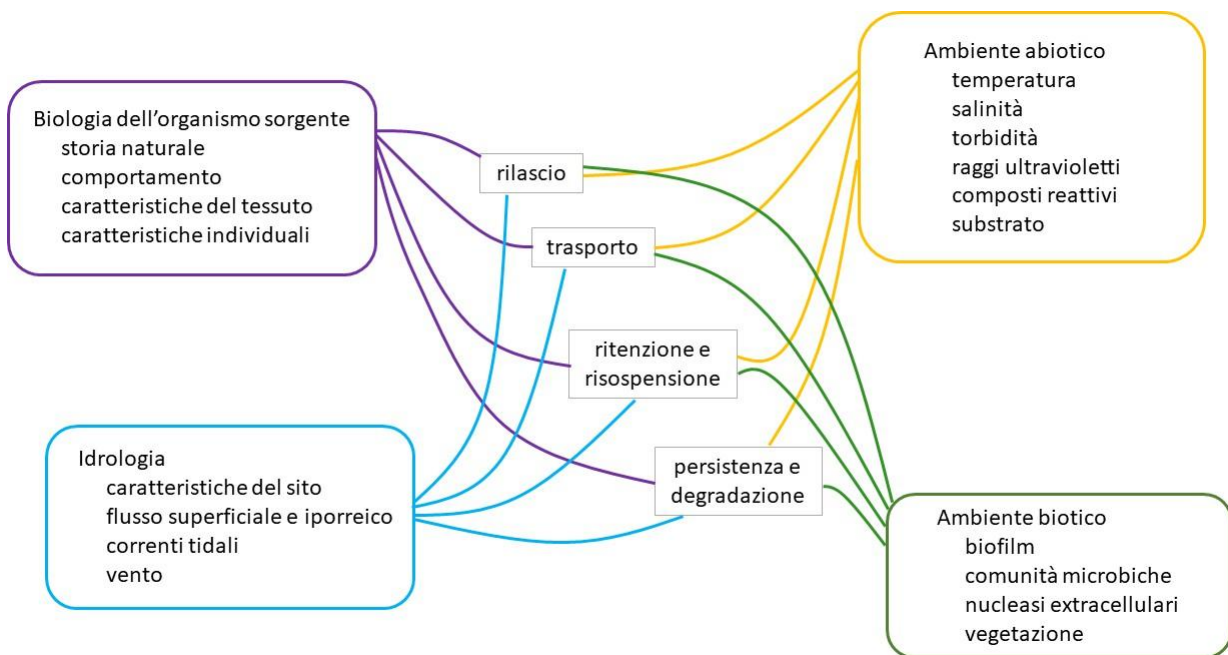


Figura 3. Meccanismi che influenzano la concentrazione ed il destino del eDNA nei sistemi acquatici (adattato da Harrison et al. 2019).

In Tab. 1 è riportata una sintesi delle variabili ambientali che influenzano la capacità di rilevare il eDNA. Il fattore più importante nel regolare la persistenza del eDNA in ambiente sembra essere l'attività microbica, mentre i fattori più importanti da tenere sotto controllo per aumentare le probabilità di rilevamento del eDNA sono la temperatura ed il pH, ed in maniera secondaria la presenza di inibitori.

L'attività microbica aumenta con la temperatura ed è massima a temperature elevate. Allo stesso tempo, le comunità microbiche proliferano in maniera esponenziale a livelli di pH neutri, mentre in ambienti acidi sono meno frequenti così come in quelli alcalini. Le soluzioni di preservazione del DNA in laboratorio di fatti sono tutte a pH basico (es Longmire buffer). Allo stesso tempo, però a pH bassi il eDNA è difficilmente rilevabile.

Appare evidente quindi che per massimizzare la *detectability* occorre campionare in condizioni di scarsa idoneità per la proliferazione di microbi, ossia a temperature basse o medie ed in condizioni di pH alcalino. Tuttavia, queste condizioni sono molto rare per i corsi d'acqua dolce, che hanno genericamente un pH neutro.

Per quanto riguarda la temperatura, invece, il DNA si conserva meglio alle basse temperature invernali, quando però la maggior parte delle specie riduce la loro attività. Il momento migliore dell'anno per campionare sembra invece essere l'estate, o la primavera, quando la produzione del DNA da parte delle specie è talmente elevata da contrastare gli effetti di degradazione microbica.

Tabella 1. Riassunto dei parametri ambientali e della loro influenza sulla probabilità di rilevamento di eDNA (detectability).

Parametro		aumento della detectability	diminuzione detectability	Effetto	note
temperatura	bassa	si	no	degradazione	interagisce con la comunità microbica e con l'attività metabolica delle specie target
	alta	no	si		
comunità microbica		no	si	degradazione	interagisce con la temperatura ed il pH
pH	acido	no	si	degradazione	interagisce con la comunità microbica
	neutro	si	no		
	alcalino	si	no		
substrato	argilla	si	si	degradazione inibizione	aumenta la persistenza ma inibisce la PCR CaCO ₃ inibisce solo se in grandi quantità
	CaCO ₃	no	si		
dimensione di popolazione		si	no	produzione	correlata positivamente con la detectability
metabolismo		si	no	produzione	correlata positivamente con la detectability
ultravioletti		no	forse	degradazione	interazione con altre variabili
ossigeno disciolto		no	si	degradazione	correlato alla presenza di lettiera
copertura algale		si	si	inibizione	diminuisce la temperatura ma inibisce la PCR
acidi umici		si	si	degradazione inibizione	aumenta la persistenza ma inibisce la PCR

3. Selezione delle specie

La selezione delle specie (*specie target*) oggetto dei rilevamenti tramite un approccio specie-specifico di DNA ambientale è un processo che si basa sulle finalità e sugli obiettivi di chi intende intraprendere uno studio eDNA (es. obiettivi gestionali di aree protette), su valutazioni di carattere tecnico-scientifico, ed infine su aspetti pratici di tipo logistico e finanziario. Illustriamo di seguito alcune caratteristiche che possono influenzare questi criteri di selezione.

Finalità di gestione

- Obblighi di monitoraggio derivanti da normative comunitarie o nazionali. Alcune normative europee obbligano a rendicontare sulla presenza, diffusione e stato di conservazione di specie a rischio di estinzione (Direttiva Habitat 92/43/EEC) o di specie aliene invasive (regolamento 1143/2014/EEC). In relazione a tali obblighi di rendicontazione periodica le indagini di eDNA possono essere molto utili per avere un quadro indicativo a scala ampia su molte specie contemporaneamente, limitando i costi e i tempi di rilevamenti specie specifici ad opera di gruppi di esperti.
- Monitoraggio di specie minacciate. Il DNA ambientale offre un metodo veloce per monitorare specie a rischio di estinzione, soprattutto nel caso di specie rare, elusive o di difficile contattabilità (Thomsen et al. 2012). Progetti a scala locale possono essere indirizzati nel rilevare lo stato di conservazione delle specie più minacciate a scala locale, nazionale o globale (Rondinini et al. 2022).
- Rilevamento precoce di specie aliene o problematiche. Le specie invasive e le specie aliene sono spesso specie in competizione per le risorse con le specie native, tali da costituire una delle minacce primarie alla conservazione di molte delle specie in pericolo. La lista delle 100 Peggiori Specie Aliene Invasive del Mondo redatta dall'IUCN Invasive Species Specialist Group può essere utilizzata per capire quali specie poter indagare tramite DNA ambientale. In questa maniera è possibile inquadrare meglio lo stato di diffusione di una specie alloctona già segnalata oppure comprendere se una specie è presente o meno sul territorio effettuando una prima campagna di rilevamento (es. nel caso di segnalazioni prossime ai confini della propria area di studio). Oltre alle specie invasive si possono tenere in considerazione anche le specie transfaunate, ossia specie che per intervento antropico vengono introdotte fuori dal loro areale nativo in aree geograficamente contigue (*specie vicarianti*), spesso appartenenti politicamente allo stesso Paese e quindi non soggette a leggi di controllo ed eradicazione ma che funzionalmente si comportano come specie alloctone a tutti gli effetti per il contesto biogeografico in cui operano.
- Stime di densità di popolazione. La dimensione di una popolazione è un parametro la cui conoscenza è di rilevante importanza per comprendere il raggiungimento di obiettivi di conservazione o se è necessario l'adozione di ulteriori misure di gestione. Il DNA ambientale offre la possibilità di inferire sulla dimensione di una popolazione in base alla quantità di copie di DNA rilevate nel campione, anche se tali stime devono essere precedute da un rigoroso processo di calibrazione del metodo che tenga in conto l'ecologia del DNA ambientale specie-specifico (si veda ad esempio Uthicke et al. 2022)

Aspetti pratici

Talvolta il DNA ambientale sottostima la presenza di alcune specie, in quanto la presenza di rivestimenti duri cuticolari o cheratinici come l'esoscheletro degli Artropodi o lo strato corneo pluristratificato dei Rettili, che impediscono il rilascio di sufficienti concentrazioni di DNA nell'ambiente (Gleason et al., 2020; Ficetola et al., 2021). Anche gli animali ectotermi possono avere una *detectability* minore dal momento che hanno un metabolismo più lento che porta ad una produzione di eDNA in quantità minori (Ficetola et al., 2021). Nonostante a questi problemi di *detectability* si possa ovviare con alcuni accorgimenti tecnici, come il campionamento della corretta

- fenologia, le o le repliche spaziali e temporali, l'inclusione di questi taxa deve essere valutata attentamente ed eventualmente accompagnata da verifiche in campo a campione.
- Contaminazione. In generale è sconsigliabile rilevare specie che sono utilizzate commercialmente o adoperare sonde generiche per il rilevamento che sono comuni a specie adibite al consumo alimentare, il cui DNA può essere rilasciato a valle di qualsiasi insediamento umano.
 - Costi. Come già anticipato, alcune sonde genetiche presentano dei costi di sviluppo particolarmente alti. Ciò vale in particolare per le sonde per le specie che possono andare incontro a fenomeni di ibridazione con specie non target. In questi casi lo sviluppo di una sonda specie specifica richiede diversi passaggi che consentano di identificare e validare le sequenze uniche che consentano di distinguere gli individui puri dagli ibridi (vedi sotto).
 - Un altro fattore da tenere in considerazione è legato al numero limitato di specie che si possono analizzare con un campione ambientale, che in genere si attesta intorno a 12 (A. Bruno, com. pers.). Per poter aumentare il numero di specie da analizzare per campione occorre raccogliere un campione aggiuntivo di acqua ambientale. Questo si riflette nei tempi di lavoro (filtrazione, estrazione, analisi) e costi di laboratorio.

Valutazioni di carattere scientifico

- Disponibilità delle sonde genetiche. Usare sonde genetiche già pubblicate su articoli scientifici e testate in campo può essere una soluzione facile per capire quali specie considerare per il proprio progetto multispecifico. La disponibilità di sonde già messe a punto e pubblicate in letteratura permette di diminuire i tempi e i costi del progetto e può rappresentare un criterio di selezione delle specie.
- Fattibilità di realizzazione delle sonde genetiche (problemi di tassonomia: specie, sottospecie, specie criptiche, complessi di specie). Qualora si voglia procedere al rilevamento di specie per quali non siano disponibili sonde genetiche pubblicate, le sonde devono essere sviluppate ex novo. È il caso, ad esempio, di molte specie endemiche o di specie distribuite in areali molto ristretti. Questo processo necessita di diversi passaggi di validazione per sviluppare sonde accurate che consentano di identificare con precisione la specie target, anche tenendo conto dell'eventuale variabilità geografica delle popolazioni (cfr. par. Appendice I Come creare una sonda genetica). Inoltre, alcune specie non hanno ancora una collocazione tassonomica ben precisa, e pertanto l'utilizzo di piccole sequenze di DNA non permette di discriminare le specie in maniera accurata, ma spesso consentono solo di identificare il genere. È il caso, ad esempio, dei gamberi di fiume del genere *Austropotamobius* (Manfrin et al. 2022).
- Ibridazioni interspecifiche. In maniera simile a quanto esposto qui sopra, la presenza simultanea in un biotopo di specie che si ibridano tra di loro si traduce in una consistente difficoltà nel rilevare i genotipi parentali. Ad esempio, in un'area che rappresenta la cosiddetta *zona di contatto* tra gli areali di due specie diverse che possono ibridarsi tra loro (es. *Cordulogaster trinacriae* e *C. boltoni* nel Lazio) rilevare l'una o l'altra specie per mezzo delle tecniche eDNA risulta molto difficile, a meno che non si disponga di una risorsa economica venti volte maggiore quella necessaria per lo sviluppo di sonde standard. Questa problematica risulta essere particolarmente critica per i taxa oggetto di introduzioni illegali, come nel caso delle specie ittiche rilasciate a fini alieutici, che favoriscono l'ibridazione tra specie native e transfaunate appartenenti allo stesso genere, come nel caso di *Barbus tiberinus*, che nel Lazio si ibrida con le specie transfaunate *B. barbus* e *B. plebejus*. Simpatria. Anche la simpatria con specie congeneriche può limitare lo sviluppo di sonde specifiche per una determinata specie target, soprattutto nel caso di incertezze di collocazione tassonomiche. Se

nell'area di studio non vi sono specie congeneriche, attestato da studi pregressi, allora è possibile utilizzare sonde genetiche che permettono una determinazione a livello di genere.

3.1 Rilevamento mono- o multispecifico

L'approccio DNA ambientale specie-specifico permette di effettuare studi mirati sia al rilevamento di una singola specie sia di più specie in contemporanea. Di seguito vengono discussi i vantaggi e gli svantaggi della scelta.

Rilevamento di singole specie

Vantaggi:

- Possibilità di campionare negli habitat preferenziali della specie e nelle stagioni/tempi adeguati alla sua fenologia, avendo così una omogeneità delle tipologie di ambienti rappresentate nel campione e una massimizzazione della probabilità di rilevamento (*detectability*)
- costi ridotti per l'acquisto delle sonde genetiche
- standardizzazione del volume d'acqua campionata e dei metodi di filtrazione

Svantaggi:

- Assenza di informazioni sulla composizione della comunità in cui la specie è inserita, inclusa la presenza di specie direttamente collegate ad essa all'interno della rete trofica (prede, competitori, predatori)
- Assenza di dati di presenza di possibili specie che possono interferire in termini di competizione in maniera estremamente negativa e tali da essere considerate una minaccia diretta alla conservazione, come nel caso delle specie aliene invasive.

Rilevamenti multispecifici

Vantaggi:

- Possibilità di sfruttare il campionamento per monitorare le comunità biotiche di un determinato biotopo
- Raccogliere informazioni su specie che sono in relazione tra di loro all'interno della rete trofica (interazioni di predazione o competizione), come nel caso delle specie aliene e le specie native (Wilcox et al. 2018)
- Ottemperare agli obblighi di monitoraggio e rendicontazione europei per molte specie contemporaneamente senza il coinvolgimento di un numero elevato di esperti dei diversi taxa
- Rilevamento precoce di specie problematiche o aliene invasive su vasta scala

Svantaggi:

- Necessità di un compromesso sulle strategie di campionamento (tipologia di habitat e stagione) e sulle tecniche di filtrazione che massimizzino la probabilità di rilevamento contemporaneo di molte specie
- Disomogeneità nella probabilità di rilevamento (*detectability*) delle specie
- Necessità di repliche temporali per ovviare a problematiche di *detectability* legate alla stagionalità del eDNA specie-specifico delle singole specie

- Aumenti dei costi per l'acquisto o la produzione delle sonde genetiche e per le necessarie repliche temporali.

Le considerazioni sopra elencate sono state oggetto di valutazione anche nel corso del primo studio sperimentale multispecifico svolto in Italia per il rilevamento di 22 specie delle acque dolci di interesse comunitario o unionale sviluppato dall'Università del Molise e finanziato dalla Regione Lazio (Loy, Giovacchini et al. 2023). In particolare, durante il processo di selezione delle specie sono emerse alcune problematiche che hanno portato a escludere alcune specie inizialmente inserite nella lista delle specie target. In particolare, a causa dei rischi di ibridazione sono state escluse dai rilevamenti *Hirudo verbana*, *Cordulogaster trinacriae* (ibridazione con *C. boltonii*), *Lampetra fluviatilis* (difficile discriminare da *L. planeri* se non con approcci genomici più avanzati d); *Barbus plebejus* e *Barbus barbus* (ibridazioni con *B. tiberinus*) e *Petromyzon marinus* (non più rilevata da molti anni). Nel caso della cheppia (*Alosa fallax*) abbiamo potuto eludere il problema della presenza di specie congeneriche grazie alla loro distribuzione allopatrica, rendendo possibile l'identificazione al livello generico (*Alosa sp.*). Per i Molluschi Gasteropodi del genere *Vertigo* la scelta di identificazione al livello del genere è stata giustificata dal fatto che tutte le specie del genere potenzialmente presenti nell'area di studio (Regione Lazio) sono oggetto di rendicontazione periodica ai sensi della Direttiva Habitat. In Tab. 2 è riportato il risultato finale della selezione delle specie target del progetto

Tabella 2. Lista delle specie selezionate per un rilevamento multispecifico in 52 corpi d'acqua dolce della regione Lazio nell'ambito del progetto 'Implementazione di un protocollo di rilevamento multispecifico e sorveglianza di specie di interesse unionale nelle acque dolci del Lazio attraverso DNA ambientale e modelli di connettività' dal e finanziato dalla Regione Lazio (Loy, Giovacchini et al 2023).

Taxon	Specie	Normativa	Periodo ottimale di campionamento
Bivalvi	<i>Unio elongatulus</i>	Direttiva Habitat Annex V	-
Gasteropodi	<i>Vertigo spp</i>	Direttiva Habitat Annex II	-
Insetti	<i>Coenagrion mercuriale</i>	Direttiva Habitat Annex II	primavera
Insetti	<i>Oxygastra curtisii</i>	Direttiva Habitat Annex II, IV	primavera
Insetti	<i>Lindenia tetraphylla</i>	Direttiva Habitat Annex II, IV	primavera
Crostacei	<i>Austropotamobius pallipes</i>	Direttiva Habitat Annex II, IV	autunno
Osteitti	<i>Alosa fallax</i>	Direttiva Habitat Annex II, IV	-
Osteitti	<i>Squalius lucumonis</i>	Direttiva Habitat Annex II	-
Anfibi	<i>Bombina pachypus</i>	Direttiva Habitat Annex II, IV	primavera
Anfibi	<i>Triturus carnifex</i>	Direttiva Habitat Annex II, IV	primavera
Anfibi	<i>Lissotriton italicus</i>	Direttiva Habitat Annex IV	primavera
Rettili	<i>Emys orbicularis</i>	Direttiva Habitat Annex II	-
Mammiferi	<i>Mustela putorius</i>	Direttiva Habitat Annex V	-
Mammiferi	<i>Lutra lutra</i>	Direttiva Habitat Annex II, IV	-
Bivalvi	<i>Dreissena polymorpha</i>	Lista IUCN 100 delle Peggiori Specie Aliene Invasive del Mondo	-
Crostacei	<i>Faxonius limosus</i>	Specie Aliena Invasiva di rilevanza Unionale	autunno
Crostacei	<i>Procambarus clarkii</i>	Specie Aliena Invasiva di rilevanza Unionale	autunno
Osteitti	<i>Pseudorasbora parva</i>	Specie Aliena Invasiva di rilevanza Unionale	-
Osteitti	<i>Padogobius martensi</i>	Introdotta fuori dal suo areale nativo	-
Anfibi	<i>Lithobates catesbeianus</i>	Specie Aliena Invasiva di rilevanza Unionale	primavera
Rettili	<i>Trachemys scripta</i>	Specie Aliena Invasiva di rilevanza Unionale	-

Funghi	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Lista IUCN 100 delle Peggiori Specie Aliene Invasive del Mondo	primavera
--------	---------------------------------------	--	-----------

4. Selezione dei siti di campionamento

La selezione dei siti di campionamento per intraprendere un progetto di DNA ambientale è subordinata alle finalità di progetto. In questa sezione vengono presi in considerazione quali possono essere i fattori che influenzano i criteri di selezione dei siti per un monitoraggio condotto ad ampia scala, ovvero per un intero territorio regionale > 10.000 kmq).

In generale, una strategia di campionamento basata sul DNA ambientale deve tenere in conto di aspetti chiave: dell'ecologia delle specie target e le proprietà chimico-fisiche dell'acqua

Ecologia delle specie

La conoscenza dell'ecologia della specie è un elemento imprescindibile per selezionare le tipologie di habitat preferenziale e i siti di campionamento. Questo però è subordinato agli obiettivi di studio (es. campionamento di una specie all'interno del suo areale o fuori da esso), come già specificato in precedenza (cfr. par. 1 Introduzione). Un primo criterio di selezione contempla la selezione di biotopi che presentano habitat tipici della specie target.

Un secondo modo alternativo è quello di effettuare uno studio preliminare e di elaborare dei modelli predittivi o expert-based di idoneità della specie, in modo da comprendere quali sono le aree che possono costituire i potenziali habitat idonei nell'area di studio. Ciò consente di identificare le aree in cui concentrare lo sforzo campionario (e.g. Erickson et al. 2019). Se i modelli sono elaborati ad una scala spaziale molto dettagliata, è possibile selezionare i siti di campionamento nelle aree a massima probabilità di presenza delle specie.

Occorre rimarcare, tuttavia, come sia comunque importante effettuare un controllo preliminare in situ delle condizioni dei corpi idrici e degli habitat acquatici che si intende campionare. Corsi d'acqua di carattere torrentizio o stagni effimeri caratterizzati da una marcata stagionalità devono essere sottoposti ad un'attenta selezione per comprendere se il loro campionamento è funzionale agli obiettivi di studio. Anche l'ubicazione dei siti di campionamento necessita di sopralluoghi preliminari o di un controllo durante il primo campionamento per assicurarsi che siano effettivamente accessibili e idonei ai fini del prelievo di eDNA (es. assenza di scarichi fognari).

I risultati di alcuni lavori scientifici possono guidare le strategie di campionamento di eDNA in maniera *evidence-based*. Per le finalità di rilevamento di specie comuni viene suggerito il campionamento di tributari d'alto corso, nella parte più a monte del bacino idrografico, mentre nel caso di specie rare o distribuite a macchia di leopardo (*hotspot*) è stato dimostrato che conviene effettuare un campionamento sul fiume principale, nella parte del bacino idrografico più a valle (fondovalle) o nei pressi delle confluenze con i tributari (Carraro et al. 2020).

Parametri chimici e fisici delle acque

I parametri fisico-chimici delle acque possono influenzare la probabilità di persistenza e rilevamento del DNA, ed essere responsabili di false assenze o false presenze. Per evitare il rischio di false presenze, è necessario evitare il campionamento di acque con pH molto basso o che siano ricche in acidi umici o alghe che limitano la persistenza del eDNA in ambiente o ne inibiscono l'estrazione (a meno di non prevedere specifici protocolli

di estrazione, cfr. par. 7 Estrazione di eDNA). Per non incorrere nel rischio di false presenze invece occorre assicurarsi di non campionare nei pressi di collettori fognari, impianti di trattamento delle acque, scarichi agricoli o nei pressi delle città. Questi punti di sversamento, infatti, sono una sorgente di DNA alloctono nonché fonte di composti chimici in grado di inibire il eDNA o di degradarlo anzitempo.

Si possono quindi adottare due modalità per pianificare una strategia di campionamento. Un primo modo è quello di selezionare dei siti che siano idonei al prelievo di eDNA prima dell'avviamento del campionamento. Tale conoscenza si può acquisire consultando le banche dati sulla qualità delle acque che sono tipicamente costituite dagli Enti addetti al monitoraggio del territorio e delle possibili sorgenti di inquinamento.

Un secondo modo è quello di selezionare dei siti senza avere una conoscenza pregressa della qualità delle acque, prevedendo la raccolta dati durante il campionamento (cfr. par. 6.2 Campionamento delle variabili ambientali). In questa maniera sarà possibile fare una serie di valutazioni a posteriori sui risultati raggiunti e tenere sotto controllo il rischio di falsa occorrenza in fase di analisi e di interpretazione dei dati.

Nel corso dello studio sperimentale multispecifico per il rilevamento di 22 specie delle acque dolci di interesse comunitario o unionale della Regione Lazio, sono stati selezionati 52 siti ricadenti in diverse tipologie di acque dolci naturali o artificiali. I siti sono stati selezionati in base ai seguenti criteri

- presenza di habitat idonei delle specie target,
- siti di monitoraggio della qualità dell'acque, in particolare della rete di monitoraggio ex Direttiva Acque (60/2000/EEC)
- siti ricadenti all'interno di aree protette (parchi nazionali, parchi regionali e rete Natura 2000).

Oltre i criteri summenzionati, dove siano disponibili dati di presenza georeferenziati delle specie, la selezione dei siti ottimali di campionamento multispecifico può avvalersi della realizzazione e sovrapposizione di modelli di distribuzione potenziale delle singole specie. Tali mappe sono anche utili per individuare il numero di sonde da testare in ciascun sito.

5. Quando campionare: stagionalità e fenologie

All'interno della strategia di campionamento occorre tenere conto sia del chimismo delle acque che della biologia delle specie e della loro possibile variabilità stagionale. Tra i requisiti di un buon disegno di studio vi è quello di effettuare repliche di campionamento. Implementare almeno una replica temporale è sempre consigliato per ovviare ad eventuali problemi dati dall'incorrere in una falsa presenza per motivi stocastici ed aumentare così i livelli di confidenza.

Fenologia delle specie

La fenologia delle specie target è un aspetto di fondamentale importanza nell'impostazione di una corretta pianificazione dei campionamenti. Specie che utilizzano gli ambienti umidi solo per la riproduzione o che sono soggette a migrazioni (specie diadrome) esibiscono diverse fasi vitali la cui stagionalità deve essere tenuta in considerazione. Questo è particolarmente importante se le specie da rilevare hanno dei tassi di produzione del DNA particolarmente bassi, come nel caso degli Artropodi e dei rettili (Rush et al. 2020). Per queste specie, la cosa migliore è effettuare il campionamento durante la stagione di muta o di accoppiamento, quando è più probabile che le molecole di DNA vengano rilasciate da tessuti molli, gameti, larve o dalla maggiore attività metabolica di costruzione dei tessuti. Periodi di diapausa o di ibernazione vanno ovviamente evitati per qualsiasi specie che esibisca una stagionalità nel ritmo di attività. Pertanto, quando si campionano specie con diverse fenologie potrebbe essere necessario effettuare repliche in più stagioni. Questo differenzia essenzialmente un approccio multispecifico da un campionamento indirizzato a singole specie, in cui il campionamento viene effettuato nella stagione ottimale per la specie, ed è più facile tenere sotto controllo eventuali fonti esterne di variabilità stagionale. Nel caso di rilevamento multispecifico i risultati non possono fare altro che far emergere la comunità animale che è possibile campionare in una specifica stagione. In altre parole, con questo approccio vengono rilevate solo quelle specie che esibiscono la medesima fenologia. In questo caso è possibile avvalersi di differenti protocolli specie-specifici per il rilevamento ottimale di diversi gruppi tassonomici target (Geerts et al. 2017).

Se la campagna di rilevamento è mirata ad una singola specie è necessario tenere in considerazione la variabilità con la quale la fenologia si manifesta nei diversi contesti ambientali. Ad esempio, è probabile che specie la cui fenologia è legata ad una specifica temperatura soglia sia rilevabile nel corso dell'anno più precocemente negli ambienti posti alle basse altitudini (es. di pianura). Un campionamento effettuato in contemporanea su una vasta area di studio porterebbe così a rilevare la non presenza nelle aree montane poste ad altitudini maggiori, dove la temperatura soglia non è ancora stata raggiunta. L'utilizzo di repliche temporali è quindi fondamentale. In assenza di queste, il monitoraggio di parametri specifici (es. temperatura dell'aria) può guidare come differenziare a livello temporale il campionamento nei vari l'avanzare della stagione.

Caratteristiche chimico-fisiche delle acque

Il momento migliore per campionare le acque interne sembrerebbe essere rappresentato dalle stagioni intermedie della primavera e dell'autunno. Il DNA ambientale, infatti, si conserva meglio a basse temperature, ovvero in inverno. In inverno, tuttavia, molte specie non sono attive e le acque sono spesso soggette a piene o a periodi di pioggia intensi che aumentano il carico di sedimenti. L'aumento di volume di acqua nella sezione fluviale causa una diluizione del eDNA che è più difficile da rilevare. L'aumento di apporto sedimentario rende l'acqua più torbida, rende la filtrazione dell'acqua più difficoltosa e può portare ad un aumento della

concentrazione di inibitori del DNA all'interno del campione (Randall et al., 2023). In primavera ed estate, invece, con l'aumento della temperatura aumenta anche il carico di microrganismi ed iniziano le esplosioni algali. Il primo degrada il eDNA, le seconde lo inibiscono. Tuttavia, in queste stagioni, l'aumento della produzione di DNA da parte delle specie target, dovuto principalmente ad aumento dei loro ritmi di attività e quindi dei loro tassi metabolici, è talmente alto da compensare tutti gli effetti deleteri legati alla degradazione del DNA che dovrebbero inficiare la probabilità di rilevare le specie.

Autunno e primavera sono le stagioni ideali anche per effettuare campionamenti di eDNA nei sistemi lentici (laghi e stagni) situati a latitudini intermedie. In questi momenti dell'anno, le modalità di circolazione delle acque favoriscono il rimescolamento del eDNA sia in verticale che in orizzontale. Questo però dipende dalla finalità dello studio e, ad esempio, dal fatto che questa stagione di campionamento si adatti o meno a tutte le specie target (vedi oltre). Un campionamento effettuato in una stagione in cui non si osserva una stratificazione termica delle acque a diverse profondità permette di evitare il prelievo di acqua a diverse profondità e minimizza la logistica ed i materiali necessari. In caso contrario, per specie la cui stagione idonea al campionamento corrisponde anche ad una stratificazione termica delle acque occorre effettuare un campionamento anche a diverse profondità. Ciò è valido soprattutto per le specie soggette a migrazioni verticali, legate principalmente ad acque a temperature più fredde e che tendono a localizzarsi sul fondo dei laghi durante l'estate (Lawson Handley et al. 2019, Littlefair et al. 2020). Infine, occorre tenere in considerazione che altri fattori di inibizione o contaminazione del eDNA (es. scarichi fognari) possono essere soggetti a fattori stagionali, come nel caso dei trattamenti fitosanitari nelle aree a forte vocazione agricola o di tipologie similari di inquinamento diffuso. È consigliabile evitare i periodi in cui questi fenomeni sono in atto nella propria area di studio, nonché i periodi susseguenti, dal momento che la maggior parte degli inquinanti viene mobilitata dal terreno ai corpi idrici con le piogge ed in maniera massimale nei periodi di piena (Anderson et al. 2018). Il controllo in situ delle condizioni dei corpi idrici durante il momento del campionamento in campo è quindi essenziale. Anche una lista degli elementi chimici presenti nella propria area può essere utile. In tale maniera è possibile comprendere quali siano gli inquinanti da sottoporre ad attenzione, inferire quali siano le sorgenti di inquinamento e ricostruire la stagione plausibile in cui avviene la diffusione di tali elementi. A questo fine, consultare i rapporti sul monitoraggio chimico delle acque (es. Direttiva Acque) può essere di incredibile aiuto per avere una panoramica preliminare di quali siano gli elementi inquinanti sul proprio territorio che possono interferire con una campagna di raccolta di eDNA.

Nel corso dello studio sperimentale multispecifico per il rilevamento di 22 specie delle acque dolci di interesse comunitario o unionale della Regione Lazio, nel corso dei campionamenti estivi la frequenza media di siti positivi rispetto al numero di siti testati è risultata inferiore (16,5%) rispetto ai campionamenti effettuati in primavera e autunno tenendo conto della fenologia delle specie (20,7 %) (Loy, Giovacchini et al 2023). È interessante però anche rilevare come per alcune **specie** come *Unio elongatulus*, *Austropotamobius sp* e *Alosa fallax* la frequenza dei siti positivi sia risultata maggiore durante i campionamenti effettuati in estate. I risultati hanno anche evidenziato come le repliche temporali favoriscano i livelli di rilevamento delle specie, correggendo dati di assenza eventualmente legati a variazioni dei parametri fisico-chimici delle acque.

6. Campionamento e di filtrazione

6.1 Campionamento dell'acqua ambientale

L'implementazione di una strategia di campionamento si realizza attraverso una opportuna gestione delle operazioni di campo. Alcuni accorgimenti tecnici e pratici devono pertanto essere presi in considerazione per poter intraprendere nella maniera più appropriata le fasi di prelievo e di filtrazione dell'acqua dai corpi idrici e per evitare il rischio di contaminazione tra campioni ambientali.

Se gli obiettivi di progetto sono finalizzati al rilevamento delle specie a scala di corpo idrico (es. uno specifico lago), il numero di campioni ambientali dovrebbe riflettere la complessità spaziale del biotopo campionato. Ulteriori fattori che influenzano il numero di campioni ambientali necessari da raccogliere riguardano l'estensione del biotopo e l'accessibilità al corpo idrico. Un numero maggiore di campioni è consigliabile nel caso di corpi idrici particolarmente estesi dal momento che il eDNA risulta meno concentrato ed influenza la probabilità di rilevamento (McClenaghan et al. 2020). Inoltre, più campioni sono necessari per coprire l'intera area di studio. Il sotto-campionamento di diversi tipi di habitat presenti in un biotopo deve riflettere la distribuzione degli habitat idonei alle specie target del progetto.

Per evitare che attrezzature da campo, in particolare stivali, entrino in contatto con i campioni di acqua e apportino una potenziale contaminazione di eDNA alloctono, prima di effettuare il prelievo dell'acqua è consigliabile valutare la direzione del flusso dell'acqua.

L'operatore infatti deve sempre collocarsi a valle del punto di campionamento, garantendo che il campione d'acqua non sia contaminato dalla presenza dell'operatore. Nel caso di siti posti in acque lentiche, pozze o stagni, l'operatore non deve mai immergere nel punto di campionamento stivali o altre attrezzature utilizzate in altri siti e non opportunamente sterilizzate. Nel caso in cui la topografia della sponda sia particolarmente complessa è preferibile adottare dei sotto-campionamenti in modo da garantire una maggiore rappresentatività del campione. Sarà compito dell'operatore valutare, in base alla distanza e/o differenze di microhabitat tra i sottocampioni, se i sotto-campioni andranno analizzati separatamente o andranno uniti in un unico campione.

6.1.2 Localizzazione dei punti di prelievo di acqua ambientale

La distribuzione spaziale delle molecole di DNA nell'ambiente è uno degli aspetti più importanti da tenere in considerazione quando si decide di effettuare il prelievo dei campioni d'acqua. La distribuzione dello spazio del eDNA è influenzata particolarmente dal trasporto del eDNA e la distanza alla quale questo si disperde a partire dal punto di rilascio. I fattori idrologici dei singoli corpi idrici sono da tenere in considerazione soprattutto nel comprendere la dinamica di rimescolamento delle acque. La presenza di correnti e turbolenze tende ad operare un'omogenizzazione della distribuzione del eDNA sia in orizzontale che in verticale, mentre una loro assenza porta ad una compartimentazione del eDNA in zone specifiche del corpo idrico e ad una distribuzione molto eterogenea (Deiner e Altermatt 2014; Deiner et al. 2016; Hänfling et al. 2016; Jerde et al. 2016; Shogren et al. 2017; Macher e Leese 2018; Pont et al. 2018). In questa sezione esamineremo quali sono i fattori che possono influenzare la raccolta di eDNA a scale spaziali molto ridotte, in modo da fornire indicazioni utili nel momento in cui si effettua il prelievo dell'acqua ambientale ed occorre pertanto stabilire

l'esatta localizzazione dei punti di prelievo. Porre attenzione a questi aspetti porta alla definizione di una fase che è leggermente distinta da quella in cui vengono definiti quali siano i corpi idrici da campionare (ie selezione dei siti di campionamento). Anche se quest'ultima è tipicamente legata alla definizione di una strategia di campionamento (cfr. par. 4 Dove campionare), la separazione di queste due fasi non è particolarmente netta.

Sistemi lentic

All'interno dei sistemi lentic, come i laghi e gli stagni, l'eDNA è distribuito in maniera non omogenea e la composizione specifica cambia anche a distanze di poche centinaia di metri (Brys et al. 2020). Questo significa che è necessario campionare l'acqua da più punti per massimizzare la *detectability* e garantire una sufficiente accuratezza nelle specie dell'habitat campionato che risultano rilevate. Per assolvere a tale finalità, come già specificato in precedenza (cfr. par. 4 e 5 Dove e Quando campionare) occorre aumentare il numero di siti di campionamento effettuando quindi delle repliche spaziali oppure adoperando un sotto-campionamento. Il posizionamento di siti andrà localizzato quindi in diversi punti della superficie del lago, sia lungo le sponde che a diverse distanze dalla linea di costa nelle porzioni centrali del lago. Campionamenti effettuati esclusivamente da riva nei corpi lentic hanno dimostrato di essere sottoposti a diverse fonti di errore che portano a sottostimare la biodiversità del biotopo campionato (Lawson Handley et al 2019). Quando il lago mostra evidenze di stratificazioni termiche occorre inoltre effettuare dei prelievi a diverse profondità.

Sistemi lotici

Nei sistemi lotici (fiumi e torrenti) il eDNA è maggiormente rimescolato all'interno della colonna d'acqua, ma vi è sempre una tendenza generale a depositarsi sul fondo del letto fluviale e sulle sponde. Un campionamento che preveda la collezione di sotto-campioni lungo tutta la sezione fluviale può aumentare la *detectability* rispetto a quei sistemi fluviali in cui il DNA viene raccolto solo sulle sponde ed evitare le diverse fonti di errore che generano false assenze. Un ulteriore fattore da non trascurare è costituito dall'apporto differenziale di eDNA da parte dei corsi d'acqua tributari che confluiscono nel corpo idrico d'interesse. Effettuare il campionamento a monte della confluenza con gli affluenti permette di escludere il contributo di eDNA che proviene dal relativo sottobacino idrografico. Campionare a valle di una confluenza, al contrario, massimizza la capacità di rilevare l'occorrenza delle specie d'interesse dal momento che teoricamente l'eDNA raccolto rappresenta la comunità di un'area di studio più estesa, al netto dei tassi di decadimento del eDNA e della distanza alla quale può essere rilevato. Allo stesso momento però campionare a valle di un tributario, espone il campione al rischio di potenziali contaminazioni originate da specie commerciali (es. acque di scarico della ristorazione o di città) che apportano false presenze o può aumentare la concentrazione di inquinanti che inibiscono il eDNA del corpo idrico principale e ne falsano di conseguenza anche il rilevamento delle specie (aumento delle false assenze). La risoluzione della biodiversità sito specifica può essere aumentata anche campionando i corpi idrici di acque lentiche presenti nell'alveo fluviale ma disconnessi dal corpo idrico. Anche l'esecuzione di un campionamento a monte e a valle di tratti fluviali che rappresentano una discontinuità del fiume, come cascate o dighe, può dare una definizione migliore delle check list delle specie presenti in un'area. Per massimizzare la *detectability*, infine, effettuare un campionamento a intervalli regolari può essere un metodo per ovviare ad una degradazione precoce del eDNA e comprendere le dinamiche di trasporto del eDNA di una popolazione selvatica. Questa soluzione permette di identificare più efficacemente le specie rare ed è un metodo valido anche per tracciare il cambiamento delle comunità lungo il gradiente del fiume (Pont et al. 2018).

Ribadiamo ancora, infine, come la strategia di campionamento debba selezionare dei siti di campionamento che siano coerenti con le caratteristiche di idoneità del rilevamento di eDNA. Nella fase di campo, è

opportuno prestare la massima attenzione alla collocazione dei siti da campionare in maniera da validare i criteri con cui sono stati selezionati da remoto durante la strategia di campionamento. È necessario, ad esempio, evitare la vicinanza di impianti di trattamento o scarichi fognari nonché i periodi di trattamenti fitosanitari in agricoltura (cfr. par. 4 e 5 Dove e Quando campionare).

6.1.3 Quantità di acqua

Il numero di litri di acqua da prelevare in ogni sito è legato alla fase di filtrazione dell'acqua, e dipende quindi dalla dimensione dei pori del filtro, dalla tipologia di pompa utilizzata e dalla torbidità dell'acqua che tende a otturare il filtro. La scelta di questi fattori si ripercuote direttamente sui tempi di lavoro. Tali aspetti tecnici genericamente vengono integrati negli obiettivi che possono essere raggiunti da una strategia di campionamento. In casi diversi, ad esempio, possiamo avere strategie di campionamento che prevedono il prelievo di un numero di litri standard in modo da confrontare siti diversi tra di loro oppure, in alternativa, è possibile adottare un campionamento che prelevi un numero di litri che varia in funzione della complessità e dell'estensione del biotopo campionato. Ad un copro idrico più esteso corrisponde quindi uno sforzo campionario maggiore. Una problematica simile si ripropone a scala di sito, e si può risolvere in due principali modalità.

In caso di acque torbide si può prelevare e filtrare acqua fino a quando il filtro non è occluso dal sedimento, oppure si può optare per un numero di litri standard, cambiando filtri non appena questi si occludono. La scelta della quantità di litri da prelevare è legata anche al numero di repliche che si intende effettuare o al fatto che si opti per un sotto-campionamento. È possibile prelevare lo stesso volume di acqua in più punti (repliche spaziali di un campionamento), oppure prelevare una quantità frazionata in diversi punti (es. attorno al sito prescelto o lungo un tratto di sponda o su tutto il lago) in modo da raggiungere il volume desiderato (pseudorepliche) (cfr. par. 4 e 6.1.2).

C'è poco consenso nel mondo scientifico, invece, su quale sia il volume d'acqua ambientale minimo da campionare per garantire la rappresentabilità di un'intera comunità. In generale, maggiore è il volume d'acqua campionato, maggiore è la probabilità di rilevare specie rare e di identificare correttamente la composizione della comunità animale (Pont et al. 2018; McClenaghan et al. 2020). Tuttavia, la relazione tra volume d'acqua filtrato e numero di specie rilevate non sembra essere lineare, tanto che piccole quantità di volume (meno di 1-2 litri) si sono dimostrate sufficienti a rilevare tutte le specie presenti nell'area di studio, soprattutto se abbinate a specifici protocolli d'estrazione (Machler et al. 2016; Muha et al. 2019). I casi di studio condotti finora hanno dimostrato la validità di una quantità di acqua filtrata estremamente eterogenea, che va da pochi millilitri (15-100-300 ml) a decine di litri (30-100 l) e pertanto al momento non vi sono indicazioni rigorose che possono fungere da linee guida, sebbene la maggior parte degli studi abbia prodotto dei dati che possono essere utilizzati per confronti filtrando 1-5 litri (Deiner et al. 2016; Civade et al. 2016; Valentini et al. 2016). Il filtraggio di 3 litri ha rappresentato in diversi casi il volume idoneo a rilevare tutte le specie presenti in una determinata area (Santas et al. 2013; Sun et al. 2022).

Una delle variabili che più influenza la capacità di filtrazione è legata alle caratteristiche delle membrane di filtrazione, in particolare la dimensione dei pori e l'area di filtrazione che la membrana offre al liquido che la attraversa. Filtri dai pori più piccoli (0.2 μm - 0.45 μm) impiegano più tempo a filtrare una quantità nota di volume d'acqua rispetto a pori più larghi (1.2 μm - 8 μm), ma la scelta di quale tipologia di filtro utilizzare non è legato solo ai tempi attesi di filtrazione. Quale dimensione dei pori impiegare in una campagna di eDNA dipende per lo più dallo stato in cui si presentano le molecole di DNA in ambiente e dalle loro dimensioni

(cfr. par. 2.4 e 6.3.1). Per diminuire i tempi di filtrazione, quindi, è consigliabile adottare una fase di prefiltrazione utilizzando dei filtri dai pori maggiori, per poi filtrare il liquido nuovamente attraverso la dimensione dei pori selezionata. L'area di filtrazione delle membrane invece è generalmente legata alla tipologia di filtro impiegata. Vi sono tre principali tipologie di filtri (Peixoto et al. 2020). I filtri incapsulati, i più comuni modelli usa e getta della marca Sterivex, sono di dimensioni molto contenute e filtrano fino a 1 litro o poco più. Le membrane a disco hanno una superficie di 17.35 cmq ed hanno capacità di filtraggio maggiori, soprattutto se abbinate ad un sistema di prefiltraggio del particolato più grosso, raggiungendo dall'1 ai 5 litri. Questa tipologia di filtri può essere utilizzata adoperando una filtrazione attiva in maniera simile a quella utilizzata dalle altre tipologie di filtri, ossia forzando l'acqua a passare attraverso il filtro, oppure in maniera passiva, mettendo i filtri in acqua per diverso tempo a catturare il eDNA che viene veicolato dalle correnti e dal moto ondoso (Bessey et al 2021; Takahashi et al. 2020). I filtri a capsula (es. modello Waterra), infine, hanno un involucro esterno a forma di cilindro nel quale è alloggiata una membrana cilindrica plissettata che aumenta la superficie di filtrazione fino a 1300cmq. Sono abilitati a filtrare volumi maggiori che arrivano fino a 30-100 litri, ma il loro costo varia da 10 a 25 volte quello dei filtri a disco. La scelta di quale sistema di filtrazione adottare dipende dalle finalità di studio, come già detto in apertura di paragrafo, e dai costi dei materiali.

Vi sono diverse tecniche e tecnologie adoperabili nella filtrazione del campione di acqua ambientale (cfr. par. 6.3.3 Filtrazione in campo). Una delle più utilizzate prevede l'impiego di una pompa del vuoto. Modelli diversi possono avere caratteristiche diverse e quindi prestazioni più o meno efficienti. La potenza della pompa, ad esempio, è inversamente correlata con i tempi di filtrazione. Incrementando la potenza della pompa, pertanto, ci si attende una filtrazione più veloce ed un risparmio nei tempi di lavoro, oppure ci si aspetta la filtrazione di un volume di acqua maggiore. Tuttavia, è stato dimostrato che le membrane sottoposte ad alte pressioni hanno una ritenzione ridotta del eDNA dal momento che le molecole sono obbligate a passarvi attraverso con forza eccessiva (Thomas et al. 2018). Questo effetto, tuttavia, sembra essere compensato nella quantità maggiore di eDNA che viene raccolta da un maggiore volume di acqua filtrato.

6.1.4 Aspetti pratici e considerazioni tecniche

Il campionamento delle acque stagnanti e correnti necessita di alcuni accorgimenti, che in maniera sommaria rientrano in delle semplici norme per evitare il rischio di contaminazione di eDNA tra campioni diversi. Il principio fondamentale è che lo stesso materiale non dovrebbe entrare in contatto con campioni ambientali diversi.

Occorre evitare di entrare in acqua per non contaminare il corpo idrico con eDNA alloctono depositato su stivali, suole di scarpe o vestiti, e per evitare di trasferire eventuali patogeni tra siti diversi. L'ingresso in acqua, inoltre, altera il substrato del corpo idrico, mobilitando il sedimento dal fondo e aumentando la torbidità dell'acqua. Questo è un fattore a cui occorre prestare attenzione a seconda di quanto dichiarato nella strategia di campionamento, dal momento che il sedimento tende ad aumentare i tempi di filtrazione o quelli di estrazione, e può sia diminuire che aumentare la *detectability* delle molecole di eDNA. In acque correnti è possibile entrare in acqua, se necessario, ma occorre campionare da valle a monte. È necessario quindi porre attenzione al punto in cui si accede all'acqua in maniera da camminare sempre controcorrente ed effettuare i campionamenti che rispettino rigorosamente una sequenza da valle a monte, qualora si decida di effettuare un sotto-campionamento dei diversi microhabitat presenti lungo la sezione fluviale dalla

sponda al centro dell'alveo. Anche il campione ambientale deve essere raccolto stando controcorrente e immergendo le bottiglie di raccolta dell'acqua a monte dell'operatore.

Materiali che entrano in contatto con più campioni diversi devono essere sterilizzati correttamente o, se non possibile, devono essere sostituiti da una strumentazione sterile monouso. Per operare una corretta sterilizzazione ci si può avvalere di varichina diluita al 10% che si è dimostrata efficiente in diversi studi (Prince e Andrus 1992). In alternativa, per una sterilizzazione più profonda è possibile optare per la varichina diluita al 50% (Kemp and Smith 2005; Champlot et al. 2010; Goldberg et al. 2016; Wilcox et al. 2016). Nell'immergere la bottiglia al di sotto della superficie dell'acqua, l'uso dei guanti è obbligatorio per evitare l'introduzione del DNA appartenente all'operatore e del DNA alloctono proveniente da altri siti. Ovviamente occorre immergere la bottiglia solo fino alla profondità alla quale il guanto offre ancora una protezione sterile, che ammonta all'incirca a 20 cm massimi di profondità dalla superficie dell'acqua. Il campionamento da sponda senza entrare in acqua può avere alcune forme di *bias* nella rappresentazione degli habitat campionati. Può inoltre, comportare anche alcune difficoltà operative. Ad esempio, da sponde con pendenza molto lieve è difficile colmare la bottiglia di raccolta dell'acqua in tutto il suo volume, dal momento che la bottiglia non può essere inclinata. Ulteriori strumentazioni adoperabili per campionare da sponda possono essere prese in considerazione come l'utilizzo di bastoni prensili allungabili, l'uso di un piccolo tubo che peschi direttamente in acqua e che agevola la filtrazione in situ (pompa peristaltica) oppure l'impiego di piccole imbarcazioni. Queste ultime sono fondamentali se si vuole effettuare un campionamento in acqua profonde che interessi sia la superficie del corpo idrico che gli strati profondi. In questo caso è preferibile utilizzare solo imbarcazioni locali oppure, in caso contrario, per non evitare contaminazioni occorre effettuare una sterilizzazione dello scafo o una raccolta dell'acqua esclusivamente da prua con la barca in movimento. Per il campionamento degli strati profondi occorre l'impiego della strumentazione opportuna (bottiglie con messengeri).

Infine, l'adozione di controlli negativi permette di valutare se la sterilizzazione del materiale è avvenuta in maniera corretta ed ha efficacemente prevenuto la contaminazione tra campioni. In questa maniera è possibile aumentare così l'attendibilità dei risultati e facilitare di conseguenza l'interpretazione biologica dei dati, grazie all'esclusione del rischio delle false presenze.

6.2 Campionamento delle variabili ambientali

La misurazione delle variabili ambientali che possono influenzare la *detectability* del eDNA può essere molto utile per tenere le condizioni sperimentali sotto controllo nel corso del proprio studio. Diventa quindi imprescindibile l'utilizzo delle strumentazioni professionali tipiche delle discipline legate all'idrologia per poter avere misurazioni accurate dei parametri ambientali di interesse, come nel caso del mulinello idrometrico o della sonda per i parametri chimico-fisici base dell'acqua. Questo però richiede competenze specifiche nella manipolazione di tale strumentazione e la necessità di un maggiore tempo di lavoro nella fase di campo, che possono tradursi nell'impiego di un maggior numero di personale.

Tra le variabili ambientali di maggior interesse da riportare possiamo elencare le condizioni meteo al momento del campionamento, la stagione (la data di campionamento), la profondità alla quale è avvenuto il campionamento, il pH, la temperatura, la salinità, la velocità dell'acqua o la portata, le caratteristiche dell'alveo fluviale espresse come larghezza e profondità dell'alveo, la tipologia di habitat (Harrison et al. 2019, Minamoto et al. 2020; Bruce et al. 2021). Questi sono considerati i parametri di base che è importante

riportare in ogni studio di eDNA in modo da poter rendere confrontabili i dati dei diversi casi di studio condotti nel mondo sul DNA ambientale in modo tale da poter descrivere meglio il comportamento del eDNA.

A questi si possono aggiungere ulteriori parametri come la torbidità, la concentrazione di nitriti ed i nitrati, la comunità microbica misurata come clorofilla A o materia organica, il carico di nutrienti e la tipologia di substrato. Note finali sono legate all'osservazione delle condizioni specifiche riscontrate nei vari siti di campionamento caso per caso, come la presenza di lettiera e foglie in acqua o la presenza di bestiame e di sorgenti di inquinamento chimico.

6.3 Filtrazione del campione di acqua ambientale

Per acquisire eDNA dall'acqua sono stati sviluppati nel corso degli anni due principali metodi, la filtrazione e la precipitazione. Nonostante le tecniche di rilevamento del eDNA sia stata applicate per la prima volta impiegando il metodo della precipitazione per ottenere DNA dall'acqua (Ficetola et al. 2008), nel corso degli anni gli studi che sfruttano le metodologie di filtrazione sono aumentati in numero sempre maggiore. La filtrazione si è dimostrata di grande successo nell'offrire una maggiore sensibilità, nel ridurre il rischio di contaminazione e nell'agevolare l'organizzazione logistica e risparmiare ulteriori problematiche legate ad un corretto smaltimento dei materiali e alla necessità di seguire specifiche norme di sicurezza (Deiner et al. 2015; Spens et al. 2017; Tsuji et al. 2019; Muha et al. 2019). Qui trattiamo quindi solo aspetti relativi alla filtrazione ed in particolare ai diversi aspetti tecnici che ne influenzano la resa, in termini di quantità di DNA (es. caratteristiche dei materiali). Tuttavia, le varie fasi che si succedono (filtrazione, preservazione, estrazione) hanno talmente tante differenti combinazioni di materiali e soluzioni tecnologiche che sono state impiegate nel corso dei casi di studio sperimentati negli anni sul eDNA che è molto arduo individuare quale sia il flusso di lavoro ideale per massimizzare la *detectability* del eDNA. È possibile, ad esempio, che la scelta delle diverse combinazioni di materiali possa essere influenzata anche da fattori esterni, come ad esempio quelli legati alla specie target e dalle caratteristiche della molecola di DNA specie-specifica (dimensioni, legami elettrostatici).

6.3.1 Materiale del filtro

I materiali di cui sono composti i filtri disponibili in commercio sono genericamente il nitrato di cellulosa (NC) o gli esteri misti di cellulosa (MCE), il poliestersulfonato (PES), il polivinilidenefluoruro (PVDF), le fibre di vetro (GF) ed il policarbonato (PC). Le membrane composte da un materiale idrofilico possono agevolare il passaggio dell'acqua attraverso la trama del filtro stesso, ed alcune tipologie di membrana (es. PVDF) possono essere acquistate dalla casa produttrice sia come membrane idrofiliche che idrofobiche. Nel confronto tra vari materiali, la nitrocellulosa è il componente più usato finora (Tsuji et al. 2019), quando vengono impiegati filtri dalla dimensione dei pori più ridotta disponibile in commercio, ma sono gli esteri misti di cellulosa ad essere migliori secondo alcuni studi (Turner et al. 2014; Li et al. 2018; Hinlo et al. 2017; Majaneva et al. 2018; Capo et al. 2019; Di Muri et al. 2020) mentre in altre esperienze è il poliestersulfone il materiale che ha garantito i risultati più eccellenti (Spens et al. 2017). Per dimensioni dei pori maggiore, le fibre di vetro, invece, avendo caratteristiche chimiche che adsorbono il DNA e le proteine sulla superficie del filtro, potrebbero portare ad una quantità raccolta di DNA maggiore. La diversa capacità di catturare il DNA da parte dei diversi materiali potrebbe essere definita dalle cariche elettrostatiche residue delle molecole eDNA.

specie-specifiche ricercate nei diversi casi di studio oppure essere dettata da ulteriori fattori confondenti (dimensione dei pori, kit di estrazione, disegno sperimentale, carico microbico).

6.3.2 Dimensione dei pori

La scelta della dimensione dei pori dei filtri è intimamente legata a due fattori: alla tipologia di molecole da intercettare sulla trama del filtro e alla quantità di litri da filtrare.

I frammenti del DNA mitocondriale del gene COI (12S e 16S) persistono nell'ambiente per un tempo molto più lungo rispetto ai frammenti di DNA ribosomiale (18S) o di DNA nucleare, grazie ad una maggior protezione operata dalle strutture dei mitocondri nel contrastare la degradazione a partire dal momento in cui inizia la lisi cellulare. Tuttavia, l'alta abbondanza dei geni ribosomiali può offrire una valida alternativa finalizzata al monitoraggio in alcune determinate condizioni (Jo et al. 2019b; Moushomi et al. 2019; Barnes e Tuner 2016).

Per la raccolta di frammenti di DNA sono raccomandati filtri sterili (forniti come tali o da autoclave: Unnithan et al. 2014) dalla dimensione dei pori di 0.22 µm o 0.45 µm (Strickler et al. 2015; Eichmiller et al. 2016a; Spens et al. 2017, Capo et al. 2019) nonostante vengano indicate anche dimensioni maggiori come ottimali (0.8 µm: Li et al. 2018). Genericamente quindi possono essere adoperati filtri con dimensione dei pori minore di 1 µm, dove la perdita di eDNA attesa è minima probabilmente perché a questa dimensione corrisponde quella degli organelli subcellulari (mitocondri, ribosomi) (Deiner et al. 2018). Anche dimensioni dei pori maggiori si sono dimostrate promettenti nell'acquisire eDNA di macrofauna (es. pesci: 1-10 µm fino anche a 64 µm) e possono essere pertanto un'alternativa contemplabile all'interno di un progetto di campionamento di eDNA (Turner et al. 2014; Wilcox et al. 2015; Schabacker et al. 2020).

La scelta della dimensione dei pori deve confrontarsi con il compromesso sul volume d'acqua da filtrare (cfr. par. 6.1.3 Quantità di litri). Adottare un filtro troppo fitto aumenta il rischio di occlusione da parte del sedimento sospeso in acqua. Dall'altra parte, impiegare un filtro troppo rado può limitare la capacità di catturare le particelle più piccole contenenti eDNA. Alcune metodiche differenziali di filtrazione hanno testato come questo rapporto di dimensione dei pori/volume d'acqua filtrato possa influenzare la *detectability*. La filtrazione di un volume d'acqua maggiore attuata con filtri dalla dimensione dei pori maggiore si è dimostrata più efficace rispetto alla filtrazione di pochi litri di acqua ambientale con filtri dalla dimensione dei pori minore (Hosler 2017; Sepulveda et al. 2019).

Se la dimensione dei pori non permette di raggiungere il volume di acqua desiderato a causa dell'intasamento del filtro ad opera del sedimento, è possibile sostituire il filtro intasato con uno nuovo ed aumentare il numero di filtri che verranno sottoposti ad analisi. Occorre tenere in considerazione che questa scelta apporta dei cambiamenti nelle fasi successive del flusso di lavoro e che, in particolare, aumenta i tempi di lavoro in fase di estrazione. In alternativa, è possibile adottare una fase preliminare di prefiltrazione precedentemente a quella di filtrazione, utilizzando un filtro dalla trama meno fitta che trattenga solo il particolato in sospensione (Xing et al. 2022). Questa prefiltrazione è tassativa quando si campionano acque particolarmente torbide ma è sconsigliata da alcuni per la diminuzione della *detectability* che comporta (Li et al. 2018; Takasaki et al 2021). Per ovviare a tali problematiche, si suggerisce sempre di sottoporre alla fase di estrazione del DNA anche i prefiltri. Tuttavia, il sedimento, di cui i prefiltri sono ricchi, può aumentare le concentrazioni di inibitori dell'estrazione del DNA d'interesse. Se estrarre i prefiltri insieme ai filtri ricchi in eDNA oppure se effettuare una estrazione dei due filtri in maniera separata è materia del disegno sperimentale e dei vincoli dettati dal budget e dal costo dei materiali e del personale impiegato.

Il sedimento però può agire sia da inibitore nei confronti del eDNA in fase di estrazione che aumentare la sua *detectability*, dal momento che le molecole di DNA possono legarsi alle particelle solide del substrato. La capacità di non incorrere in evitare l'inibizione in fase di estrazione del DNA dipende soprattutto della tipologia di kit di estrazione che viene utilizzato e dalla natura delle molecole che sequestrano il DNA (cfr. par. 7 Estrazioni di eDNA). Comprendere a priori se inserire il sedimento all'interno del campione di acqua ambientale o meno è importante nel guidare le fasi operative a valle. Se ad esempio il campione ambientale viene collezionato con bottiglie che vengono tenute temporaneamente in un locale a basse temperature (es. frigo), il sedimento prelevato contestualmente con il campione d'acqua tenderà a sedimentare sul fondo delle bottiglie. Questo fa sì che sia possibile escludere il sedimento dalla filtrazione ad accelerare i tempi di lavoro. Un compromesso per diminuire i tempi di lavoro e includere il sedimento nel filtrato è quello di aggiungere il sedimento negli ultimi momenti della filtrazione.

6.3.3 Filtrazione in campo o in laboratorio

Per campagne di campionamento di eDNA che interessano aree di studio particolarmente estese è possibile effettuare la filtrazione dell'acqua ambientale direttamente in campo, utilizzando diversi metodi. Le pompe manuali o le siringhe a stantuffo sono un primo metodo a disposizione, facile da usare, impiegabile in tutti i contesti ambientali e comodamente recuperabile in comuni negozi. Le pompe del vuoto sono una soluzione più attuabile nel processare ampi volumi di acqua ma necessitano di essere elettrificate. Infine, alcune tecniche innovative stanno prendendo sempre più piede sotto forma di zaini a tracolla in cui il campionamento viene effettuato da un operatore che può comodamente campionare lungo un transetto per mezzo di un'asta di suzione che diminuisce il rischio di contaminazione ad opera dell'operatore. Alcuni di questi possono essere molto efficaci nel contrastare la degradazione del eDNA, dal momento che diminuiscono i tempi in cui il DNA target viene esposto alle temperature ambientali. Una rapida filtrazione dell'acqua e la disponibilità di frigoriferi portatili permette di preservare velocemente il DNA a basse temperature (cfr. par. 6.4 Preservazione del eDNA). Tuttavia, le tecniche qui illustrate presentano alcuni svantaggi. Le pompe manuali sono lente, specialmente nel filtrare molti litri, e possono essere eccessivamente affaticanti dal punto di vista fisico. Le pompe elettriche possono essere pesanti e non essere trasportabili in ambienti remoti che non sono provvisti di elettricità per poterle azionare. I sistemi innovativi possono invece essere costosi o non ancora commercializzati. La filtrazione in campo, specialmente se effettuata impiegando i filtri non incapsulati, può esporre il filtro a DNA alloctono dato dalla strumentazione non correttamente sterilizzata, da ulteriori oggetti utilizzati che entrano in contatto con più campioni ambientali (es. veicolo per lo spostamento) o dal fatto che la filtrazione è effettuata in ambiente naturale ricco in eDNA trasportabile sul campione tramite vento. Inoltre, quando la filtrazione diviene particolarmente lenta, cambiamenti improvvisi nelle condizioni meteorologiche possono rendere questa fase particolarmente ostica.

La filtrazione in laboratorio può rendere le operazioni di campo più veloci, dal momento che queste sono relegate alla sola fase di prelievo dell'acqua. Il DNA però può degradarsi rapidamente e pertanto, per permettere la filtrazione dell'acqua ex situ, occorre prima di tutto un frigorifero portatile in cui abbattere le temperature durante il trasporto. Un ulteriore espediente può essere quello di impiegare un veicolo addetto al trasporto che sia dotato di climatizzazione. La filtrazione deve avvenire il giorno stesso o a breve distanza temporale (meno di 12 o 24 ore: Hinlo et al. 2017). Pertanto, il locale addetto alla filtrazione deve essere posizionato in un luogo facilmente raggiungibile. Si può allestire un laboratorio in una località centrale all'area di studio, utilizzare un'unità mobile di filtrazione oppure organizzare più unità di filtrazione sparse nell'area

di studio che lavorino in contemporanea. La distanza tra il locale di filtrazione ed i siti di campionamento è un fattore chiave all'interno delle campagne di raccolta eDNA condotte su vasta scala poiché se tale distanza è eccessiva, il numero di siti che è possibile campionare al giorno diminuisce, rendendo il lavoro più lento. Questo fa sì che sia particolarmente difficoltoso effettuare campagne di campionamento contenute in brevi periodi limitati dalla fenologia del eDNA di determinate specie.

Nel progetto condotto per il rilevamento di 22 specie per la regione Lazio i campioni d'acqua sono stati filtrati in laboratorio lo stesso giorno, o il giorno successivo, attendendo almeno 12 h per la deposizione del sedimento, soprattutto nel caso di acque molto torbide.

Per la filtrazione è stata utilizzata una pompa a vuoto KNF Laboport (N86 KN.18, 6l/min, *final vacuum*: 100 mbar) inserita in un fiasco da vuoto da 1 litro e dotata di un singolo cilindro (CRAMI s.r.l., KRS47/50).

Per evitare che materiale supernatante (alghe, insetti, ecc.) intasasse i filtri è stato utilizzato un colino di metallo nella fase di riempimento del cilindro della pompa a vuoto. È stata quindi eseguita una prefiltrazione con filtri di esteri misti di cellulosa con pori da 8 µm (Millipore, diametro 47 mm), seguita da una filtrazione con filtri da 0.22 µm. L'acqua prefiltrata è stata temporaneamente riposta nelle stesse bottiglie di campionamento. I filtri sono stati quindi sterilizzati in autoclave e tutti i singoli elementi sterilizzati con alcool, fiamma o soluzione di varechina al 10%. In caso di acque molto torbide sono stati filtrati 500 ml di acqua/litro. I prefiltri sono stati riuniti in un'unica capsula Petri, così come i tre filtri, ed entrambe le capsule poste in freezer a -21 °C. Ogni 5 filtrazioni è stata operata una filtrazione di un litro di acqua sterile (blind sample) per valutare eventuali contaminazioni. Al fine di valutare l'esistenza di possibili contaminazioni è stata anche annotata la sequenza temporale delle filtrazioni.

6.3.4 Conservazione del DNA ambientale

È possibile preservare il eDNA sui filtri congelandoli in a -20 °C, disidratandoli oppure aggiungendo degli additivi liquidi che ne evitano la degradazione. L'utilizzo della refrigerazione è probabilmente il metodo più accessibile, ma è necessario sottolineare che sottoporre il DNA a ripetuti cicli di congelamento e scongelamento è deleterio poiché causano una perdita del DNA raccolto (Spens et al. 2017). Al contrario, è stato osservato un aumento nella quantità di DNA estratto in campioni ambientali sottoposti ad un solo ciclo di scongelamento rispetto a campioni in cui l'estrazione è avvenuta il giorno stesso del filtraggio dell'acqua. Probabilmente il congelamento ha favorito la lisi cellulare e aumentato la possibilità di "accedere" alle molecole di DNA da parte degli agenti di estrazione (Mauvisseau et al. 2021). La disidratazione è anch'essa molto semplice da ottenere, adoperando del gel di silicio ed un dissecatore o della carta assorbente, ma è meno utilizzata. È inoltre un metodo particolarmente comodo per la preservazione a temperatura ambiente ma è efficiente al massimo solo per pochi mesi (Thomas et al. 2019). L'utilizzo di etanolo (alcool 96%) è una soluzione di facile reperibilità nel preservare il DNA nella sua interezza. L'adozione di agenti di lisi, invece, come il Longmire's buffer o il Sarkosyl buffer, rilasciano il DNA nella soluzione che a sua volta ne permette la preservazione (Longmire et al. 1997; Wegleitner et al. 2015; Civade et al. 2016).

Diversi studi hanno dimostrato gli effetti positivi dell'utilizzo di liquidi preservanti, anche rispetto al metodo della congelazione (Minamoto et al. 2016; Spens et al. 2017; Kumar et al. 2020). Tuttavia, la congelazione dei filtri rimane quello più utilizzato nel corso di almeno due terzi degli studi di eDNA condotti finora. L'utilizzo di congelatori che raggiungono -20 °C ha dimostrato di avere tassi di degradazione del DNA nelle prime due settimane, nonostante siano risultate trascurabili e non significative dal punto di vista statistico (Spens et al. 2017). Altre esperienze invece dimostrano come la congelazione sia il metodo da preferire se abbinato a

specifici kit d'estrazione e che questo metodo di preservazione non intacca la capacità di rilevare il DNA se estratto 28 giorni dopo la fase di filtrazione (Hinlo et al. 2017). Non vi è una letteratura particolarmente abbondante su quanto i tempi di preservazione influenzino la degradazione del DNA. In molti casi la filtrazione viene effettuata in maniera subitanea, senza la necessità di affrontare una fase di preservazione, ed evitando di incorrere in un eventuale degradazione. Alcuni tipi di preservanti liquidi, ad esempio, non permettono di arrestare la crescita batterica all'interno del campione, che porta ad una degradazione diretta del DNA (Bruce et al. 2021). Il congelamento dei filtri in ogni caso dimostra che anche a distanza di 8 mesi è possibile recuperare DNA e che, con tale intervallo di tempo trascorso tra la filtrazione e l'estrazione, la congelazione si è dimostrata il metodo più efficace (Mauvisseau et al. 2021).

Nel corso del primo studio sperimentale multispecifico svolto in Italia per il rilevamento di 22 specie delle acque dolci di interesse comunitario o unionale sviluppato dall'Università del Molise e finanziato dalla Regione Lazio abbiamo testato diverse metodologie di campionamento e filtrazione. Laddove è stato possibile sono stati prelevati 3 litri di acqua utilizzando bottiglie di plastica monouso non sterili. Le bottiglie sono state riutilizzate sterilizzando con soluzione 10% di varechina (poi conservata in taniche per il successivo smaltimento), acqua corrente e infine sciacquandole 3 volte con acqua dei siti di campionamento prima del prelievo. I campioni di acqua lenticia sono stati prelevati a 20 cm di profondità utilizzando guanti sterili monouso, prelevando ca 200 ml di acqua ogni 20 m per circa 300m lungo la riva

I campioni di acqua corrente sono stati campionati lungo transetti di ca 50 m o prelevando acqua a intervalli regolari lungo la riva.

le bottiglie contenenti i campioni sono state poste in borse termiche rigide provviste di refrigeratori e quindi conservate in frigorifero a +10°C fino alla filtrazione.

6.3.4 Rilevamento dei parametri ambientali

Nel corso dei rilevamenti è utile misurare alcuni parametri che consentano una lettura critica dei risultati in termini di parametri fisico chimici che possono influenzare probabilità di rilevamento del DNA

Di seguito una lista di parametri che possono essere rilevati con costi ridotti e da parte di operatori non specializzati con l'ausilio di semplici apparecchi

- temperatura dell'aria
- Temperatura dell'acqua, rilevabile con sonar Deeper Pro
- profondità dell'acqua, rilevata come valore medio di misure ripetute lungo un transetto lineare di 20 m utilizzando un sonar Deeper Pro
- ampiezza del letto fluviale, rilevabile attraverso immagini satellitari (remote sensing)
- pH, presenza di nitriti e nitrati, rilevabili utilizzando cartine da tornasole per categorie: pH (6.4, 6.8, 7.2, 7.6, 8.0, 8.4), nitriti (0, 1, 5, 10, 25, 50), nitrati (0, 10, 25, 50, 100, 250, 500)
- torbidità dell'acqua rilevata visivamente (bassa, media, alta)
- velocità dell'acqua, rilevata lanciando una pallina di plastica collegata a un filo di 10 m e lanciata al centro del corso d'acqua e misurando 3 volte il percorso in termini di s/m, calcolando la media dei tre valori e l'inverso del valore finale (m/s).

7. Estrazione del DNA ambientale

L'estrazione del eDNA raccolto sui filtri può avvenire in diverse maniere a seconda della tipologia di filtro, dal metodo di preservazione utilizzati e dall'ambiente dal quale è stato prelevato il campione. In generale, è possibile adoperare dei kit di estrazione commerciali, specifici per differenti tipologie di reazione e substrati molecolari, oppure adoperare dei metodi che coinvolgono una fase liquida.

I kit commerciali sono di diversi tipi, in base soprattutto alla tipologia di substrato da cui estrarre il DNA. L'azienda Qiagen, leader mondiale in questo settore, propone kit per l'estrazione di DNA da sangue e tessuti (DNeasy Blood and Tissue extraction kit), da acqua (PowerWater DNA extraction kit) e da suolo (DNeasy PowerSoil extraction kit, PowerMax Soil DNA extraction kit, DNeasy PowerSoil Pro extraction kit). Il DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) è il kit commerciale più utilizzato anche se in un confronto di prodotti FastDNA SPIN kit della ditta Biomedicals è risultato essere il migliore. In presenza di inibitori invece le prestazioni migliori sono state rilevate con il Power Soil kit (Qiagen) (Deiner et al. 2015; Eichmiller et al., 2016a; Mahmoudi et al. 2011; Smith et al. 2012; Brannelly et al. 2020; Tumolo et al. 2021).

I kit commerciali sono facili da reperire e permettono di effettuare estrazioni in maniera standardizzata. Questa condizione è particolarmente vantaggiosa soprattutto in monitoraggi di routine e nel permettere il confronto tra studi diversi. L'estrazione che prevede il metodo di separazione di una fase liquida, invece, si avvale dell'utilizzo di fenolo-cloroformio-isoamile e porta ad estrarre in maniera efficace una quantità maggiore di DNA rispetto a quella ottenuta dai kit, ma pone dei seri rischi di salute e sicurezza per il laboratorio (Deiner et al. 2015; Bruce et al. 2021).

La tipologia di filtro scelto durante la fase di filtrazione influisce sulla possibilità di operare la lisi delle cellule necessaria per liberare il DNA secondo metodi specifici. I filtri incapsulati non permettono ad esempio di operare una lisi di tipo meccanico, essendo il filtro non removibile dalla casula di contenimento. In questo caso, la lisi avviene esclusivamente con metodi chimici per mezzo dell'aggiunta di additivi. Per questo si consiglia di adoperare filtri aperti o contenuti in involucri che si possono aprire. La lisi meccanica è particolarmente necessaria per la rimozione delle pareti cellulari in organismi come le diatomee.

Nella fase di estrazione è importante conoscere se il metodo di preservazione del eDNA ha già operato una lisi delle cellule o meno. Nel caso dell'etanolo, che agisce come inibitore dell'estrazione del DNA, questo può essere rimosso dal filtro facendolo evaporare completamente, (Spens et al. 2017). In alternativa, l'etanolo può essere fatto precipitare (Bruce et al. 2021). Nel caso di utilizzo di altri metodi di preservazione liquida, ad esempio con buffer di lisi, le condizioni portano, al contrario, a far sì che il liquido in cui è immerso il filtro sia ricco di DNA (Colangelo, com. pers.). In questi casi, però, occorre prestare attenzione alla compatibilità tra il tipo di buffer utilizzato e il kit di estrazione scelto.

La presenza di inibitori nell'ambiente di campionamento (es. sedimento argilloso, acidi umici, inquinanti chimici) deve essere presa in considerazione nella scelta del metodo di estrazione, dal momento che l'inibizione è una delle maggiori cause di falsa assenza (Jane et al. 2015; McKee et al. 2015). La quantità di DNA legato a specifiche molecole o particelle è probabilmente molto alta in ogni campione e senza adoperare il metodo più corretto di estrazione, tali molecole di eDNA non verranno rilevate nelle fasi successive tipiche degli studi di eDNA (amplificazione per mezzo di PCR - Polymerase Chain Reaction). In presenza di argilla, ad esempio, o in caso di acque torbide, l'utilizzo di kit di estrazione del DNA a partire da suolo e sedimenti (PowerSoil kit) è imprescindibile per rilasciare le molecole adsorbite, così come l'utilizzo del fosfato trisodico nel caso dei buffer di lisi (Ogram et al. 1987; Sellers et al. 2018; Diaz et al. 2020; Pearman et al. 2020). Anche

alte concentrazioni di composti organici possono inibire l'estrazione del DNA, come nel caso di acque prelevate da corsi minori ricchi in lettiera e materiale vegetale in decomposizione o in habitat eutrofici o di tratti di fiume in cui vengono sversati i liquami del bestiame domestico (Braid et al. 2003). I kit commerciali ideati per l'estrazione del DNA a partire da suolo, acqua e feci spesso hanno già incluso nel processo di estrazione una fase di rimozione degli inibitori. In alternativa, occorre aggiungere un ulteriore step di laboratorio nel quale si rimuovono gli inibitori dal campione.

La diluizione dell'estratto di DNA è un altro espediente utilizzato spesso per ridurre la concentrazione di inibitori. Questa operazione ha però l'effetto negativo di ridurre anche la concentrazione del DNA target, diminuendo la *detectability*. Come approccio comune, spesso si opera una diluizione seriale in modo da determinare il livello minimo della diluizione che può contrastare l'inibizione.

È utile all'interno di questa fase inserire un test finale per comprendere se l'estrazione del eDNA è andata a buon fine o se è stata influenzata da perdite di DNA nel corso del processo di preservazione o da effetti di inibizione (Hoorfar et al. 2004; Furlan et al. 2016). Questo può essere effettuato per mezzo dei cosiddetti controlli interni positivi. Coppie di primer universali per l'amplificazione di marcatori comuni a tutti i metazoi (es. COI, 16srRNA), possono essere utilizzate per verificare durante il primo saggio qPCR che il campione contenga effettivamente del DNA animale correttamente estratto.

8. Considerazioni finali sulle metodologie di campionamento

Riassumiamo alcuni degli aspetti sui quali la strategia di campionamento può variare in base agli obiettivi di studio e ai mezzi a disposizione per raggiungere tali finalità (tempi di ricerca, personale a disposizione, finanziamenti) e quali possono essere le strumentazioni necessarie per l'organizzazione pratica di una campagna di rilevamento basata su approcci eDNA.

Gli studi di rilevamento in questo contesto possono essere impostati in maniera molto differente tra di loro, e questo è dato dal complesso di varianti a disposizione, la cui scelta si basa sul compromesso tra obiettivi di studio, costi, metodologie selezionate, operatori e materiali a disposizione. Nella gestione di tipologie di progetti come questi, l'aspetto prioritario è quello di considerare quali siano i vincoli maggiori che condizionano il disegno dello studio. In particolare, il budget a disposizione, gli aspetti logistici legati alle caratteristiche dell'area di studio (es. accessibilità) e le tempistiche progettuali. Sanches e Schreier (2020) hanno offerto una buona panoramica su come variabili di questo tipo possono orientare un progetto di eDNA. In particolare, lo studio si focalizza sulla scelta dei materiali di filtrazione ed estrazione da privilegiare, a seconda che si dia priorità all'accuratezza dei dati acquisiti (nitrocellulosa e DNeasy Blood and Tissue Qiagen kit), ad un costo più contenuto (fibre di vetro e strisce reattive per la qPCR o idrossido di sodio NaOH) o al risparmio di tempo (fibre di vetro e sfere magnetiche). L'utilizzo di filtri a maglia fine e di kit di estrazione si dimostra quindi il metodo più efficiente nel condurre il rilevamento del eDNA ma anche il più costoso ed il più lento.

Si consiglia quindi di trovare il compromesso tra questi aspetti, le caratteristiche del sistema naturale e le metodologie che si possono implementare a tale sistema naturale e con i vincoli di costi e tempi. Una volta stabilito ciò allora sarà possibile concentrarsi sulle scelte da affrontare per ottimizzare ogni singolo passaggio del flusso di lavoro tipico di uno studio di eDNA (Minamoto et al. 2020; Bruce et al. 2021).

Strategia di campionamento. Per quanto riguarda bacini o corsi d'acqua particolarmente estesi aventi ampi alvei è possibile massimizzare la *detectability*, effettuando più repliche di campionamenti d'acqua lungo tutto il corpo idrico, oppure al contrario è possibile diminuire i tempi di campionamento selezionando un numero minore di siti, ma diminuendo anche l'accuratezza di rilevamento.

Logistica. Campagne di monitoraggio su scala regionale che prevedono il campionamento di più laghi e fiumi di grandi dimensioni necessitano il prelievo dell'acqua distribuito lungo tutta l'estensione di questi corpi idrici. Questo, tuttavia, tende a essere particolarmente dispendioso in termini di sforzo di campionamento (giorni*lavoro, vedi oltre) e può essere implementato solo se si creano più squadre di operatori che lavorano in contemporanea. In alternativa, è necessario lavorare in due squadre, una che si occupa di campionamento e una che effettua la filtrazione in laboratorio. Il campionamento di diversi microhabitat dei corpi idrici ha inoltre dei vincoli logistici ed organizzativi legati all'impiego di una imbarcazione per poter raggiungere il centro dell'alveo o del lago.

Filtrazione. La tempistica di filtrazione può essere un fattore chiave nell'evitare di diluire o degradare ulteriormente il eDNA disponibile al rilevamento. L'accuratezza dello studio può aumentare prevenendo la degradazione di eDNA post-campionamento per mezzo del prelievo di un solo campione al giorno in modo da avere la possibilità di filtrarlo in campo oppure in laboratorio nell'arco di 12 ore. In questo modo in un mese si può arrivare a completare con successo il prelievo e la filtrazione dell'acqua ambientale da 30 siti. Se il numero di siti è superiore, occorre sincerarsi in fase di disegno di studio se i tempi di lavoro permettono di avere una omogeneità temporale tra i dati acquisiti, soprattutto per quanto riguarda le specie che esibiscono una marcata stagionalità e che necessitano di essere campionate in tempi ristretti. A seconda dei materiali utilizzati, la scelta di effettuare la filtrazione in un locale specifico addetto solo a questa fase è preferibile (in modo da poter tenere sotto controllo tutta la sterilizzazione dei materiali). A parità di numero di siti di campionamento, tuttavia, questa soluzione richiede più tempo di lavoro per coprire una distanza maggiore tra il locale di filtrazione ed i vari siti. La strategia alternativa è quella di ottimizzare il campionamento prioritizzando il fattore logistico, ossia campionando più siti al giorno, ma in questo modo viene penalizzata la conservazione di eDNA. Tali campioni infatti attendono fino a 24 ore per essere filtrati.

Materiali e risorse. In dipendenza dalle tecniche di prelievo e filtrazione scelte possono essere utili alcuni strumenti specifici piuttosto che altri. Qui riportiamo alcuni di quelli che vengono impiegati genericamente nelle fasi di campionamento degli studi di eDNA.

- bottiglie sterili, guanti sterili, pennarello indelebile per etichettare le bottiglie con l'ID univoco del sito
- frigorifero portatile rigido in poliuretano espanso, con borsa frigorifero all'interno per aumentare la capacità termica e piastre del ghiaccio per mantenere una temperatura che sia ben al di sotto di quella ambientale
- sacchi monouso per evitare la contaminazione tra campioni diversi all'interno del frigorifero portatile
- stivali per campionare tramite transetto in una sezione fluviale, imbarcazione per campionare al centro di corpi idrici estesi (opzionale)
- filtri sterili (dimensione dei pori minima), prefiltri sterili (dimensione dei pori più alta), varichina diluita al 50%, contenitori sterili per il liquido prefiltrato, beuta del vuoto, rampa di filtrazione, pompa del vuoto, piastre di Petri sterili, parafilm, pennarello indelebile per segnare l'ID univoco del sito e la data, alcool denaturato, flambatore, pinzette varie, carta assorbente, piano di lavoro sterilizzato (es. tavolo portatile), frigo e freezer che raggiungano rispettivamente 4 °C e -20 °C.

In generale, volendo avviare nuovi rilevamenti specie specifici è utile utilizzare modelli di *occupancy* e *probability of detection* (MacKenzie et al 2002, 2004, 2017), utilizzando approcci multi-metodo (*multi-method occupancy models*, Nichols et al. 2008), che consentono di tenere conto dell'assenza di indipendenza dei rilevamenti all'interno di ciascuna sessione di campionamento.

Bibliografia

- Adams, C. I., Hoekstra, L. A., Muell, M. R., & Janzen, F. J. (2019). A brief review of non-avian reptile environmental DNA (eDNA), with a case study of painted turtle (*Chrysemys picta*) eDNA under field conditions. *Diversity*, 11(4), 50.
- Allan, J. D., & Castillo, M. M. (2007). *Stream Ecology: Structure and Function of Running Waters*. 2nd (ed.) Springer. *Dordrecht, The Netherlands*. 436p.
- Allan, E.A., Zhang, W. G., C Lavery, A., & F Govindarajan, A. (2021). Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*, 3(2), 492-514.
- Allentoft, M. E., Collins, M., Harker, D., Haile, J., Oskam, C. L., Hale, M. L., ... & Bunce, M. (2012). The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1748), 4724-4733.
- Anderson, B. S., Hunt, J. W., Phillips, B. M., Nicely, P. A., Gilbert, K. D., de Vlaming, V., ... & Tjeerdema, R. S. (2003). Ecotoxicologic impacts of agricultural drain water in the Salinas River, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(10), 2375-2384.
- Andruszkiewicz EA, Sassoubre LM, Boehm AB. (2017). Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight. *PLoS One*; 12(9): e0185043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185043> PMID: 28915253; PubMed Central PMCID: PMC5600408.)
- Apothéloz-Perret-Gentil, L., Bouchez, A., Cordier, T., Cordonier, A., Guéguen, J., Rimet, F., ... & Pawlowski, J. (2021). Monitoring the ecological status of rivers with diatom eDNA metabarcoding: A comparison of taxonomic markers and analytical approaches for the inference of a molecular diatom index. *Molecular Ecology*, 30(13), 2959-2968.
- Balasingham, K. D., Walter, R. P., & Heath, D. D. (2017). Residual eDNA detection sensitivity assessed by quantitative real-time PCR in a river ecosystem. *Molecular Ecology Resources*, 17(3), 523-532.
- Basso, A., Paolini, V., Ghia, D., Fea, G., Toson, M., & Pretto, T. (2023). Cuticular Swabs and eDNA as Non-Invasive Sampling Techniques to Monitor *Aphanomyces astaci* in Endangered White-Clawed Crayfish (*Austroptamobius pallipes* Complex). *Diversity*, 15(2), 279.
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation genetics*, 17(1), 1-17.
- Bessey, C., Jarman, S. N., Simpson, T., Miller, H., Stewart, T., Keesing, J. K., & Berry, O. (2021). Passive eDNA collection enhances aquatic biodiversity analysis. *Communications biology*, 4(1), 1-12.
- Bista, I., Carvalho, G. R., Walsh, K., Seymour, M., Hajibabaei, M., Lallias, D., ... & Creer, S. (2017). Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. *Nature communications*, 8(1), 14087.
- Bochove, van K., Bakker, F. T., Beentjes, K. K., Hemerik, L., Vos, R. A., & Gravendeel, B. (2020). Organic matter reduces the amount of detectable environmental DNA in freshwater. *Ecology and Evolution*, 10(8), 3647-3654.
- Bohara, K., Yadav, A. K., & Joshi, P. (2022). Detection of fish pathogens in freshwater aquaculture using eDNA methods. *Diversity*, 14(12), 1015.
- Braid, M. D., Daniels, L. M., & Kitts, C. L. (2003). Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. *Journal of microbiological methods*, 52(3), 389-393.

- Brannelly, L.A., Wetzel, D.P., Ohmer, M.E.B. et al. Evaluating environmental DNA as a tool for detecting an amphibian pathogen using an optimized extraction method. *Oecologia* 194, 267–281 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04743-4>
- Broadhurst, H. A., Gregory, L. M., Bleakley, E. K., Perkins, J. C., Lavin, J. V., Bolton, P., ... & McDevitt, A. D. (2021). Mapping differences in mammalian distributions and diversity using environmental DNA from rivers. *Science of the Total Environment*, 801, 149724.
- Bruce, K., Blackman, R. C., Bourlat, S. J., Hellström, M., Bakker, J., Bista, I., ... & Deiner, K. (2021). *A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment*. Pensoft Advanced Books.
- Brys, R., Haegeman, A., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Staelens, A., Auwerx, J., & Ruttink, T. (2021). Monitoring of spatiotemporal occupancy patterns of fish and amphibian species in a lentic aquatic system using environmental DNA. *Molecular ecology*, 30(13), 3097-3110.
- Buxton, A. S., Groombridge, J. J., & Griffiths, R. A. (2017). Is the detection of aquatic environmental DNA influenced by substrate type?. *PLoS One*, 12(8), e0183371.
- Bylemans, J., Furlan, E. M., Gleeson, D. M., Hardy, C. M., & Duncan, R. P. (2018). Does size matter? An experimental evaluation of the relative abundance and decay rates of aquatic environmental DNA. *Environmental Science & Technology*, 52(11), 6408-6416.
- Capo, E., Spong, G., Königsson, H., & Byström, P. (2020). Effects of filtration methods and water volume on the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) eDNA concentrations via droplet digital PCR. *Environmental DNA*, 2(2), 152-160.
- Carraro, L., Stauffer, J. B., & Altermatt, F. (2021). How to design optimal eDNA sampling strategies for biomonitoring in river networks. *Environmental DNA*, 3(1), 157-172.
- Champlot, S., Berthelot, C., Pruvost, M., Bennett, E. A., Grange, T., & Geigl, E. M. (2010). An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications. *PloS one*, 5(9), e13042.
- Civade, R., Dejean, T., Valentini, A., Roset, N., Raymond, J. C., Bonin, A., ... & Pont, D. (2016). Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. *PloS one*, 11(6), e0157366.
- Curtis, A. N., & Larson, E. R. (2020). No evidence that crayfish carcasses produce detectable environmental DNA (eDNA) in a stream enclosure experiment. *PeerJ*, 8, e9333.
- Curtis, A. N. (2022). *Rockin' in the eDNA world: Testing and applying environmental DNA (eDNA) for applied ecology and conservation* (Doctoral dissertation).
- Curtis, A. N., Tiemann, J. S., Douglass, S. A., Davis, M. A., & Larson, E. R. (2021). High stream flows dilute environmental DNA (eDNA) concentrations and reduce detectability. *Diversity and Distributions*, 27(10), 1918-1931.
- Deiner, K., & Altermatt, F. (2014). Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PloS one*, 9(2), e88786.
- Deiner, K., Walser, J. C., Mächler, E., & Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological conservation*, 183, 53-63.
- Deiner, K., Fronhofer, E. A., Mächler, E., Walser, J. C., & Altermatt, F. (2016). Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nature communications*, 7(1), 12544.
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., & Miaud, C. (2011). Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PloS one*, 6(8), e23398.

- Díaz, C., Wege, F. F., Tang, C. Q., Crampton-Platt, A., Rüdell, H., Eilebrecht, E., & Koschorreck, J. (2020). Aquatic suspended particulate matter as source of eDNA for fish metabarcoding. *Scientific Reports*, 10(1), 1-8.
- Diffey, B. L. (2002). Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, 28(1), 4-13.
- Di Muri, C., Handley, L. L., Bean, C. W., Li, J., Peirson, G., Sellers, G. S., ... & Hänfling, B. (2020). Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. *BioRxiv*, 2020-07.
- Dudgeon, D. (2002). The most endangered ecosystems in the world? Conservation of riverine biodiversity in Asia. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 28(1), 59-68.
- Dunker, K. J., Sepulveda, A. J., Massengill, R. L., Olsen, J. B., Russ, O. L., Wenburg, J. K., & Antonovich, A. (2016). Potential of environmental DNA to evaluate northern pike (*Esox lucius*) eradication efforts: an experimental test and case study. *PLoS one*, 11(9), e0162277.
- Eichmiller, J. J., Bajer, P. G., & Sorensen, P. W. (2014). The relationship between the distribution of common carp and their environmental DNA in a small lake. *PLoS one*, 9(11), e112611.
- Eichmiller, J. J., Best, S. E., & Sorensen, P. W. (2016a). Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. *Environmental science & technology*, 50(4), 1859-1867.
- Eichmiller, J. J., Miller, L. M., & Sorensen, P. W. (2016b). Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular ecology resources*, 16(1), 56-68.
- Erickson, R. A., Merkes, C. M., & Mize, E. L. (2019). Sampling designs for landscape-level eDNA monitoring programs. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 15(5), 760-771.
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*, 4(4), 423-425.
- Furlan, E. M., Gleeson, D., Hardy, C. M., & Duncan, R. P. (2016). A framework for estimating the sensitivity of eDNA surveys. *Molecular ecology resources*, 16(3), 641-654.
- Geerts, A. N., Boets, P., Van den Heede, S., & Goethals, P. (2018). A search for standardized protocols to detect alien invasive crayfish based on environmental DNA (eDNA): A lab and field evaluation. *Ecological Indicators*, 84, 564-572.
- Ghosal, R., Eichmiller, J. J., Witthuhn, B. A., & Sorensen, P. W. (2018). Attracting Common Carp to a bait site with food reveals strong positive relationships between fish density, feeding activity, environmental DNA, and sex pheromone release that could be used in invasive fish management. *Ecology and Evolution*, 8(13), 6714-6727.
- Godar, D. E. (2005). UV doses worldwide. *Photochemistry and photobiology*, 81(4), 736-749.
- Goldberg, C. S., Strickler, K. M., & Pilliod, D. S. (2015). Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 183, 1-3.
- Goldberg, C. S., C. R. Turner, K. Deiner, K. E. Klymus, P. F. Thomsen, M. A. Murphy, S. F. Spear, A. McKee, S. J. Oyler-McCance, and R. S. Cornman (2016) Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution* 11: 1299–1307.
- Goldberg, C. S., Strickler, K. M., & Fremier, A. K. (2018). Degradation and dispersion limit environmental DNA detection of rare amphibians in wetlands: Increasing efficacy of sampling designs. *Science of the Total Environment*, 633, 695-703.
- Gutiérrez-Cacciabue, D., Cid, A. G., & Rajal, V. B. (2016). How long can culturable bacteria and total DNA persist in environmental waters? The role of sunlight and solid particles. *Science of the Total Environment*, 553, 100-107.

Environment, 539, 494-502.

Häder, D. P., Kumar, H. D., Smith, R. C., & Worrest, R. C. (2003). Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2(1), 39-50.

Hänfling, B., Lawson Handley, L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., ... & Winfield, I. J. (2016). Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular ecology*, 25(13), 3101-3119.

Harrison, J. B., Sunday, J. M., & Rogers, S. M. (2019). Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1915), 20191409.

He, X., Chen, H., Shi, W., Cui, Y., & Zhang, X. X. (2015). Persistence of mitochondrial DNA markers as fecal indicators in water environments. *Science of The Total Environment*, 533, 383-390.

Hinlo, R., Gleeson, D., Lintermans, M., & Furlan, E. (2017). Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS one*, 12(6), e0179251.

Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., & Fach, P. (2004). Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of clinical microbiology*, 42(5), 1863-1868.

Hosler, D. M. (2017). Where is the body? Dreissenid mussels, raw water testing, and the real value of environmental DNA. *Management of Biological Invasions*, 8(3).

Iversen, L. L., Kielgast, J., & Sand-Jensen, K. (2015). Monitoring of animal abundance by environmental DNA—An increasingly obscure perspective: A reply to Klymus et al., 2015. *Biological Conservation*, 100(192), 479-480.

Jamwal, P. S., Bruno, A., Galimberti, A., Magnani, D., Krupa, H., Casiraghi, M., & Loy, A. (2021). First assessment of eDNA-based detection approach to monitor the presence of Eurasian otter in southern Italy. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 32(2), 176-181.

Jane, S. F., Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Schwartz, M. K., Lowe, W. H., Letcher, B. H. & Whiteley A. R. (2014). Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources*, 15(1), 216-227.

Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2011). "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation letters*, 4(2), 150-157.

Jerde, C. L., Olds, B. P., Shogren, A. J., Andruszkiewicz, E. A., Mahon, A. R., Bolster, D., & Tank, J. L. (2016). Influence of stream bottom substrate on retention and transport of vertebrate environmental DNA. *Environmental science & technology*, 50(16), 8770-8779.

Jo, T., Murakami, H., Masuda, R., Sakata, M. K., Yamamoto, S., & Minamoto, T. (2017). Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), e25-e33.

Jo, T., Arimoto, M., Murakami, H., Masuda, R., & Minamoto, T. (2019a). Particle size distribution of environmental DNA from the nuclei of marine fish. *Environmental science & technology*, 53(16), 9947-9956.

Jo, T., Murakami, H., Yamamoto, S., Masuda, R., & Minamoto, T. (2019b). Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and evolution*, 9(3), 1135-1146.

Jo, T., Murakami, H., Masuda, R., & Minamoto, T. (2020). Selective collection of long fragments of environmental DNA using larger pore size filter. *Science of the Total Environment*, 735, 139462.

- Jo, T., Arimoto, M., Murakami, H., Masuda, R., & Minamoto, T. (2020). Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass. *Environmental DNA*, 2(2), 140-151.
- Jo, T.S. (2023). A higher DNA damage rate in aqueous eDNA particles suggests intra-cellular eDNA degradation in cellular environments. *Environmental DNA*, 5(2), 343-349.
- Joseph, C., Faiq, M. E., Li, Z., & Chen, G. (2022). Persistence and degradation dynamics of eDNA affected by environmental factors in aquatic ecosystems. *Hydrobiologia*, 849(19), 4119-4133.
- Kakuda, A., Doi, H., Souma, R., Nagano, M., Minamoto, T., & Katano, I. (2019). Environmental DNA detection and quantification of invasive red-eared sliders, *Trachemys scripta elegans*, in ponds and the influence of water quality. *PeerJ*, 7, e8155.
- Kamoroff, C., & Goldberg, C. S. (2018). An issue of life or death: using eDNA to detect viable individuals in wilderness restoration. *Freshwater Science*, 37(3), 685-696.
- Kemp, B. M., & Smith, D. G. (2005). Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic science international*, 154(1), 53-61.
- Kéry, M., and B. Schmidt (2008) Imperfect detection and its consequences for monitoring in conservation. *Community Ecology* 9: 207–216.
- Khanna, M., & Stotzky, G. (1992). Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1930-1939.
- King, A. C., Krieg, R., Weston, A., & Zenker, A. K. (2022). Using eDNA to simultaneously detect the distribution of native and invasive crayfish within an entire country. *Journal of Environmental Management*, 302, 113929.
- Kirk, J. T. O. (1994). Optics of UV-B radiation in natural waters. *Ergeb. Limnol. Oceanogr.*, 43, 1-16.
- Klymus, K. E., Richter, C. A., Chapman, D. C., & Paukert, C. (2015). Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological conservation*, 183, 77-84.
- Kluever, B. M., Avery, M. L., Gawlik, D. E., Hall, P., Humphrey, J. S., Pernas, T., & Ridgley, F. (2023). Eradication of African sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*) from South Florida, USA: a collaborative early detection and rapid response case study. *Management of Biological Invasions*, 14(1), 123.
- Kumar, G., Eble, J. E., & Gaither, M. R. (2020). A practical guide to sample preservation and pre-PCR processing of aquatic environmental DNA. *Molecular ecology resources*, 20(1), 29-39.
- Lacoursière-Roussel, A., Rosabal, M., & Bernatchez, L. (2016). Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular ecology resources*, 16(6), 1401-1414.
- Lam, I. P., Sung, Y. H., Lin, L., & Fong, J. J. (2020). Developing quantitative PCR assays to detect threatened and invasive freshwater turtles in Hong Kong using environmental DNA. *Conservation genetics resources*, 12, 293-300.
- Lance, R. F., Klymus, K. E., Richter, C. A., Guan, X., Farrington, H. L., Carr, M. R., ... & Baerwaldt, K. L. (2017). Experimental observations on the decay of environmental DNA from bighead and silver carps. *Management of Biological Invasions*, 8(3).
- Lawson Handley, L., Read, D. S., Winfield, I. J., Kimbell, H., Johnson, H., Li, J., ... & Hänfling, B. (2019). Temporal and spatial variation in distribution of fish environmental DNA in England's largest lake. *Environmental DNA*, 1(1), 26-39.

- Levi, T., Allen, J. M., Bell, D., Joyce, J., Russell, J. R., Tallmon, D. A., ... Yu, D. W. (2019). Environmental DNA for the enumeration and management of Pacific salmon. *Molecular Ecology Resources*, 19, 597–608.
- Li, J., Lawson Handley, L. J., Read, D. S., & Hänfling, B. (2018). The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 18(5), 1102-1114.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *nature*, 362(6422), 709-715.
- Littlefair, J. E., Hrenchuk, L. E., Blanchfield, P. J., Rennie, M. D., & Cristescu, M. E. (2021). Thermal stratification and fish thermal preference explain vertical eDNA distributions in lakes. *Molecular Ecology*, 30(13), 3083-3096.
- Longmire, J. L., Baker, R. J., & Maltbie, M. (1997). Use of " lysis buffer" in DNA isolation and its implication for museum collections. (*No Title*).
- Loy A., Giovacchini S., Bruno A., Ramazzotti F., Di Febbraro M., Jamwal P., Krupa H., Melchionna M., Mirone E., Monaco P., Caprotti L., Galimberti A. 2023. Implementazione di un protocollo di rilevamento multispecifico e sorveglianza di specie di interesse unionale nelle acque dolci del Lazio attraverso DNA ambientale e modelli di connettività. Rapporto intermedio. P.S.R. 2014/2020 – Operazione 7.6.1 Studi e investimenti finalizzati alla tutela dell’ambiente e del patrimonio culturale e alla conservazione della biodiversità. Relazione conclusive
- Macher, J. N., & Leese, F. (2018). eDNA metabarcoding of rivers: Is all eDNA everywhere, all the time?. In *ECCB2018: 5th European Congress of Conservation Biology. 12th-15th of June 2018, Jyväskylä, Finland*. Open Science Centre, University of Jyväskylä.
- Mächler, E., Deiner, K., Spahn, F., & Altermatt, F. (2016). Fishing in the water: effect of sampled water volume on environmental DNA-based detection of macroinvertebrates. *Environmental science & technology*, 50(1), 305-312.
- Mächler, E., Osathanukul, M., & Altermatt, F. (2018). Shedding light on eDNA: neither natural levels of UV radiation nor the presence of a filter feeder affect eDNA-based detection of aquatic organisms. *PLoS one*, 13(4), e0195529.
- MacKenzie, D. I., J. D. Nichols, B. L. Gideon, S. Droege, J. A. Royle, and C. A. Langtimm (2002) Estimating site occupancy rates when detection probabilities are less than one. *Ecology* 83: 2248–2255.
- MacKenzie, D. I., and L. L. Bailey (2004) Assessing the fit of site-occupancy models. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 9: 300–318.
- MacKenzie, D. I., J. D. Nichols, J. A. Royle, K. H. Pollock, L. Bailey, and J. E. Hines (2017) *Occupancy estimation and modeling: inferring patterns and dynamics of species occurrence*. Second edition. Academic Press, Boston, Massachusetts, USA.
- MacIntyre, S., & Melack, J. M. (1995). Vertical and horizontal transport in lakes: linking littoral, benthic, and pelagic habitats. *Journal of the North American Benthological Society*, 14(4), 599-615.
- Mahmoudi, N., Slater, G. F., & Fulthorpe, R. R. (2011). Comparison of commercial DNA extraction kits for isolation and purification of bacterial and eukaryotic DNA from PAH-contaminated soils. *Canadian journal of microbiology*, 57(8), 623-628.
- Majaneva, M., Diserud, O. H., Eagle, S. H., Boström, E., Hajibabaei, M., & Ekrem, T. (2018). Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Scientific reports*, 8(1), 4682.
- Manfrin, C., Zanetti, M., Stanković, D., Fattori, U., Bertucci-Maresca, V., Giulianini, P. G., & Pallavicini, A. (2022). Detection of the endangered stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) and its congeneric *A. pallipes* in its last Italian biotope by eDNA analysis. *Diversity*, 14(3), 205.
- Martellini, A., Payment, P., & Villemur, R. (2005). Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate

human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water research*, 39(4), 541-548.

Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M., & Minamoto, T. (2014). The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. *PLoS one*, 9(12), e114639.

Mauvisseau, Q., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Burian, A., & Brys, R. (2021). Effects of preservation strategies on environmental DNA detection and quantification using ddPCR. *Environmental DNA*, 3(4), 815-822.

McClenaghan, B., Fahner, N., Cote, D., Chawarski, J., McCarthy, A., Rajabi, H., ... & Hajibabaei, M. (2020). Harnessing the power of eDNA metabarcoding for the detection of deep-sea fishes. *PLoS One*, 15(11), e0236540.

McKee, A. M., Spear, S. F., & Pierson, T. W. (2015). The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples. *Biological Conservation*, 183, 70-76.

Matsui, K., Honjo, M., & Kawabata, Z. (2001). Estimation of the fate of dissolved DNA in thermally stratified lake water from the stability of exogenous plasmid DNA. *Aquatic Microbial Ecology*, 26(1), 95-102.

Minamoto, T., Naka, T., Moji, K., & Maruyama, A. (2016). Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction. *Limnology*, 17, 23-32.

Minamoto, T., Miya, M., Sado, T., Seino, S., Doi, H., Kondoh, M., ... & Uchii, K. (2021). An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA*, 3(1), 8-13.

Moushomi, R., Wilgar, G., Carvalho, G., Creer, S., & Seymour, M. (2019). Environmental DNA size sorting and degradation experiment indicates the state of *Daphnia magna* mitochondrial and nuclear eDNA is subcellular. *Scientific Reports*, 9(1), 12500.

Muha, T. P., Robinson, C. V., Garcia de Leaniz, C., & Consuegra, S. (2019). An optimised eDNA protocol for detecting fish in lentic and lotic freshwaters using a small water volume. *PLoS One*, 14(7), e0219218.

Nguyen, T. H.; Elimelech, M. Plasmid DNA adsorption on silica: Kinetics and conformational changes in monovalent and divalent salts. *Biomacromolecules* 2007, 8 (1), 24–32.

Nguyen, T. H.; Elimelech, M. Adsorption of plasmid DNA to a natural organic matter-coated silica surface: Kinetics, conformation, and reversibility. *Langmuir* 2007, 23 (6), 3273–3279. *Environmental Science & Technology Article* 9331

Nguyen, T. H.; Chen, K. L.; Elimelech, M. Adsorption kinetics and reversibility of linear plasmid DNA on silica surfaces: Influence of alkaline earth and transition metal ions. *Biomacromolecules* 2010, 11 (5), 1225–1230.

Nichols, J. D., L. L. Bailey, A. F. O'Connell, Jr., N. W. Talancy, E. H. Campbell Grant, A. T. Gilbert, E. M. Annand, T. P. Husband, and J. E. Hines (2008) Multi-scale occupancy estimation and modelling using multiple detection methods. *Journal of Applied Ecology* 45: 1321–1329.

Nukazawa, K., Akahoshi, K., & Suzuki, Y. (2020). Are bacteria potential sources of fish environmental DNA?. *Plos one*, 15(3), e0230174.

Ogram, A., Sayler, G. S., & Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods*, 7(2-3), 57-66.

Osman, O. A., Andersson, J., Martin Sanchez, P. M., & Eiler, A. (2022). National eDNA-based monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian species in Norway. *Metabarcoding and Metagenomics*, 6, 305-317.

Pearman, J. K., Keeley, N. B., Wood, S. A., Laroche, O., Zaiko, A., Thomson-Laing, G., ... & Pochon, X. (2020).

Comparing sediment DNA extraction methods for assessing organic enrichment associated with marine aquaculture. *PeerJ*, 8, e10231.

Pedersen, M. W., Overballe-Petersen, S., Ermini, L., Sarkissian, C. D., Haile, J., Hellstrom, M., ... & Willerslev, E. (2015). Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1660), 20130383.

Peixoto, S., Chaves, C., Velo-Antón, G., Beja, P., & Egeter, B. (2021). Species detection from aquatic eDNA: Assessing the importance of capture methods. *Environmental DNA*, 3(2), 435-448.

Piaggio, A. J., Engeman, R. M., Hopken, M. W., Humphrey, J. S., Keacher, K. L., Bruce, W. E., & Avery, M. L. (2014). Detecting an elusive invasive species: A diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Molecular ecology resources*, 14(2), 374-380.

Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2013). Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(8), 1123-1130.

Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, Waits (2014). Factors influencing detection of eDNA from a streamdwelling amphibian. *Mol Ecol Resour.*; 14(1): 109-16. Epub 2013/09/17. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12159> PMID: 24034561.).

Pilliod, D. S., Laramie, M. B., MacCoy, D., & Maclean, S. (2019). Integration of eDNA-based biological monitoring within the US Geological Survey's National Streamgauge Network. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 55(6), 1505-1518.

Pont, D., Valentini, A., Rocle, M., Maire, A., Delaigue, O., Jean, P., & Dejean, T. (2021). The future of fish-based ecological assessment of European rivers: from traditional EU Water Framework Directive compliant methods to eDNA metabarcoding-based approaches. *Journal of fish biology*, 98(2), 354-366.

Pont, D., Rocle, M., Valentini, A., Civade, R., Jean, P., Maire, A., ... & Dejean, T. (2018). Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific reports*, 8(1), 10361.

Poté, J., Ackermann, R., & Wildi, W. (2009). Plant leaf mass loss and DNA release in freshwater sediments. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(5), 1378-1383.

Pourmoghadam, M. N., Poorbagher, H., de Oliveira Fernandes, J. M., & Jafari, O. (2019). Diazinon negatively affects the integrity of environmental DNA stability: a case study with common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental monitoring and assessment*, 191, 1-6.

Randall, L. A., Goldberg, C. S., & Moehenschlager, A. (2023). Environmental DNA surveys can underestimate amphibian occupancy and overestimate detection probability: implications for practice. *The Journal of Wildlife Management*, 87(7), e22463.

Ravanat, J. L., Douki, T., & Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1-3), 88-102.

Rawlence, N. J., Lowe, D. J., Wood, J. R., Young, J. M., Churchman, G. J., HUANG, Y. T., & Cooper, A. (2014). Using palaeoenvironmental DNA to reconstruct past environments: progress and prospects. *Journal of Quaternary Science*, 29(7), 610-626.

Rees, H. C., B. C. Maddison, D. J. Middleditch, J. R. Patmore, and K. C. Gough. 2014. The detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology* 51: 1450–1459.

Rondinini, C., Battistoni, A., Teofili, C. (compilatori) 2022. Lista Rossa IUCN dei vertebrati italiani 2022. Comitato Italiano IUCN e Ministero dell'Ambiente e della Sicurezza Energetica, Roma.

- Rusch, J., Mojžišová, M., Strand, D., Svobodová, J., Vrålstad, T., & Petrusek, A. (2020). Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe.
- Saito, T., & Doi, H. (2021). A model and simulation of the influence of temperature and amplicon length on environmental DNA degradation rates: a meta-analysis approach. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *9*, 623831.
- Sakata, M. K., Yamamoto, S., Gotoh, R. O., Miya, M., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2020). Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. *Environmental DNA*, *2*(4), 505-518.
- Sales, N. G., McKenzie, M. B., Drake, J., Harper, L. R., Browett, S. S., Coscia, I., ... & McDevitt, A. D. (2020a). Fishing for mammals: Landscape-level monitoring of terrestrial and semi-aquatic communities using eDNA from riverine systems. *Journal of Applied Ecology*, *57*(4), 707-716.
- Sales, N. G., Kaizer, M. D. C., Coscia, I., Perkins, J. C., Highlands, A., Boubli, J. P., ... & Mcdevitt, A. D. (2020b). Assessing the potential of environmental DNA metabarcoding for monitoring Neotropical mammals: a case study in the Amazon and Atlantic Forest, Brazil. *Mammal Review*, *50*(3), 221-225.
- Salter, I., Joensen, M., Kristiansen, R., Steingrund, P., & Vestergaard, P. (2019). Environmental DNA concentrations are correlated with regional biomass of Atlantic cod in oceanic waters. *Communications Biology*, *2*(1), 461.
- Sanches, T. M., & Schreier, A. D. (2020). Optimizing an eDNA protocol for estuarine environments: Balancing sensitivity, cost and time. *Plos one*, *15*(5), e0233522.
- Santas, A. J., Persaud, T., Wolfe, B. A., & Bauman, J. M. (2013). Noninvasive method for a statewide survey of eastern hellbenders *Cryptobranchus alleganiensis* using environmental DNA. *International Journal of Zoology*, 2013.
- Sassoubre, L. M., Yamahara, K. M., Gardner, L. D., Block, B. A., & Boehm, A. B. (2016). Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish. *Environmental science & technology*, *50*(19), 10456-10464.
- Schabacker, J. C., Amish, S. J., Ellis, B. K., Gardner, B., Miller, D. L., Rutledge, E. A., ... & Luikart, G. (2020). Increased eDNA detection sensitivity using a novel high-volume water sampling method. *Environmental DNA*, *2*(2), 244-251.
- Schmidt, K. J., Soluk, D. A., Maestas, S. E. M., & Britten, H. B. (2021a). Persistence and accumulation of environmental DNA from an endangered dragonfly. *Scientific Reports*, *11*(1), 1-8.
- Schmidt, B. C., Spear, S. F., Tomi, A., & Bodinof Jachowski, C. M. (2021b). Evaluating the efficacy of environmental DNA (eDNA) to detect an endangered freshwater mussel *Lasmigona decorata* (Bivalvia: Unionidae). *Freshwater Science*, *40*(2), 354-367.
- Sellers, G. S., Di Muri, C., Gómez, A., & Hänfling, B. (2018). Mu-DNA: a modular universal DNA extraction method adaptable for a wide range of sample types. *Metabarcoding and Metagenomics*, *2*, e24556.
- Seymour, M., Durance, I., Cosby, B. J., Ransom-Jones, E., Deiner, K., Ormerod, S. J., ... & Creer, S. (2018). Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications biology*, *1*(1), 4.
- Sepulveda, A. J., Schabacker, J., Smith, S., Al-Chokhachy, R., Luikart, G., & Amish, S. J. (2019). Improved detection of rare, endangered and invasive trout in using a new large-volume sampling method for eDNA capture. *Environmental DNA*, *1*(3), 227-237.
- Shogren, A. J., Tank, J. L., Andruszkiewicz, E.A., Olds, B., Jerde, C., Bolster, D. (2016). Modelling the transport of environmental DNA through a porous substrate using continuous flow-through column experiments. *J R*

Soc Interface. 13(119):20160290. doi: 10.1098/rsif.2016.0290. PMID: 27251680; PMCID: PMC4938091.

Shogren, A. J., Tank, J. L., Andruszkiewicz, E., Olds, B., Mahon, A. R., Jerde, C. L., & Bolster, D. (2017). Controls on eDNA movement in streams: Transport, retention, and resuspension. *Scientific reports*, 7(1), 5065.

Shogren, A. J., Tank, J. L., Egan, S. P., August, O., Rosi, E. J., Hanrahan, B. R., ... & Bolster, D. (2018). Water flow and biofilm cover influence environmental DNA detection in recirculating streams. *Environmental science & technology*, 52(15), 8530-8537.

Shogren, A. J., Tank, J. L., Egan, S. P., Bolster, D., & Riis, T. (2019). Riverine distribution of mussel environmental DNA reflects a balance among density, transport, and removal processes. *Freshwater Biology*, 64(8), 1467-1479.

Smith, K. F., Wood, S. A., Mountfort, D. O., & Cary, S. C. (2012). Development of a real-time PCR assay for the detection of the invasive clam, *Corbula amurensis*, in environmental samples. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 412, 52-57.

Song, J. W., Small, M. J., & Casman, E. A. (2017). Making sense of the noise: the effect of hydrology on silver carp eDNA detection in the Chicago area waterway system. *Science of the Total Environment*, 605, 713-720.

Spens, J., Evans, A. R., Halfmaerten, D., Knudsen, S. W., Sengupta, M. E., Mak, S. S., ... & Hellström, M. (2017). Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645.

Sreedhara, A., Freed, J. D., & Cowan, J. A. (2000). Efficient inorganic deoxyribonucleases. Greater than 50-million-fold rate enhancement in enzyme-like DNA cleavage. *Journal of the American Chemical Society*, 122(37), 8814-8824.

Sreedhara, A., & Cowan, J. A. (2001). Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 6, 337-347.

Staley, Z. R., Chuong, J. D., Hill, S. J., Grabuski, J., Shokralla, S., Hajibabaei, M., & Edge, T. A. (2018). Fecal source tracking and eDNA profiling in an urban creek following an extreme rain event. *Scientific reports*, 8(1), 14390.

Stewart, K. A., & Taylor, S. A. (2020). Leveraging eDNA to expand the study of hybrid zones. *Molecular Ecology*, 29(15), 2768-2776.

Strickler, K. M., Fremier, A. K., & Goldberg, C. S. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85-92.

Stewart, K. A. (2019) Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodiversity and Conservation* 28: 983–1001.

Sun, M., Guo, Y., Zhao, N., Zhang, S., Pei, K., & Qin, C. (2022). Fish eDNA detection and its technical optimization: A case study of *Acanthopagrus latus*. *Marine Environmental Research*, 176, 105588.

Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, E. (2018). *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring*. Oxford University Press.

Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., & Kawabata, Z. I. (2012). Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PloS one*, 7(4), e35868.

Takasaki K, Aihara H, Imanaka T, Matsudaira T, Tsukahara K, Usui A, et al. (2021). Water pre-filtration methods to improve environmental DNA detection by real-time PCR and metabarcoding. *PLoS ONE* 16(5): e0250162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250162>

Takahashi, S., Sakata, M. K., Minamoto, T., & Masuda, R. (2020). Comparing the efficiency of open and enclosed filtration systems in environmental DNA quantification for fish and jellyfish. *PloS one*, 15(4),

e0231718

TES (2019). Environmental DNA Sampling and Experiment Manual Version 2.1 (published April 25, 2019). The eDNA Society, Edna Methods Standardization Committee.

Thalinger, B., Rieder, A., Teuffenbach, A., Pütz, Y., Schwerte, T., Wanzenböck, J., & Traugott, M. (2021). The effect of activity, energy use, and species identity on environmental DNA shedding of freshwater fish. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *9*, 623718.

Thomas, A. C., Howard, J., Nguyen, P. L., Seimon, T. A., & Goldberg, C. S. (2018). eDNA Sampler: A fully integrated environmental DNA sampling system. *Methods in ecology and evolution*, *9*(6), 1379-1385.

Thomas, A. C., Nguyen, P. L., Howard, J., & Goldberg, C. S. (2019). A self-preserving, partially biodegradable eDNA filter. *Methods in Ecology and Evolution*, *10*(8), 1136-1141.

Thomsen, P. F., Kielgast, J. O. S., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., ... & Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology*, *21*(11), 2565-2573.

Tillotson, M. D., Kelly, R. P., Duda, J. J., Hoy, M., Kralj, J., & Quinn, T. P. (2018). Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation*, *220*, 1-11.

Torti, A., Lever, M. A., & Jørgensen, B. B. (2015). Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments. *Marine genomics*, *24*, 185-196.

Tréguier, A., Paillisson, J. M., Dejean, T., Valentini, A., Schlaepfer, M. A., & Roussel, J. M. (2014). Environmental DNA surveillance for invertebrate species: Advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *P. rocambarus clarkii* in freshwater ponds. *Journal of Applied Ecology*, *51*(4), 871-879.

Tsai, Y. L., & Olson, B. H. (1992). Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Applied and environmental microbiology*, *58*(2), 754-757.

Tsuji, S., Ushio, M., Sakurai, S., Minamoto, T., & Yamanaka, H. (2017). Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLoS One*, *12*(4), e0176608.

Tsuji, S., Takahara, T., Doi, H., Shibata, N., & Yamanaka, H. (2019). The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, *1*(2), 99-108.

Tumolo M, Ancona V, Losacco D, Uricchio VF, De Paola D (2021) Optimized protocol proposal to extract eDNA from oligotrophic and degraded water samples. ARPHA Conference Abstracts 4: e64814.

Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C., Jones, S. E., Jerde, C. L., & Lodge, D. M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, *5*(7), 676-684.

Turner, C. R., Uy, K. L., & Everhart, R. C. (2015). Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, *183*, 93-102.

Unnithan, V. V., Unc, A., Joe, V., & Smith, G. B. (2014). Short RNA indicator sequences are not completely degraded by autoclaving. *Scientific Reports*, *4*(1), 4070.

Uthicke, S., Robson, B., Doyle, J. R., Logan, M., Pratchett, M. S., & Lamare, M. (2022). Developing an effective marine eDNA monitoring: eDNA detection at pre-outbreak densities of corallivorous seastar (*Acanthaster cf. solaris*). *Science of the Total Environment*, *851*, 158143.

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., ... & Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular ecology*, *25*(4), 929-942.

- Villacorta-Rath, C., Hoskin, C. J., Strugnell, J. M., & Burrows, D. (2021). Long distance (> 20 km) downstream detection of endangered stream frogs suggests an important role for eDNA in surveying for remnant amphibian populations. *PeerJ*, 9, e12013.
- Xing, Y., Gao, W., Shen, Z., Zhang, Y., Bai, J., Cai, X., ... & Zhao, Y. (2022). A review of environmental DNA field and laboratory protocols applied in fish ecology and environmental health. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 725360.
- Webster, J. R., Benfield, E. F., Golladay, S. W., Hill, B. H., Hornick, L. E., Kazmierczak Jr, R. F., & Perry, W. B. (1987). Experimental studies of physical factors affecting seston transport in streams 1. *Limnology and oceanography*, 32(4), 848-863.
- Wegleitner, B. J., Jerde, C. L., Tucker, A., Chadderton, W. L., & Mahon, A. R. (2015). Long duration, room temperature preservation of filtered eDNA samples. *Conservation Genetics Resources*, 7, 789-791.
- Wei, N., Nakajima, F., & Tobino, T. (2019). Variation of environmental DNA in sediment at different temporal scales in nearshore area of Tokyo Bay. *Journal of Water and Environment Technology*, 17(3), 153-162.
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Lowe, W. H., & Schwartz, M. K. (2015). Environmental DNA particle size distribution from Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *Conservation Genetics Resources*, 7, 639-641.
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Sepulveda, A. J., Shepard, B. B., Jane, S. F., ... & Schwartz, M. K. (2016). Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation*, 194, 209-216.
- Wilcox, T. M., Young, M. K., McKelvey, K. S., Isaak, D. J., Horan, D. L., & Schwartz, M. K. (2018). Fine-scale environmental DNA sampling reveals climate-mediated interactions between native and invasive trout species. *Ecosphere*, 9(11), e02500.
- Wotton, R. S., & Malmqvist, B. (2001). Feces in aquatic ecosystems: feeding animals transform organic matter into fecal pellets, which sink or are transported horizontally by currents; these fluxes relocate organic matter in aquatic ecosystems. *BioScience*, 51(7), 537-544.
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: the microbial "protective clothing" in extreme environments. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3423.