UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia

ELABORATO DI LAUREA

Applicazioni e problematiche dell'eDNA in ambiente marino

Tutor: Prof.ssa Chiara Papetti
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Carlotta Meggiato

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Sommario

Capitolo 1 5

Introduzione 5

Definizione di eDNA 5

Metodi di utilizzo dell'eDNA: *barcoding* e *metabarcoding* 6

Metodi di campionamento e procedure di laboratorio 8

Capitolo 2 12

Come viene usato l'eDNA per studiare la biodiversità nell'ambiente acquatico: casi di studio 12

Variabilità spazio-temporale del segnale dato dall'analisi dell'eDNA e relative implicazioni nel monitoraggio delle specie ittiche nei laghi (Hervé et al., 2022) 12

Limitazioni dell'analisi eDNA per le stime dell'abbondanza di *Carcinus maenas* (Danziger et al., 2022) 16

Capitolo 3 19

Difficoltà nell'utilizzo dell'eDNA 19

Persistenza e decadimento dell'eDNA 19

Degradazione dell'eDNA 21

Capitolo 4 24

Confronti tra utilizzi passati e futuri dell'eDNA 24

Proposta di utilizzo dell'eDNA in ambito ecotossicologico in ambiente marino . 27

Bibliografia 31

Capitolo 1
Introduzione

Definizione di eDNA

Il DNA o acido desossoribonucleico è una molecola composta da nucleotidi a cui è affidata la codificazione delle informazioni genetiche.
Esistono diverse sigle legate al DNA, una di questa è l'eDNA ovvero l'*enviromental DNA* (DNA ambientale).
Il termine eDNA è stato utilizzato per la prima volta da Ogram et al. nel 1987 per indicare del DNA microbico che sono riusciti ad isolare dal sedimento (Pawlowski et al., 2020).
Negli anni successivi all'esperimento di Ogram gli studi sull'eDNA sono aumentati portando così all'attuale definizione di eDNA: un pool totale di DNA isolato dall'ambiente, composto sia da DNA organico, appartenente ad individui interi vivi al momento del campionamento, che da DNA extra-organico, materiale proveniente da organismi o propagoli biologicamente attivi, ovvero, DNA non più associato al proprio organismo d'origine (Mauvisseau et al. 2022; Rodriguez-Ezpeleta et al., 2021).
Il DNA extra-organico può assumere quattro stati di forma: (i) DNA disciolto, (ii) DNA legato alle superfici di particelle sospese (Barnes at al., 2014; Harrison et al., 2019; Mauvisseau et al., 2022; Jo T. et al., 2022) e DNA ancora incapsulato o (iii) ad una cellula o (iv) ad un organello (Mauvisseau et al., 2022; Siuda & Chròst, 2000).
La distinzione dei quattro stati di forma del DNA extra-organico risulta importante per lo studio della degradazione e della persistenza dell'eDNA in ambiente acquatico.
Nella Figura 1, troviamo uno schema generale dell'ecologia dell'eDNA, tra cui la rappresentazione grafica dei suoi quattro stati di forma.

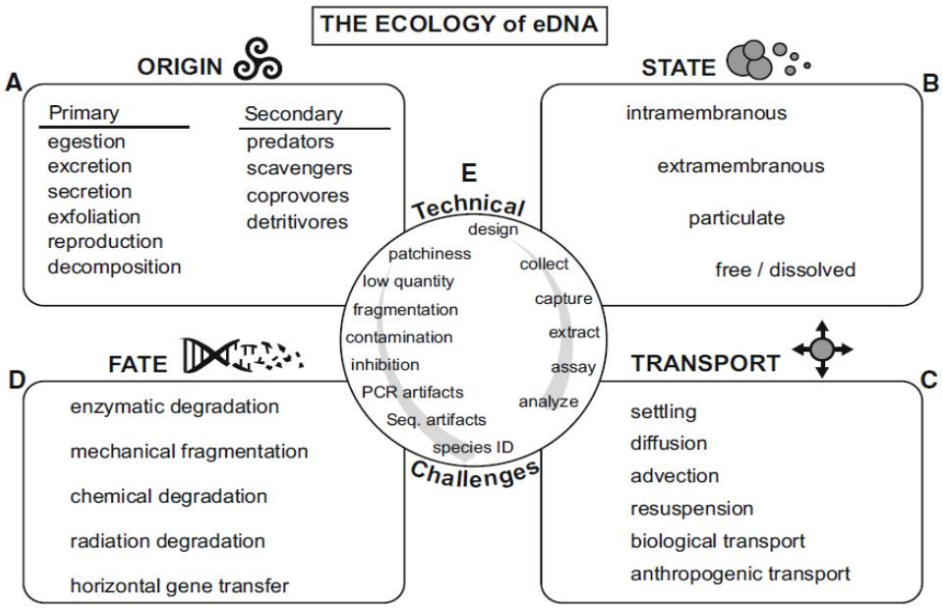

Figura 1 – Schema generale dell'ecologia dell'eDNA tratta da Barnes (2016).

Questo elaborato si focalizza principalmente sulle applicazioni e sulle problematiche dell'eDNA in ambiente marino.

Metodi di utilizzo dell'eDNA: *barcoding* e *metabarcoding*

Negli ultimi anni la biodiversità marina ha subito gravi perdite dovute alla degradazione e distruzione degli habitat, motivo per cui sono andati a svilupparsi metodi innovativi per preservarla e conservarla.
Uno di questi consiste nell'utilizzare l'eDNA per monitorare, in maniera non invasiva e non distruttiva, la biodiversità in ambiente marino.
Esistono due strategie analitiche che permettono di rilevare eDNA nell'ambiente marino: il rilevamento specie specifico dell'eDNA (*barcoding*) e il rilevamento esaustivo dell'eDNA di determinati *taxa* (*metabarcoding*) (Minamoto, 2022).
Il *barcoding* è un metodo d'analisi che si focalizza su una precisa specie d'interesse, come una specie invasiva o una specie rara.
Semplice ma costoso, il *barcoding* permette di valutare la presenza o meno di contaminazione nel campione analizzato, tramite l'utilizzo di PCR e corsa elettroforetica che evidenziano le concentrazioni di eDNA.
Il problema principale di questo metodo analitico consiste nella necessità di sviluppare dei test di rilevamento specifici per ogni specie target con il conseguente utilizzo di una notevole quantità di test e primer. Questi test

richiedono tutti la presenza di un primer, creato sulla base delle informazioni a disposizione, che verrà testato tramite test *in vitro* per assicurarne la specificità. I primer sono brevi sequenze di acidi nucleici, che vengono utilizzati in laboratorio come sequenze d'inizio e di fine delle sequenze che vengono amplificate tramite PCR.

Un'ulteriore problematica del *barcoding* consiste nel fatto che essendo specie-specifico, nel caso in cui vengano studiate più specie, i diversi passaggi del test d'analisi dovranno essere ripetuti per ciascuna specie, facendo, dunque, diventare le analisi molto lunghe e costose.

Il *metabarcoding*, invece, è un metodo d'analisi che si concentra sull'identificazione completa non più di singole specie, ma di tutte le specie presenti nell'ecosistema oggetto di studio. Questo è reso possibile inizialmente servendosi di primer universali per poter amplificare le sequenze di DNA delle specie studiate. Successivamente, vengono analizzate le sequenze amplificate tramite il metodo del sequenziamento ad alto rendimento (*High-throughput screening*, HTS, o sequenziamento di nuova generazione).

Rispetto al *barcoding*, il *metabarcoding* è un metodo d'analisi che permette di ottenere da una singola analisi numerose informazioni su più specie che abitano nell'ecosistema considerato, caratteristica vantaggiosa nell'osservazione delle dinamiche tra le diverse specie dell'ecosistema.

Il *metabarcoding* è un metodo d'analisi economicamente più dispendioso del *barcoding*. I maggiori punti di forza e debolezza di questi due metodi sono riassunti ed equiparati nella tabella sottostante della Figura 2.

Metodo analitico	**Punti di forza**	**Punti di debolezza**
Analisi specie- specifiche (eDNA *barcoding*)	Semplice e poco costoso rispetto al *metabarcoding*	I test devono essere sviluppati per ciascun target
	Sensibilità maggiore rispetto al *metabarcoding*	Informazioni disponibili in una singola analisi solamente di una singola specie
	Compatibile con i metodi quantitativi	
Analisi esaustive (eDNA *metabarcoding*)	Informazioni su più specie disponibili in una singola analisi	Lavoro intenso e costoso
	Test disponibili per una varietà di scopi	Non altamente quantitativo

Figura 2- Tabella riassuntiva dei vantaggi e svantaggi del barcoding e metabarcoding tratta da Minamoto (2022) e tradotta in italiano.

Negli ultimi anni il *barcoding* e il *metabarcoding* dell'eDNA sono stati sempre più impiegati per rilevare la collocazione degli organismi nell'ecosistema durante il processo di biomonitoraggio.
Nonostante i numerosi vantaggi, presentano alcuni svantaggi:
- la completa assenza di dati sulle dimensioni e sulla riproduzione dei diversi organismi controllati. Queste informazioni permettono di conoscere le condizioni di vita di una popolazione e ottenere fondamentali dettagli sullo stato di un ecosistema. Sapere se una specie invasiva è in fase di riproduzione oppure no, permette di adottare misure di prevenzione e di controllo delle specie aliene;
- l'inefficienza nell'individuare la presenza di ibridazioni: dato importante nella conservazione degli ecosistemi in quanto l'ibridazione può essere indice di variazioni all'interno del corredo genico della specie studiata (Minamoto, 2022).

Metodi di campionamento e procedure di laboratorio

Per poter essere studiato tramite i modelli d'analisi appena visti, l'eDNA deve essere prima campionato dall'habitat d'interesse e poi opportunamente isolato in laboratorio.
Nella Figura 3 vengono rappresentate graficamente le 7 fasi principali di selezione ed analisi dell'eDNA, dal campionamento alla scelta dei primer.

Figura 3- Rappresentazione grafica dei 7 principali punti della procedura che permetto lo studio dell'eDNA (Takahashi et al., 2023). Si rimanda al testo principale per i dettagli di ogni fase.

La prima fase consiste nel **campionamento** dell'ambiente d'interesse (*sampling,* Fig.3). Quando si campiona si deve tener conto di due elementi: il volume d'acqua campionato e la replica sul campo. L'eDNA è caratterizzato da una notevole variazione nella propria concentrazione, basata sull'abbondanza e sul tasso di dispersione dell'organismo d'interesse e sul tasso di degradazione nell'ambiente (Barnes et al., 2016; Takahashi et al., 2023).

Più elevato sarà il volume d'acqua campionato e maggiore sarà la quantità di eDNA raccolto, perché verrà filtrato più volume d'acqua. Durante questo procedimento possono emergere alcune difficoltà dovute all'intasamento dei filtri a causa di alghe o di pezzi di sedimento e, verificandosi tali condizioni, vengono filtrati meno volumi d'acqua. Se devono essere campionate specie d'interesse, la cui concentrazione di eDNA è bassa, vengono filtrati lo stesso grandi volumi d'acqua nonostante il rischio d'intasamento.

A causa della rarità di alcuni *taxa* nell'ambiente studiato, spesso, è consigliato eseguire repliche sul campo in una fase successiva alla raccolta dell'eDNA per evitare di ottenere dei risultati non del tutto veritieri, perché nel caso di *taxa* rari le concentrazioni di eDNA nei campioni possono essere in concentrazioni inferiori alla soglia minima necessaria per affrontare i test in laboratorio.

La fase successiva al campionamento coincide con la **conservazione del campione d'acqua raccolto** (*preservation*, Fig.3). Questa fase è fondamentale per preservare il DNA, poiché quest'ultimo andrà incontro ad una degradazione esponenziale causata da fattori esogeni, reazioni chimiche spontanee o per attività microbica (Takahashi et al., 2023).

Per prevenire e limitare la degradazione vengono utilizzati diversi metodi, come il filtraggio *in loco*, che permette di trasferire il DNA in filtri che verranno conservati in tamponi che andranno a stabilizzare l'eDNA, il raffreddamento, il congelamento, l'aggiunta di conservanti al campione, come l'etanolo o il cloruro di benzalconio, quest'ultimo è un agente antimicrobico (Takahashi et al., 2023).

La terza fase di questa procedura è la **raccolta del DNA** (*collection,* Fig.3). Il metodo maggiormente utilizzato per raccogliere il DNA è la filtrazione attiva attraverso una membrana tramite un meccanismo di pompaggio. Il meccanismo di pompaggio sfrutta pompe peristaltiche o pompe a vuoto, usate solitamente in

laboratorio, o pompe a batteria e filtri chiusi, usati nella raccolta *in situ*, o tramite siringhe.

Il filtraggio tramite siringhe risulta essere il metodo più utilizzato negli ultimi anni, poiché si avvale di filtri chiusi consentendo di limitare al minimo il rischio di contaminazione. Inoltre, l'uso di siringhe permette di filtrare anche piccoli volumi d'acqua e, soprattutto, questo metodo può essere usato da un più ampio bacino d'utenza, sia professionisti esperti che principianti.

Oltre alla filtrazione, per piccoli volumi d'acqua, si può ricorrere anche all'ultrafiltrazione e alla centrifugazione, che permettono di filtrare particelle di piccole dimensioni.

Per il filtraggio sono importanti anche il tipo di membrana filtrante e la dimensione dei pori. Queste ultime due caratteristiche saranno specifiche a seconda dello studio e del sito d'interesse.

Il successivo passo consiste nella **conservazione del DNA** (*preservation*, Fig.3). Per prevenirne contaminazioni e degradazione le carte filtranti con l'eDNA filtrato vengono conservate tramite alcuni sistemi:

- conservazione a freddo, all'interno di celle frigorifere, del ghiaccio, di congelatori;
- conservazione tramite l'utilizzo di etanolo al 95-100%, che però, essendo altamente infiammabile, necessita di permessi speciali per il trasporto;
- conservazione a temperatura ambiente resa possibile aggiungendo dei tamponi di lisi ai filtri con l'eDNA.

La quinta fase della procedura è l'**estrazione dell'eDNA** (*eDNA extraction*, Fig.3). Questa fase consiste nell'estrazione dell'eDNA dal campione ambientale da studiare. I metodi d'estrazione del DNA variano in efficacia a seconda dei diversi tipi di cellule e substrati del campione, rendendo la scelta del protocollo una considerazione critica quando si progetta uno studio sull'eDNA (Bruce et al., 2021; Takahashi et al., 2023).

I kit d'estrazione maggiormente usati sono i kit DNeasy B&T e PowerWater, kit commerciali costosi, ma facili da usare.

I punti da considerare prima di scegliere il giusto kit d'estrazione per un progetto sono: efficienza, affidabilità, comparabilità di un protocollo d'estrazione, costo e facilità d'uso del kit.

La sesta fase consiste nei **controlli negativi** (*negative controls*, Fig.3). I controlli negativi sono fondamentali per trovare la fonte e il livello di contaminazione all'interno dello studio.

Esistono diverse categorie di controlli negativi:

- controllo del campionamento;
- controllo senza bersaglio: acqua raccolta da un luogo noto per non avere specie bersaglio o acqua raccolta dal serbatoio prima dell'introduzione delle specie bersaglio;
- controllo della candeggina: candeggina utilizzata per pulire le apparecchiature di filtrazione;
- controllo dell'acqua di risciacquo: acqua utilizzata per pulire le apparecchiature di filtrazione dopo lo sbiancamento;
- controllo dell'estrazione: acqua pura trattata insieme a campioni effettivi;
- controlli negativi non dettagliati: i controlli sono stati effettuati, ma non sono state fornite le specifiche, ovvero il tipo di controllo (se di campionamento/ senza bersaglio/ di candeggina...) e le condizioni in cui è avvenuto il controllo (Takahashi et al., 2023).

Uno dei maggiori problemi che riguarda i controlli negativi è la mancata pubblicazione di numerosi studi che vanno incontro a contaminazione sistemica. Ciò crea difficoltà nel determinare la frequenza con cui avviene una contaminazione, quali sono i *taxa* che possono essere maggiormente soggetti a contaminazione, all'interno di quale punto del procedimento di campionamento ed analisi dell'eDNA avviene la contaminazione e come diminuire/eliminare e/o risolvere una contaminazione quando la si trova.

L'ultima fase è la **scelta dei primer** (*primers,* Fig.3). La scelta dei primer è una scelta di fondamentale importanza, perché andrà a determinare i tipi di dati che verranno analizzati dallo studio del campione di eDNA estratto.

A seconda del metodo d'analisi di *barcoding* o di *metabarcoding* utilizzato, viene scelto il tipo di primer adatto.

Capitolo 2
Come viene usato l'eDNA per studiare la biodiversità nell'ambiente acquatico: casi di studio

Nel seguente capitolo vengono descritti due esempi di utilizzo dell'eDNA come metodo di studio per la biodiversità nell'ecosistema acquatico. Il primo caso di studio si basa sull'articolo di Hervé et al. (2022): *Spatio-temporal variability of eDNA signal and its implication for fish monitoring in lakes* e descrive un esempio di utilizzo di *metabarcoding* per monitorare la biodiversità acquatica ed evidenzia la necessità di avere una strategia ottimale di campionamento dell'eDNA per poter riuscire a comprendere la variabilità spazio-temporale dello stesso.

Il secondo caso di studio si basa sull'articolo di Danziger et al. (2022): *Limitations of eDNA analysis for Carcinus maenas abundance estimations* e descrive gli esperimenti condotti da Danziger et al. (2022) per definire se l'eDNA può essere usato per determinare la biomassa del granchio invasivo *C. maenas* e se c'è una correlazione tra concentrazione dell'eDNA di *C. maenas* e la biomassa di *C. maenas.*

Variabilità spazio-temporale del segnale dato dall'analisi dell'eDNA e relative implicazioni nel monitoraggio delle specie ittiche nei laghi (Hervé et al., 2022)

Gli ecosistemi acquatici sono gli ambienti maggiormente a rischio sulla Terra, a causa di una costante ed esponenziale minaccia antropologica. Negli ultimi anni sono aumentate le leggi ambientali a tutela dell'ecosistema acquatico, al fine di proteggere la biodiversità presente e con esse anche i metodi non invasivi di monitoraggio della biodiversità. Il metodo tradizionale di biomonitoraggio prevede l'utilizzo, in ambiente lacustre, di reti da pesca a branchia *multi-mesh* (reti da pesca simili a delle tende sospese verticalmente in acqua; le cui maglie hanno una dimensione da riuscire a catturare per le branchie il pesce quando infila la testa tra le maglie della rete), regolato dal protocollo CEN (Comitato Europeo di Normazione), che definisce il numero di reti bentoniche e pelagiche da impiegare a seconda dell'area del lago e della profondità massima (Hervé et al. 2022).

Il metodo tradizionale è molto dispendioso sia dal punto di vista economico che temporale, molto selettivo nel campionamento dei *taxa* sulla base dell'abbondanza (rendendo difficile il campionamento di specie rare distribuite in modo discontinuo) e molto invasivo; da qui nasce l'esigenza di progettare nuovi metodi non invasivi di monitoraggio.

I metodi basati sull'eDNA appartengono a queste tecniche non invasive studiate: partendo dai metodi monospecifici di *barcoding*, impiegati per rilevare specie rare o specie invasive precoci, fino ad arrivare alla tecnica del *metabarcoding* dell'eDNA, che permette un monitoraggio non invasivo ed efficiente, soprattutto dal punto di vista temporale, dei diversi aspetti della biodiversità dei pesci. La comunità scientifica dispone di informazioni incomplete sulla variabilità spazio-temporale del segnale dell'eDNA, soprattutto all'interno dei sistemi lentici (acque interne poco correnti), dove l'eDNA sembra essere distribuito in modo disomogeneo sia su scala verticale che su scala orizzontale.

Comprendere meglio come varia il segnale dell'eDNA in ambito spazio-temporale permetterebbe di riuscire a creare un protocollo di campionamento per i sistemi lentici.

Hervé et al. (2022) hanno considerato tre diversi laghi come luoghi di campionamento: il bacino idrico di una diga, un lago eutrofico prealpino poco profondo ed un piccolo lago oligotrofico profondo di pianura. Hanno raccolto i campioni per le analisi da quattro zone diverse: acqua sotterranea campionata sulla riva sinistra, sulla riva destra e al centro del lago e acque profonde provenienti dagli strati inferiori del lago.

Gli obiettivi dello studio di Hervé et al. (2022) erano:

a. testare l'efficienza del *metabarcoding* dell'eDNA rispetto ai metodi convenzionali di monitoraggio (in questo caso le reti a branchia *multi-mesh* del protocollo CEN);
b. confermare che il metodo dell'eDNA consente di discriminare le comunità ittiche dei tre corpi idrici;
c. confrontare la distribuzione spaziale del segnale dell'eDNA all'interno dei laghi;
d. rilevare la potenziale variabilità temporale del segnale dell'eDNA nel corso dell'anno;

e. fornire raccomandazioni sulla strategia di campionamento, dove e quando campionare, che si può adottare per monitorare i pesci nei laghi utilizzando i metodi basati sull'eDNA (Hervé et al., 2022).

Hervé et al. (2022) hanno raccolto per ogni lago i dati di due campagne di pesca, compiute almeno a quattro anni di distanza l'una dall'altra e hanno considerato tutti i *taxa* catturati dai campionamenti, definendo così la composizione delle specie dei tre habitat rilevata con i metodi tradizionali.

Successivamente, per ogni sito, hanno effettuato otto campagne di campionamento in un anno, con una pausa di sei settimane tra le due campagne. Il lago prealpino è stato l'unico per il quale sono state eseguite solo sette campagne, poiché l'ultima è stata annullata a causa della pandemia di SARS COVID-19. Per quanto possibile gli studiosi hanno cercato di far coincidere i punti di campionamento delle campagne nel tempo.

I campioni ottenuti sono stati, successivamente, trattati seguendo la procedura di campionamento e di laboratorio descritta nel Capitolo 1, Fig.3.

Inoltre, sono state effettuate delle analisi sui profili verticali della temperatura dei tre bacini idrici da cui è emerso che il lago prealpino e il bacino idrico della diga sono risultati stratificati, mentre il lago di pianura presentava un profilo termico omogeneo, ovvero con la stessa temperatura lungo tutta la colonna d'acqua.

I risultati ottenuti dallo studio hanno confermato il potere del *metabarcoding* dell'eDNA per valutare la composizione delle specie delle comunità di pesci lacustri e hanno illustrato come il segnale dell'eDNA dei pesci varia nel tempo e nello spazio in base alle caratteristiche fisiche dei laghi e alla fauna ittica (Hervé et al., 2022).

Confrontando i risultati ottenuti dal *metabarcoding* dell'eDNA con quelli acquisiti tramite i metodi tradizionali, è stato evidenziato che l'eDNA permette di rilevare dei *taxa* che non sono stati scoperti tramite i metodi tradizionali di cattura con le reti da pesca a branchia *multi-mesh*, in aggiunta alle specie individuate con i metodi tradizionali.

È emerso però che, se le singole campagne di campionamento venissero considerate in modo indipendente, il numero di *taxa* rinvenuti con le analisi dell'eDNA sarebbe inferiore al numero di specie osservate con le reti a branchie *multi-mesh*. Questo accade soprattutto in autunno e inverno, quando sono state

registrate un numero inferiore di specie indipendentemente dalla posizione del campionamento o dal lago in cui è avvenuto, a causa del decadimento dell'eDNA. Nonostante ciò, i campionamenti con eDNA permettono di rilevare specie rare e specie con particolare ecologia o comportamento, che generalmente impediscono la loro cattura con i metodi tradizionali (Hervé et al., 2022).

Per quanto riguarda la distribuzione spaziale dell'eDNA è stata evidenziata una differenza tra i tre siti di studio.

Dai campionamenti è risultato che nei laghi poco profondi non è presente un'organizzazione spaziale, perché le loro acque vengono rimescolate spesso a causa della risospensione dei sedimenti. La risospensione dei sedimenti causa una risospensione dei nutrienti e, di conseguenza, gli organismi non riescono ad avere una distribuzione spaziale.

Per i laghi profondi, invece, il campionamento nelle acque profonde per monitorare la biodiversità nello studio viene indicato come controverso, con la necessità di approfondire i risultati ottenuti con ulteriori indagini.

I bacini idrici delle dighe, invece, risultano essere diversi rispetto ai laghi naturali, poiché la distribuzione spaziale dell'eDNA è strettamente correlata all'idrodinamica e all'idrologia delle dighe, perché solitamente sulle coste dei laghi si insediano numerose comunità diversificate ed omogenee, ma nelle dighe ciò è reso impossibile dalle continue fluttuazioni del livello dell'acqua che rendono difficile l'instaurarsi di vegetazione e la formazione di habitat omogenei.

Dal punto di vista temporale lo studio di Hervé et al. (2022) ha evidenziato che la presenza di eDNA delle specie varia a causa dell'ecologia e della fenologia delle specie: ad esempio il periodo migliore per campionare è la primavera se consideriamo le specie ittiche primaverili, mentre se consideriamo i salmoni sono meno rilevabili in questa stagione; quindi, la valutazione della biodiversità nei laghi freddi è possibile che sia meno affidabile.

Gli autori indicano che l'adattamento del campionamento in relazione ad una finestra temporale può essere considerato basandosi però su criteri ambientali definiti e anche in base all'obiettivo dello studio.

Limitazioni dell'analisi eDNA per le stime dell'abbondanza di *Carcinus maenas* (Danziger et al., 2022)

Danziger et al. (2022), dopo aver campionato e filtrato il campione, come nei metodi descritti nel Capitolo 1 Fig.3, hanno inizialmente isolato l'eDNA utilizzando il kit Qiagen DNeasy. Successivamente l'hanno amplificato tramite primer specifici e la qPCR (PCR quantitativa in tempo reale) ed, infine, hanno misurato la concentrazione totale di eDNA tramite uno spettofotometro.
Il rilevamento e la quantificazione dell'eDNA sono influenzati da diversi fattori che sono indicati collettivamente come l'ecologia dell'eDNA (Barnes & Turner, 2016 ; Danziger et al., 2022).
Questi fattori, che tengono conto della dispersione, dei tassi di degradazione e del trasporto dell'eDNA all'interno di una matrice ambientale, sono influenzati:
-dall'idrologia, come accennato nel precedente caso di studio, che va ad incidere sul trasporto dell'eDNA;
-dalla biologia dell'organismo (ad esempio capacità di movimento, comportamento, biomassa) che può influenzare i tassi di dispersione e degradazione dell'eDNA;
-dai livelli di stress che causano cambiamenti metabolici;
-da fattori biotici (enzimi e microbi) e abiotici (temperatura, salinità e raggi UV) (Danziger et al., 2022).

Lo studio di Danziger et al. (2022) ha studiato se la biomassa di *C. maenas* è correlata alla concentrazione di eDNA di *C. maenas* in un ambiente di laboratorio controllato. *Carcinus maenas* è un crostaceo invasivo diffuso in tutti gli ambienti marini del mondo ed è responsabile della distruzione di numerosi habitat (nutrendosi di qualsiasi specie, va a minare l'equilibrio degli ecosistemi) (Danziger et al., 2022).
Inoltre, lo studio ha anche l'obiettivo di capire come le caratteristiche specifiche dell'ecologia dell'eDNA, di fattori abiotici e biotici, alterino la correlazione tra le concentrazioni di eDNA di *C. maenas* e la biomassa (Danziger et al., 2022).
In questo caso particolare, visto la natura invasiva di *C. maenas*, capire la correlazione proposta tra le concentrazioni di eDNA di *C. maenas* e la biomassa

di *C. maenas*, potrebbe essere d'aiuto nella conservazione di altre specie che vivono nello stesso habitat.

Gli autori dello studio hanno evidenziato che, avendo condotto gli esperimenti in un laboratorio controllato, le analisi di eDNA non possono essere impiegate per predire in maniera rigorosa la biomassa di *C. maenas*. Hanno invitato a riprovare tali esperimenti sul campo.

Per giungere a questo esito Danziger et al. (2022) hanno testato e studiato in laboratorio gli effetti dell'attività motoria, dell'aggressività e del decadimento degli organismi morti sul rilascio di eDNA di *C. maenas*, giungendo alle seguenti riflessioni:

→ Attività motoria: nei gruppi di granchi che hanno svolto un'attività motoria il rilascio di eDNA è stato maggiore rispetto a quello rilevato nei gruppi di granchi immobili. Nei gruppi di granchi che, dopo essersi sottoposti a 10 minuti di attività, si riposavano per 10 minuti, i livelli di eDNA sono diminuiti rapidamente;

→ Livello di aggressività: in questo caso la previsione iniziale era che i gruppi di granchi con più alto livello di aggressività avrebbero rilasciato più eDNA, ma è stato riscontrato che, in realtà, sono stati i gruppi di granchi col più basso livello di aggressività a liberare la maggior quantità di eDNA. Nel caso di gruppi di granchi ad aggressività mista, i livelli di eDNA sono simili ai livelli di eDNA dei granchi con aggressività medio/alta;

→ Decadimento dell'organismo: l'eDNA viene rilasciato sia da organismi vivi che morti. I risultati degli esperimenti condotti su questo aspetto hanno prodotto degli esiti inaspettati: i campioni con volumi minori di granchi morti sono risultati avere concentrazioni più elevate di eDNA estratto rispetto a campioni con volumi più elevati, questo perché, se aumenta la quantità di materiale organico in decomposizione la concentrazione di eDNA diminuisce. Questi risultati suggeriscono che siano gli organismi vivi a rilasciare la maggior concentrazione di eDNA rispetto alle carcasse.

Gli autori hanno evidenziato altri due fattori responsabili delle variazioni delle concentrazioni di eDNA: la temperatura dell'acqua e il tempo di campionamento.

La temperatura, come verrà descritto più avanti nel capitolo 3, è in grado di rallentare o accelerare la degradazione dell'eDNA, perché va ad influenzare altri fattori come l'attività microbica ed enzimatica che sono responsabili della degradazione dell'eDNA.

L'ultimo fattore analizzato nello studio è il tempo di campionamento: aumentando il tempo di rilascio dell'eDNA nella colonna d'acqua la degradazione dell'eDNA aumenta in maniera esponenziale.

In generale, lo studio di Danziger et al. (2022) sottolinea come i vari parametri abiotici e biotici possano alterare la concentrazione di *C. maenas* nell'acqua, aumentando o diminuendo i tassi di dispersione e degradazione.

Per determinare la biomassa di una popolazione di animali, che si trova in acqua a diverse temperature, profondità e direzioni di flusso e dove gli animali mostrano diversi livelli di attività ed aggressività, in diverse fasi della vita, stato di alimentazione e molte altre condizioni non controllate (come i livelli di pH), la concentrazione di eDNA complessiva risulterà essere semplicemente una somma influenzata da tutti questi aspetti (Danziger et al., 2022).

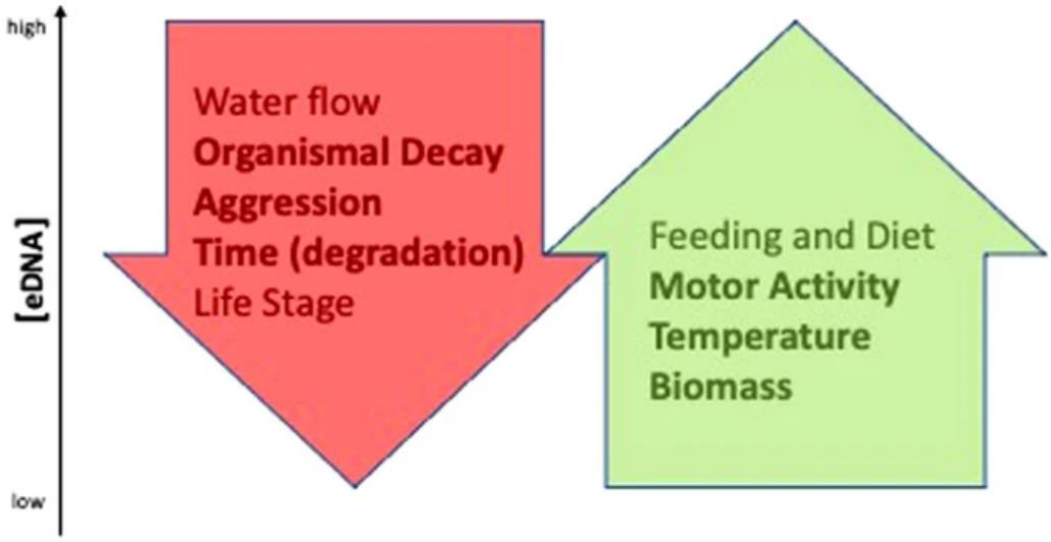

Figura 4 – Rappresentazione grafica dei fattori che aumentano e diminuiscono la concentrazione di eDNA in acqua di mare (Danziger et al., 2022).

Capitolo 3
Difficoltà nell'utilizzo dell'eDNA

In questo capitolo vengono esposte le difficoltà principali che si possono trovare nell'utilizzo dell'eDNA ovvero il decadimento (cioè, il ridursi nel tempo dell'eDNA), la persistenza dell'eDNA e la degradazione dell'eDNA (cioè, la scissione dell'eDNA in cataboliti più semplici).

Persistenza e decadimento dell'eDNA

Nei due casi di studio del capitolo 2 è stato sottolineato come l'eDNA abbia uno stato di persistenza e di stabilità, variabile a seconda dei diversi ambienti in cui si trova, a causa di numerosi parametri tra cui, per citarne un paio, le condizioni ambientali e la stagionalità.

Per poter comprendere le diverse ragioni che impattano sulla persistenza e sulla decadenza dell'eDNA in ambiente acquatico è necessario ricordare i quattro stati principali dell'eDNA (DNA disciolto, DNA legato a particelle sospese, DNA incapsulato a cellule e DNA incapsulato ad organelli), perché ogni stato è dotato di un comportamento chimico differente dagli altri e, di conseguenza, reagisce in modo diverso ai parametri ambientali acquatici (temperatura, pH, particelle sospese...) (Barnes at al., 2014; Harrison et al., 2019; Jo T. et al., 2022; Mauvisseau et al., 2022).

Il DNA disciolto è altamente solubile in acqua grazie ai suoi gruppi fosfodiesterici nella catena del DNA che sono dotati di carica negativa. D'altro canto, il DNA disciolto può interagire e legarsi con facilità a particelle o organelli sospesi in acqua. Se il DNA si lega a particelle sospese o rimane incapsulato in cellule o in organelli, i legami coinvolti sono controllati dalle leggi dell'elettrostatica. Questo è importante, perché il DNA è carico negativamente e viene attratto dalle particelle cariche positivamente, con cui andrà ad instaurare dei legami.

Tuttavia, le leggi dell'elettrostatica e le reazioni chimiche influenzano anche la conversione dell'eDNA nei suoi diversi stati.

L'eDNA disciolto si forma, nel caso di cellule prive di parete, per la lisi della cellula per citolisi o, nel caso di cellule vegetali, per la rottura enzimatica della lignina e dei polisaccaridi che compongono la parete cellulare.

Ciò che determina la velocità nella lisi delle cellule vegetali è l'attività degli enzimi microbici extracellulari, la cui attività aumenta con l'aumento della concentrazione enzimatica ed è sensibile alla temperatura e alla luce ultravioletta (Mauvisseau et al., 2022; Thomson et al., 2017).

Il DNA è carico negativamente a pH neutro ed è attratto da superfici, solitamente minerali, con carica positiva.

Nello studio condotto da Mauvisseau et al., (2022), gli autori hanno notato l'importanza che il pH svolge nel legame DNA superficie cellulare o nel caso di DNA incapsulato.

Con l'aumento del pH, le cariche negative aumentano e quelle positive diminuiscono, ma questa condizione causa l'indebolimento delle interazioni elettrostatiche, implicando una diminuzione dei legami DNA cellula e di eDNA legato alle cellule.

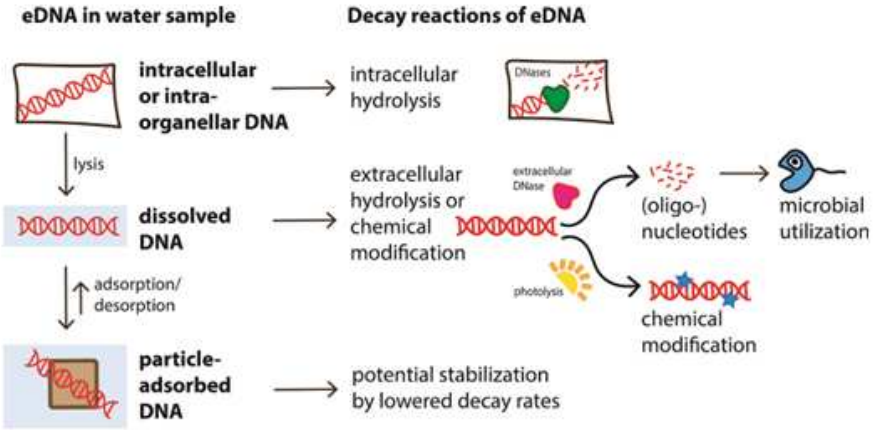

Figura 5 – Schema degli stati dell'eDNA e delle reazioni che permettono il passaggio tra gli stati di eDNA, tratta da (Mauvisseau et al., 2022).

L'eDNA può essere di natura nucleare o mitocondriale e il DNA nucleare (struttura lineare) è maggiormente sensibile alla frammentazione rispetto al DNA mitocondriale (struttura circolare). Man mano che il DNA si rompe in frammenti più corti, la differenza nella struttura molecolare diventerà meno pronunciata e il processo di decadimento dei due tipi di DNA sarà estremamente simile.

Le reazioni chimiche (idrolisi abiotica, idrolisi enzimatica e ossidazione fotochimica) e le reazioni enzimatiche sono responsabili della rottura dei legami esteri della catena del DNA, che si trasforma in numerose catene più corte.

La cinetica delle reazioni enzimatiche dipende dagli stessi parametri che influenzano il decadimento dell'eDNA (temperatura, pH, luce UV, abbondanza e attività microbica).

Di conseguenza ci si attende che i tassi di decadimento dell'eDNA siano altamente correlati ai parametri ambientali dell'acqua, indipendentemente che siano coinvolte le reazioni enzimatiche.

Uno studio condotto da Saito & Doi (2021) ha evidenziato invece, differenze nei tassi di decadimento tra i diversi stati dell'eDNA nell'acqua di stagno, ma non per l'acqua marina. Il risultato di Saito & Doi (2021) suggerisce che la chimica dell'acqua nei diversi habitat può svolgere un ruolo nella degradazione degli stati dell'eDNA (Mauvisseau et al., 2022; Saito & Doi, 2021).

Riassumendo, le reazioni chimiche che causano il decadimento dell'eDNA sono specifiche dello stato dell'eDNA e le costanti del tasso di decadimento sono influenzate dalle proprietà chimico fisiche degli ambienti acquatici. Inoltre, il fatto che l'eDNA decada e venga degradato è un problema per il campionamento e per l'efficacia delle successive analisi del campione studiato.

Degradazione dell'eDNA

Il processo di degradazione dell'eDNA, che consiste nella scissione del DNA in cataboliti sempre più semplici, può essere visto come un processo a due fasi: la fase iniziale dove l'eDNA si degrada velocemente ed una seconda fase dove la velocità di degradazione diminuisce notevolmente.

Prima di degradarsi l'eDNA, grazie all'azione delle correnti oceaniche, spesso viene trasportato molto lontano da dov'è stato rilasciato.

Ci sono dei fattori abiotici dell'acqua, temperatura, pH e concentrazione dell'ossigeno disciolto, che possono influenzare il tasso di degradazione dell'eDNA e la sua persistenza nell'ambiente.

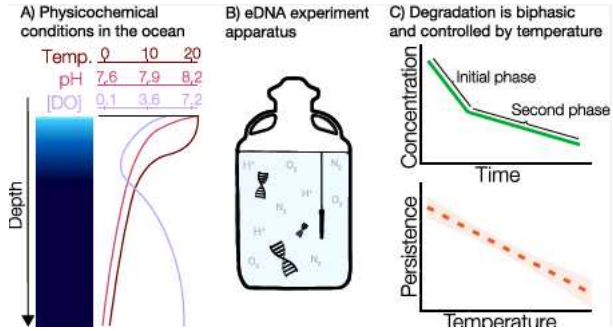

Figura 6 – Esempio grafico dell'influenza della temperatura nella degradazione dell'eDNA (McCartin et al., 2022).

L'eDNA viene principalmente degradato da nucleasi extracellulari e microbi, di conseguenza, l'aumento osservato del tasso di decadimento dell'eDNA con temperature più elevate è probabilmente guidato dall'aumento dell'attività enzimatica (Lamb et al., 2022): se la temperatura aumenta la cinetica enzimatica degli enzimi responsabili della degradazione dell'eDNA, il pH influenza la stabilità delle molecole di eDNA.

La concentrazione di ossigeno disciolto, invece, va ad influire sull'attività microbica, sul metabolismo microbico e sull'ossidazione dell'eDNA.

Tra questi tre fattori di controllo della degradazione dell'eDNA, il fattore che ha maggiore importanza è la temperatura: un aumento della temperatura implica un decadimento più veloce dell'eDNA.

Negli ambienti marini più freddi tra cui anche i mari profondi, dove la temperatura dell'acqua è molto bassa, l'eDNA persiste per un tempo maggiore prima di degradarsi, rispetto ad acque dove le temperature sono più elevate e può essere trasportato per distanze maggiori dal punto in cui è stato rilasciato (McCartin et al., 2022).

Se abbiamo condizioni di pH acido, l'eDNA si degrada più velocemente, ma il pH e la concentrazione di ossigeno disciolto influenzano la degradazione dell'eDNA con effetti minimi rispetto a quelli esercitati dalla temperatura (McCartin et al., 2022). La degradazione dell'eDNA ha un tasso decrescente dovuto ad una diminuzione delle dimensioni delle particelle a cui l'eDNA è legato nel tempo.

Studi sul campo e sperimentali mostrano che l'eDNA è presente principalmente in frazioni relativamente grandi, 1-10 µm, tra cui cellule intere e mitocondri. Il lavoro sperimentale indica che maggiori sono le dimensioni di particelle di eDNA, meno eDNA contengono le particelle e più velocemente quest'ultime

degradano. Nelle particelle di dimensioni inferiori a 3 μm, invece, la degradazione è più lenta della degradazione dell'eDNA in particelle di frazioni maggiori.

Il tasso di degradazione diminuisce nel tempo a causa di uno spostamento nell'associazione dell'eDNA con particelle più grandi verso particelle più piccole (McCartin et al., 2022).

Questa rapida degradazione iniziale può essere spiegata anche dalla degradazione dell'eDNA mitocondriale, dalla lisi mitocondriale e da una perdita dell'eDNA libero, che non viene trattenuto dai filtri di campionamento.

La temperatura influisce maggiormente nella seconda fase della degradazione dell'eDNA, andando a rompere i legami presenti all'interno della molecola di DNA.

Capitolo 4
Confronti tra utilizzi passati e futuri dell'eDNA

La prima estrazione di DNA da un campione d'acqua è stata fatta nel 2008 ad opera di Ficetola et al., (2008) che ha sviluppato un metodo, insieme ad alcuni colleghi, per rilevare una specie dal DNA trovato in campioni ambientali. Negli anni seguenti il numero di campionamenti ambientali per ricercare eDNA è aumentato rapidamente, tant'è che nel 2012 la rivista *Molecular Ecology* ha pubblicato uno speciale con un punto di riferimento sull'eDNA (Blackman et al., 2024; Taberlet et al., 2012).

Nel volume speciale di *Molecular Ecology* sono state identificate sei chiavi d'indagine, rappresentative di sei aree d'importanza nel campo dell'eDNA: raccolta di campioni, sviluppo dei primer, biomonitoraggio, quantificazione dell'eDNA, comportamento dell'eDNA e sviluppo dei database di riferimento.

Nel febbraio 2024 Blackman et al. hanno divulgato un articolo, sempre sulla rivista *Molecular Ecology*, dove hanno sottolineato come si sono evolute le sei aree di spicco nell'arco di dodici anni e in quali aree bisognerebbe maggiormente concentrarsi in futuro per ottenere migliori risultati.

Questi dati sono stati raccolti tramite un sondaggio anonimo indirizzato a tutti coloro che studiano l'eDNA (Blackman et al., 2024).

I risultati del sondaggio sono riassunti e rappresentati graficamente nella Figura 7.

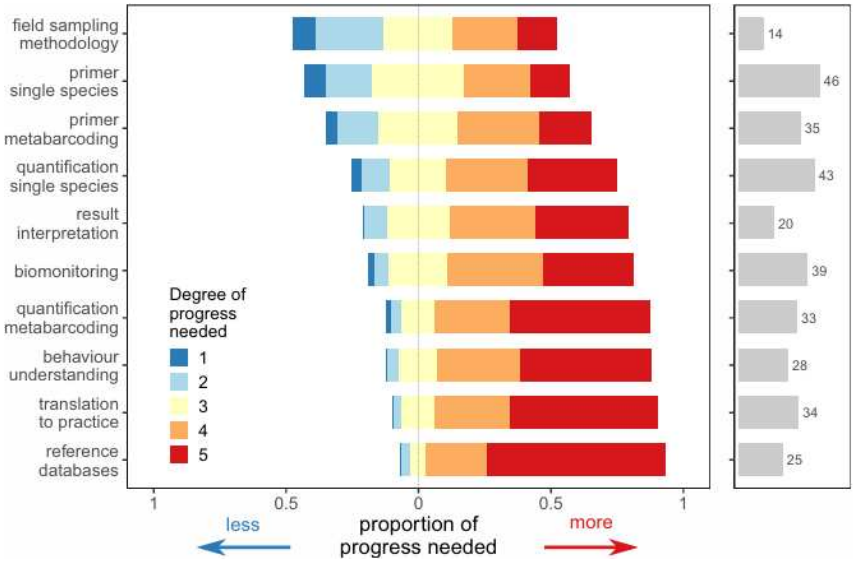

Figura 7 – Rappresentazione grafica dei risultati del sondaggio tratto da (Blackman et al., 2024) (Il grafico grigio a destra indica le risposte "non ne ho idea")

Si può confrontare, sotto diversi aspetti, il modo in cui le sei aree chiave si sono modificate nel tempo e come potranno evolversi in futuro. In sintesi:

a. Raccolta di campioni

   Nel 2012 è stata evidenziata la necessità di rafforzare alcuni aspetti, tra cui i protocolli di campionamento, i flussi di lavoro per prevenire la contaminazione dell'eDNA e per la conservazione dell'eDNA, in modo tale da riuscire a renderli standardizzati per poter garantire una corretta applicazione del campionamento dell'eDNA e nell'elaborazione dei campioni. Se i protocolli standard in passato consistevano nella raccolta di campioni e filtrazione successiva in laboratorio, attualmente è emersa la necessità di campionare e filtrare *in loco*, affinché i campioni di eDNA vengano conservati meglio. I protocolli di sterilizzazione si sono fatti più stringenti e, grazie allo sviluppo di nuovi metodi di campionamento automatizzati in ambiente acquatico, è stata scoperta la possibilità di campionamenti a lungo termine.

   Malgrado i progressi, in futuro, bisognerà continuare a dedicarsi all'integrazione delle nuove pratiche e alla necessità di soddisfare le richieste degli standard elevati nei protocolli di campionamento dell'eDNA;

b. Sviluppo dei primer

   La ricerca di primer e dell'esatta banda di amplificazione dell'eDNA, vista l'alta percentuale di degradazione dell'eDNA e della sua bassa concentrazione all'interno dei campioni, è stata una delle più grandi preoccupazioni nel 2012. Per questo motivo, in passato, è stato ricercato di un singolo primer universale. Quest'idea negli ultimi anni è stata accantonata per poter impiegare primer specifici di un gruppo/*taxon*, in modo da aumentare la copertura tassonomica e ottimizzare l'uso della PCR.

   Nelle ricerche future c'è bisogno di concentrare maggiori sforzi nel valutare l'abbondanza e la variabilità delle diverse specie oggetto di studio, ma, soprattutto, di sviluppare maggiormente nuovi approcci. Approcci che non prevedano l'impiego di PCR (come l'ibridazione e l'amplificazione isotermica), che stanno evolvendo ultimamente, in modo da poterne conoscere gli aspetti positivi e negativi;

c. Biomonitoraggio

Nel 2012 il biomonitoraggio tramite il *metabarcoding* dell'eDNA è stato considerato un metodo per integrare o sostituire il monitoraggio tradizionale con i bio indicatori e come uno strumento che ha permesso di comprendere maggiormente la tassonomia marina. Dal 2012 ad oggi lo scopo del biomonitoraggio è quello di supporto al monitoraggio dei bio indicatori per rilevare specie criptiche o gruppi di *taxon*, grazie all'utilizzo di primer specifici.

Quindi il futuro del biomonitoraggio consiste nella ricerca di nuovi approcci che verranno implementati dall'utilizzo del *metabarcoding* dell'eDNA;

d. Quantificazione dell'eDNA

La quantificazione dell'eDNA e dell'abbondanza delle specie, tramite gli studi di *metabarcoding* sono una delle aree di ricerca che devono essere maggiormente soggette a studio in futuro. Attualmente non è possibile quantificare l'abbondanza di una specie tramite *metabarcoding*;

e. Comportamento dell'eDNA

In passato, la persistenza (degradazione) dell'eDNA è dipesa dalle influenze abiotiche e biotiche, ma non ha considerato i tassi di dispersione o il trasporto dell'eDNA (fattori che attualmente vengono considerati oltre ai fattori biotici ed abiotici).

Nonostante i grandi miglioramenti, restano numerosi dubbi sul comportamento dell'eDNA, motivo per cui per diminuire l'incertezza nell'interpretazione dei dati è fondamentale studiare nuovi modelli che potrebbero basarsi su procedimenti che considerano sia i fattori biotici e abiotici che influenzano l'ambiente oltre che migliorare le tecniche di sequenziamento dell'eDNA (Blackman at al., 2024 ; Carraro et al., 2020; Harrison et al., 2019; Luo et al., 2023);

f. Sviluppo dei database di riferimento

Taberlet et al. (2012) hanno osservato che "una delle principali sfide bioinformatiche che rimangono è la trasformazione di un elenco di sequenze in un elenco di specie e che a causa di database di riferimento incompleti una porzione ampia e sconosciuta di biodiversità rimane non caratterizzata" (Blackman et al., 2024; Taberlet et al., 2012).

Negli anni questa situazione sottolineata da Taberlet et al. (2012) non è variata molto; infatti, nel sondaggio condotto da Blackman et al. (2024) la necessità di database di riferimento è risultato ciò su cui si dovranno sviluppare studi futuri per trovare nuove sequenze e nuove specie da aggiungere ai database già esistenti.

Nell'arco di 12 anni la ricerca sull'eDNA si è evoluta dall'identificazione iniziale di singole specie rare o invasive alla caratterizzazione di intere comunità e a come funzionino questi rilevamenti all'interno dell'ecosistema.
Nonostante questi progressi in futuro è necessario ulteriore lavoro di ricerca, in modo da colmare le lacune ed evolversi sempre di più.

Proposta di utilizzo dell'eDNA in ambito ecotossicologico in ambiente marino

Negli ultimi 70 anni, la popolazione mondiale è aumentata esponenzialmente e con essa anche la produzione e il consumo di cibo ed energia, ma soprattutto di rifiuti, causando un incremento dell'inquinamento ambientale a livello globale.
L'ecotossicologia è un ramo della scienza che studia come le sostanze chimiche tossiche influenzino gli ambienti e gli esseri viventi che li popolano, e come queste sostanze si relazionino col il contesto circostante (Moiseenko et al., 2008; Ramakrishnan et al., 2011; Rishan et al., 2024).
L'obiettivo principale dell'ecotossicologia è valutare i potenziali pericoli e rischi posti dalle sostanze tossiche all'ambiente (Rishan et al., 2024; Wolska et al.,2007).
Negli ultimi anni, visto l'intensificarsi dei problemi legati all'inquinamento, numerosi studiosi hanno pensato di impiegare il *metabarcoding* dell'eDNA, in quanto metodo non invasivo dotato di elevata sensibilità di rilevamento, per valutare e quantificare i danni causati dall'inquinamento ambientale.
Ad esempio, l'eDNA viene utilizzato per identificare le fioriture algali dannose (*Harmful Algal Blooms* o HABs): l'applicazione del metodo del *metabarcoding* dell'eDNA permette di avere un quadro più completo sulle diverse specie di HABs, perché, a differenza dei metodi tradizionali come la microscopia, riconosce anche le specie rare e criptiche.

Il *metabarcoding*, integrato alle tecniche di tracciamento convenzionali, rende possibile il monitoraggio, il rilevamento, l'allerta precoce per i problemi legati alle fioriture e la gestione preventiva degli ecosistemi marini.

Anche nel caso delle microplastiche l'eDNA può essere sfruttato come strumento per comprendere l'impatto ecologico dell'inquinamento da plastica. La plastica in mare si degrada molto lentamente, la maggior parte dei detriti di plastica che vengono scaricati nell'ecosistema mostra un'elevata stabilità chimica e resistenza alla corrosione e ciò rappresenta una sfida per la degradazione microbica, anche nei casi in cui la plastica dovrebbe essere biodegradabile (Rishan et al., 2024; Yang et al., 2020).

Il *metabarcoding* prevede un'analisi completa del DNA: usufruire di questa tecnica per studiare i campioni ambientali dove sono presenti microplastiche, permette di localizzare i frammenti delle microplastiche, in tempi minori rispetto a quelli di cui necessitano i metodi tradizionali (che consistono nella separazione, misurazione e localizzazione dei frammenti di plastica).

Altra situazione di applicazione dell'eDNA è data dai metalli pesanti, presenti in tutto l'ambiente acquatico, perché a basse concentrazioni sono fondamentali per il metabolismo, mentre ad alte concentrazioni causano gravi danni alla salute degli organismi. I test basati sull'eDNA sono molto sensibili, quindi i metalli pesanti se presenti anche in piccole concentrazioni nel campione, analizzato e processato secondo i passaggi descritti dalla Fig.3 del Capitolo 1, riescono ad essere individuati.

Grazie alla loro elevata sensibilità i test dell'eDNA risultano essere molto importanti quando ci sono spargimenti e fuoriuscite di petrolio, perché rilevano i livelli minimi di contaminazione, riducendo così i possibili disastri ecologici.

Infine, l'eDNA può essere sfruttato come strumento per il monitoraggio delle cosiddette acque di zavorra, le riserve d'acqua a bordo delle imbarcazioni per aumentarne la stabilità, e che sono il mezzo d'introduzione di specie invasive in nuovi ambienti.

Solitamente le tecniche tradizionali prevedono analisi microscopiche per vedere se c'è stata contaminazione, ma i risultati delle analisi richiedono lunghi tempi di elaborazione. I risultati del monitoraggio dell'eDNA, invece, sono più immediati e permettono così la prevenzione nella diffusione delle specie alloctone.

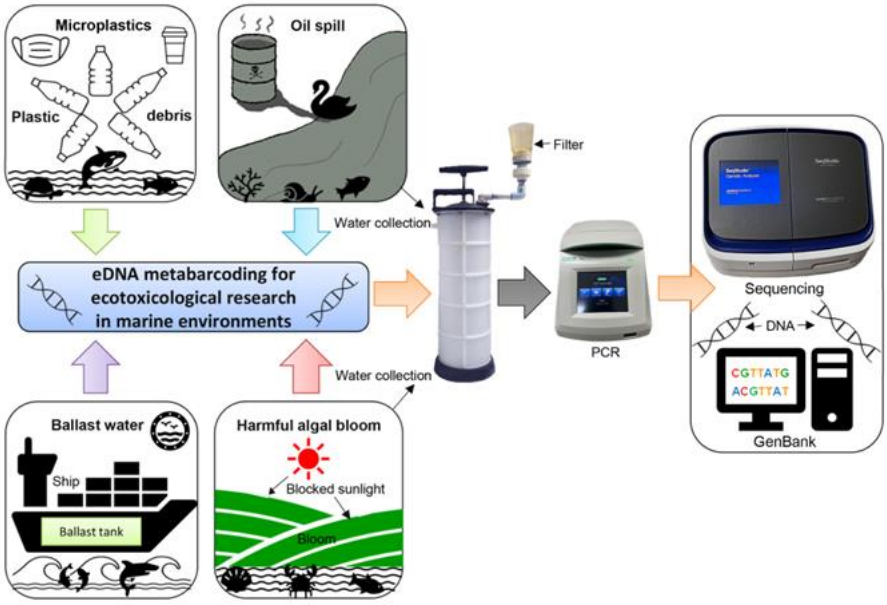

Figura 8 - Diagramma del metabarcoding dell'eDNA per la ricerca ecotossicologica in ambienti marini, tratto da (Rishan et al., 2024)

Sebbene l'impiego dell'eDNA in ecotossicologia abbia acquistato importanza, bisogna ricordarne alcuni limiti:

- l'eDNA viene influenzato dai fattori ambientali (temperatura, pH, raggi UV);
- può esserci difficoltà nello stabilire quali siano gli elementi (metalli o plastiche) da cui proviene il DNA;
- il *metabarcoding* fornisce solo informazioni semi-quantitative e non può essere utilizzato per una quantificazione precisa del campione analizzato;
- a causa di database non del tutto sviluppati o completi, la risoluzione tassonomica può essere limitata;
- l'eDNA si degrada molto velocemente, quindi si può avere difficoltà nel rilevamento.

Nonostante ci siano alcune limitazioni, correlazioni tra l'eDNA e i metodi tradizionali sono fondamentali per implementare metodi duraturi, poco invasivi, efficaci ed informati per conservare gli ecosistemi. Questa è la direzione della ricerca per il futuro della biodiversità.

IMPIEGO DELL'INTELLIGENZA ARTIFICIALE

In questo elaborato ho usufruito dell'ausilio dell'*Artificial Intelligence* (AI) come mezzo per tradurre e capire al meglio alcuni articoli, ma soprattutto nella comprensione di alcuni argomenti trattati superficialmente negli articoli durante il percorso di studi.

Bibliografia

Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. «Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems.» *Environmental Science & Technology* 48, n. 3 (2014): 1819–1827.

Barnes, M.A., Turner, C.R. «The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics.» *Conservation Genetics* 17 (2016): 1-17.

Blackman, R., Couton, M., Keck, F., Kirschner, D., Carraro, L., Cereghetti, E., Perrelet, K., Bossart, R., Brantschen, J., Zhang, Y., & Altermatt, F. «Environmental DNA: The next chapter.» *Molecular Ecology* 33, n. 11 (2024): 1-17.

Bruce K., Blackman R., Bourlat S.J., Hellström A.M., Bakker J., Bista I., Bohmann K., Bouchez A., Brys R., Clark K., Elbrecht V., Fazi S., Fonseca V., Hänfling B., Leese F., Mächler E., Mahon A.R., Meissner K., Panksep K., Pawlowski J., Schmidt Yáñez P. *A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment.* Sofia, Bulgaria: Pensoft Advanced Books, 2021.

Carraro, L., Mächler, E., Wüthrich, R., & Altermatt, F. «Environmental DNA allows upscaling spatial patterns of biodiversity in freshwater ecosystems.» *Nature Communications* 11, n. 3585 (2020).

Danziger A. M., Olson Z.H., Frederich M. «Limitations of eDNA analysis for *Carcinus maenas* abundance estimations.» *BMC Ecology and Evolution* 22, n. 14 (2022).

Ficetola G. F., Miaud C., Pompanon F. & Taberlet P. «Species detection using environmental DNA from water samples.» *Biology letters* 4, n. 4 (2008): 423-425.

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

Hervé, A., Domaizon, I., Baudoin, J. M., Dejean, T., Gibert, P., Jean, P., Peroux, T., Raymond, J. C., Valentini, A., Vautier, M., & Logez, M. «Spatio-temporal variability of eDNA signal and its implication for fish monitoring in lakes.» *Plos one* 17, n. 8 (2022).

Jo T., Takao K., Minamoto T. «Linking the state of environmental DNA to its application forbiomonitoring and stock assessment: Targeting mitochondrial/nuclear genes, and different DNA fragment lengths andparticle sizes.» *Environmental DNA* 4, n. 2 (2022): 271-283.

Jori B. Harrison, Jennifer M. Sunday and Sean M. Rogers. «Predicting the fate of eDNA in theenvironment and implications forstudying biodiversity.» *The Royal Society Publishing*, 2019.

Lamb, P. D., Fonseca, V. G., Maxwell, D. L., & Nnanatu, C. C. «Systematic review and meta- analysis: Water type and temperature affect environmental DNA decay.» *Molecular Ecology Resources* 22, n. 7 (2022): 2494–2505.

Luo, M., Ji, Y., Warton, D., & Yu, D. W. «Extracting abundance information from DNA- based data.» *Molecular Ecology Resources* 23, n. 1 (2023): 174–189.

Mauvisseau, Q., Harper, L. R., Sander, M., Hanner, R. H., Kleyer, H., & Deiner, K. «The Multiple States of Environmental DNA and What Is Known about their persistence in acquatic enviroments.» *Enviromental Science & Technology* 56, n. 9 (2022): 5322-5333.

McCartin, L. J., Vohsen, S. A., Ambrose, S. W., Layden, M., McFadden, C. S., Cordes, E. E., McDermott, J. M., & Herrera, S. «Temperature Controls eDNA Persistence across Physicochemical Conditions in Seawater.» *Environmental Science & Technology* 56, n. 12 (2022): 8629–8639.

Minamoto, Toshifumi. «Environmental DNA analysisfor macro-organisms: species distribution and more.» *Oxford University Press* 29, n. 3 (2022): 1-9.

Moiseenko, T. I., Gashkina, N. A., Sharova, Y. N., & Kudryavtseva, L. P. «Ecotoxicological assessment of water quality and ecosystem health: A case study of the Volga River.» *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, n. 3 (2008): 837–850.

Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., & Altermatt, F. «Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring.» *Molecular Ecology* 29, n. 22 (2020): 4258–4264.

Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K., Sethunathan N., Naidu R. «Mixtures of Environmental Pollutants: Effects on Microorganisms and Their Activities in Soils.» *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 211 (2011): 63–120.

Rishan, S. T., Kline, R. J., & Rahman, M. S. «Exploitation of environmental DNA (eDNA) for ecotoxicological research: A critical review on eDNA metabarcoding in assessing marine pollution.» *Chemosphere* 351 (2024).

Rodriguez-Ezpeleta, N., Morissette, O., Bean, C. W., Manu, S., Banerjee, P., Lacoursiere-Roussel, A., Beng, K. C., Alter, S. E., Roger, F., Holman, L. E., Stewart, K. A., Monaghan, M. T., Mauvisseau Q., Mirimin, L., Wangensteen, O. S., Antognazza, C. M.,. «Trade-offs between reducing complex terminology and producing accurate interpretations from environmental DNA: Comment on "Environmental DNA: What's behind the term?" by Pawlowski et al.,.» *Molecular Ecology* 30, n. 19 (2021): 4601-4605.

Saito, T. & Doi, H. «Degradation Modeling of Water Environmental DNA: Experiments on Multiple DNA Sources in Pond and Seawater.» *Environmental DNA* 3, n. 4 (2021): 850-860.

Siuda, W. & Chróst, R. «Concentration and Susceptibility of Dissolved DNA for Enzyme Degradation in Lake Water-Some Methodological Remarks.» *Aquatic Microbial Ecology* 21 (2000): 195-201.

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

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. «Environmental DNA.» *Molecular Ecology* 21, n. 8 (2012): 1789-1793.

Takahashi, M., Saccò, M., Kestel, J. H., Nester, G., Campbell, M. A., van der Heyde, M., Heydenrych, M. J., Juszkiewicz, D. J., Nevill, P., Dawkins, K. L., Bessey, C., Fernandes, K., Miller, H., Power, M., Mousavi-Derazmahalleh, M., Newton, J. P. «Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution.» *Science of The Total Environment* 873 (2023).

Thomson, B., Hepburn, C. D., Lamare, M., Baltar, F. «Temperature and UV light affect the activity of marine cell-free enzymes.» *Biogeosciences* 14, n. 17 (2017): 3971–3977.

Wolska, L., Sagajdakow, A., Kuczyńska, A., & Namieśnik, J. «Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: Possibilities and problems.» *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26, n. 4 (2007): 332-344.

Yang, Y., Liu, W., Zhang, Z., Grossart, H. P., & Gadd, G. M. «Microplastics provide new microbial niches in aquatic environments.» *Applied Microbiology and Biotechnology* 104, n. 15 (2020): 6501–6511.