Il monitoraggio aerobiologico: metodiche di routine e approcci molecolari

Elisa Banchi

Istituto Nazionale di Oceanografia e di Geofisica Sperimentale - OGS

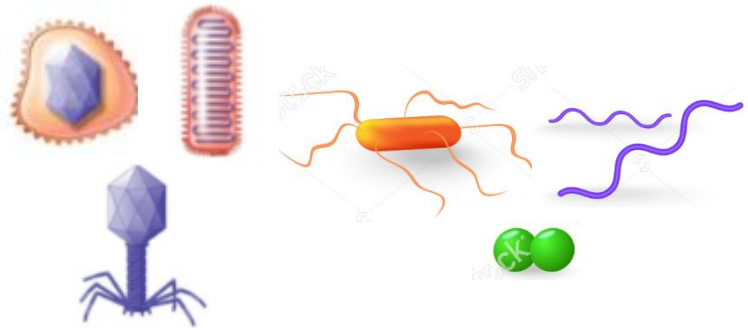
Aerobiologia

Si occupa dello studio del trasporto degli organismi aerodiffusi e dei suoi effetti in ambienti aperti e confinati.



Bioaerosol

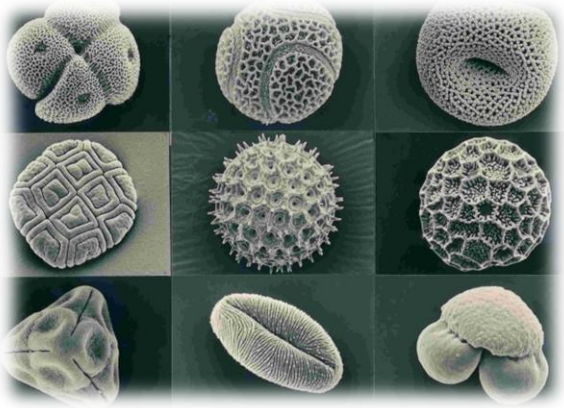
Comprende particelle e componenti emessi direttamente dalla biosfera nell'atmosfera: pollini, batteri, spore di funghi e felci, virus e frammenti di animali o piante.



virus batteri



Spore fungine



pollini

~20 nm → **~200 µm**

Applicazioni

- Biodiversità e cambiamenti ambientali
- Specie di interesse economico – agronomico
- Allergeni-Patogeni-Specie aliene invasive (AIS)

Questi ultimi si diffondono rapidamente e sono richiesti costi elevati per la prevenzione, la gestione e la sorveglianza sia in termini di protezione ambientale che di assistenza sanitaria.

→ Necessità di metodi sensibili e accurati per il rilevamento di queste particelle biologiche

Metodi tradizionali ⟷ **Metodi molecolari**

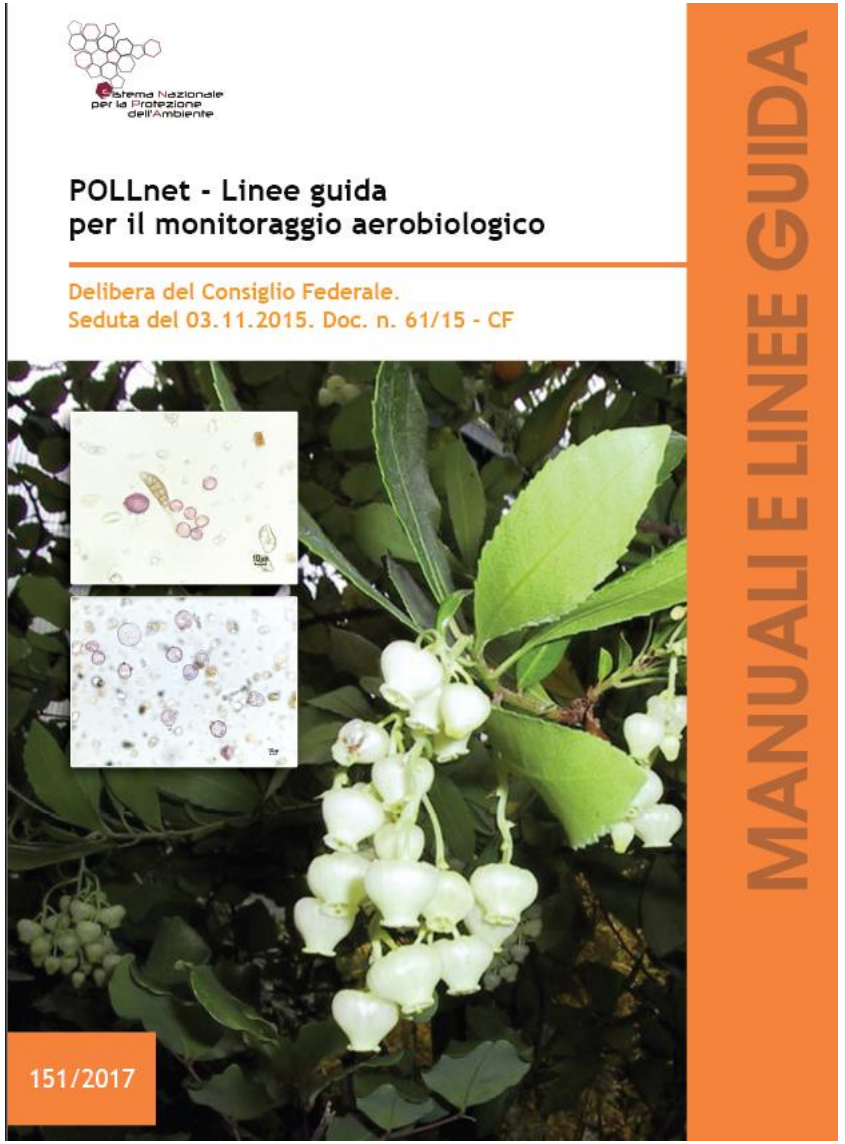




Monitoraggio tradizionale

- Agenzie regionali per la Protezione dell'Ambiente
- Si basa sulla microscopia ottica per l'identificazione ed il conteggio delle particelle
- Linee guida nazionali per il monitoraggio di pollini e spore fungine di interesse allergenico

ARPA FVG
Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente del Friuli Venezia Giulia

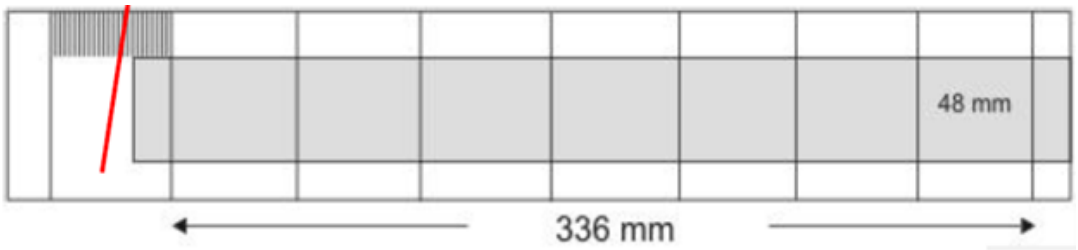


Campionatore volumetrico di tipo Hirst (Lanzoni)

- Pompa aspirante a portata costante (10 l/min)
- Tamburo campionatore con dispositivo di avanzamento (2 mm/h)
- Superficie di campionamento: nastro ricoperto di silicone (Melinex)
- Il nastro viene rimosso e tagliato in campioni giornalieri







F. Borney; ARPA Valle d'Aosta

Preparazione e lettura dei campioni

Preparazione:

- Ogni porzione di nastro viene messo su un vetrino portaoggetto identificato con data e luogo
- Sul nastro vengono messe 4-5 gocce di un colorante in gel (fucsina)

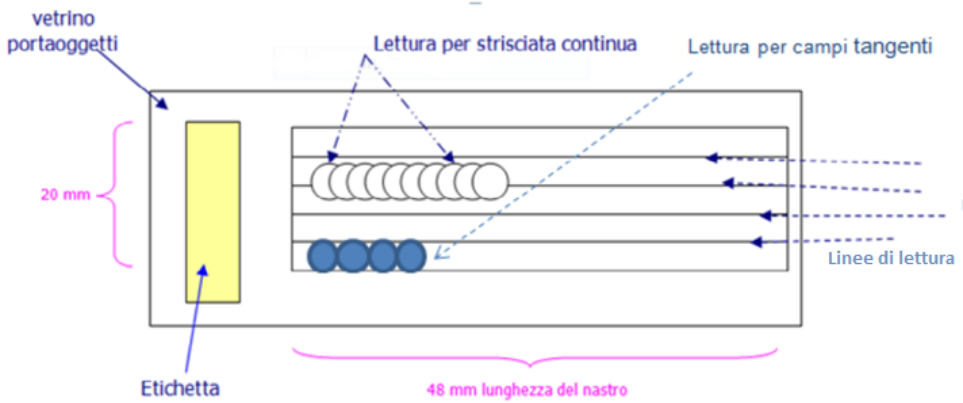
Lettura:

- Microscopia ottica in campo chiaro (40X)
- Superficie analizzata ≥ 15% del nastro, lettura per strisciata continua o campi tangenti
- Calcolo della concentrazione media giornaliera (granuli/m^3d)



F. Borney; ARPA Valle d'Aosta





Pollini

Si possono distinguere per:

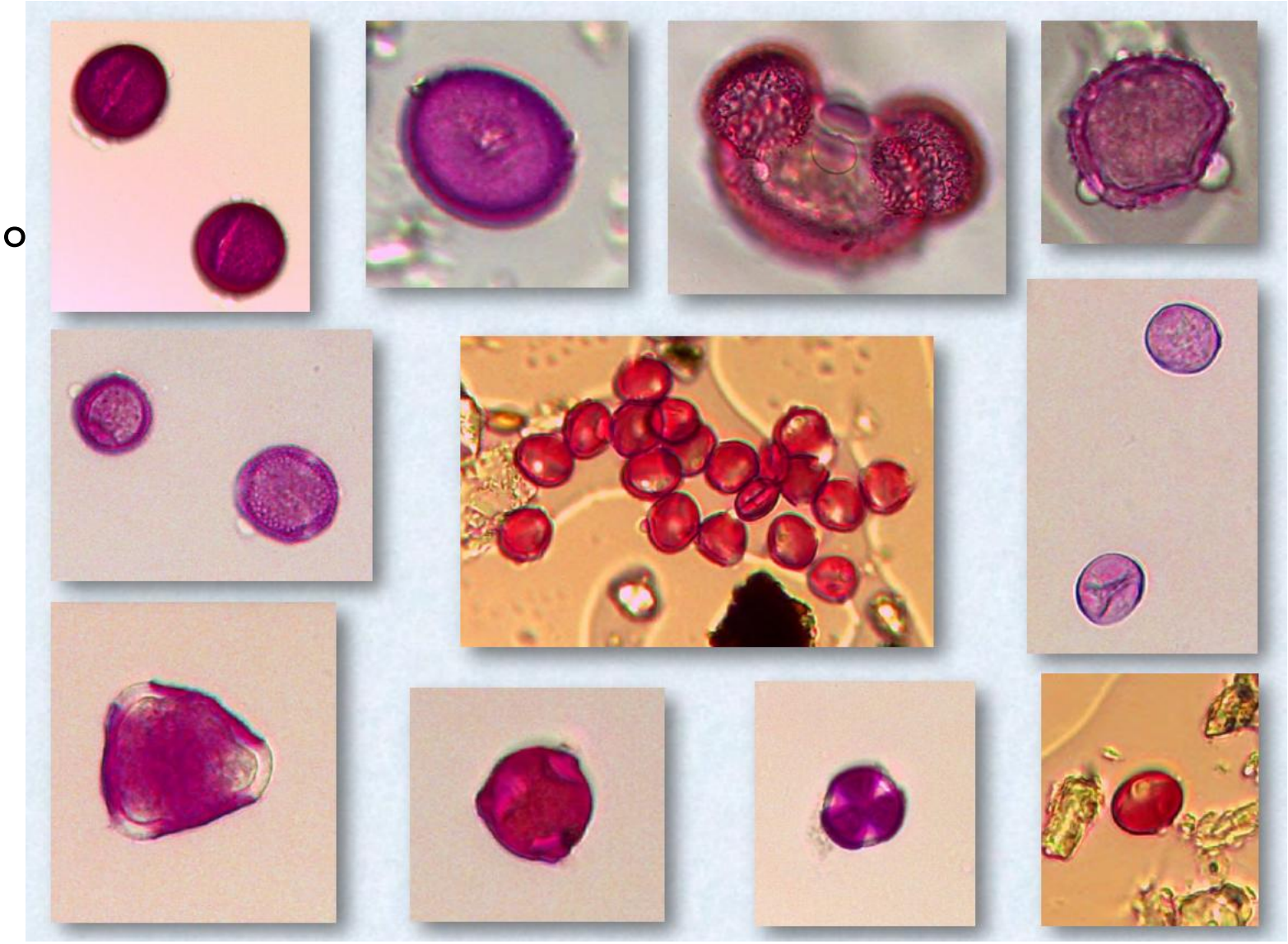
-tipo di aperture (aperturoidi, pori o colpi)

-dimensioni del granulo pollinico

-numero di aperture

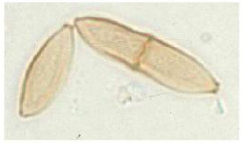
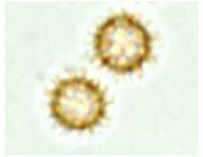
-sculturazioni dell'esina

-rapporto asse polare/equatoriale

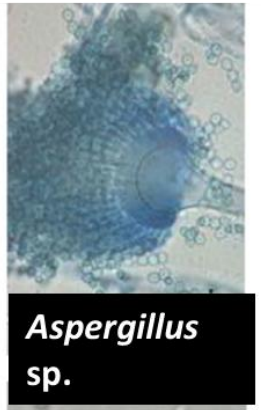


Spore fungine

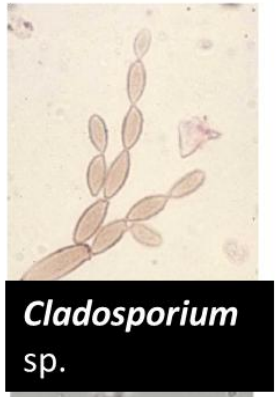
Per riconoscerle al microscopio si utilizzano diversi caratteri (dimensione, forma, spessore della parete, presenza di setti, presenza di spine, colore)

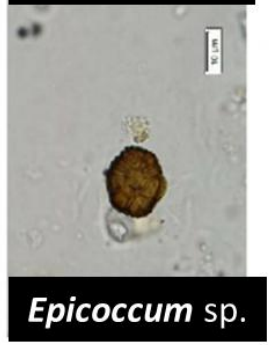
Globose 	Barrel-shaped 	Non-septate 	Random septa 
Lemon-shaped 	Club-shaped 	Transverse septa 	Attachment scars 
Elliptical 	Curved 	Transverse and Longitudinal septa 	Ornaments: spines 
Asymmetric and germ pore 	Cylindrical 	Pseudoseptate 	Appendages 







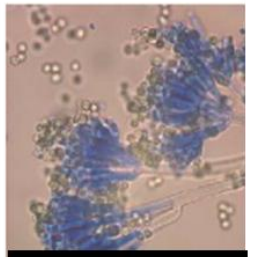


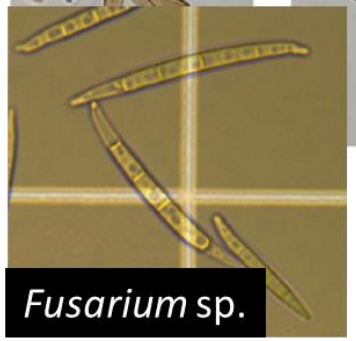












L'aggregazione dei dati giornalieri raccolti per i bollettini settimanali permette la redazione di un Calendario pollinico (annuale) pubblicato sul sito di ARPA

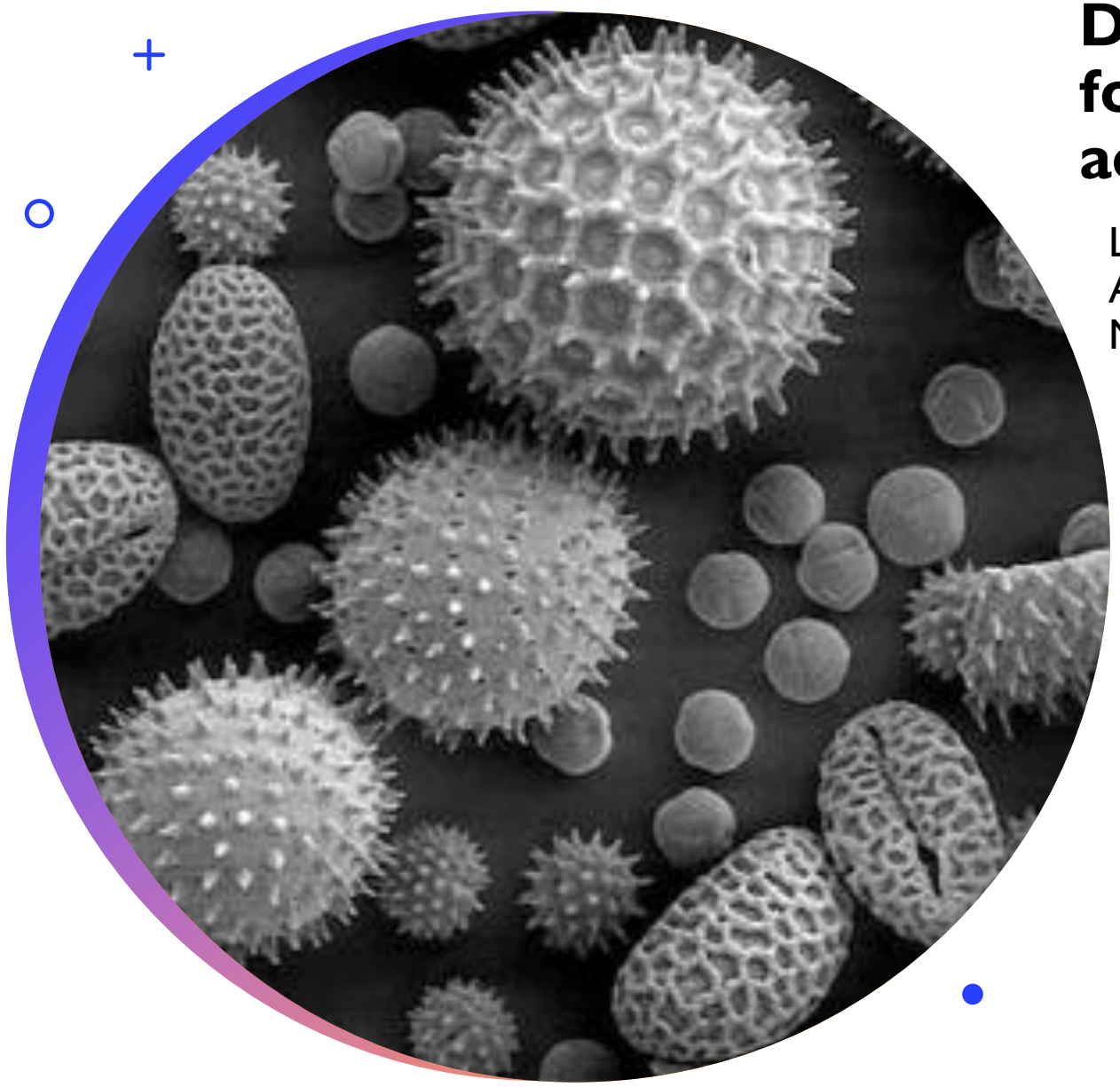
Valori espressi come numero di granuli/m^3 die

Famiglia (Clicca sulle famiglie per vedere il grafico)	Media settimanale
Aceracee	0,7
Betullacee	6
Chenopodiacee/Amarantacee	0
Composite	0
Corylacee	1,5
Cupressaceae/Taxacee	662,1
Cyperacee	0,6
Euforbiacee	0
Fagacee	0
Graminacee	0,4
Myrtacee	0
Oleacee	18,5
Pinacee	0,4
Piantaggine	0
Platano	1,9
Polygonacee	0
Salicacee	8,7
Ulmacee	2,5
Urticacee	0,7
Altri	1,2
Non identificati e non identificabili	0,5
Totale pollini	**705,7**
Alternaria	1,1

Settimana 20-26/03/2017; Trieste

classi e intervalli di concentrazione

	assente/ molto basso	basso	medio	alto	
POLLINI					
Aceracee	0 - 1	>1 - 20	>20 - 40	>40	Aceraceae
Betulacee	0 - 0,5	>0,5 - 16	>16 - 50	>50	Betulaceae
Ontano	0 - 0,5	>0,5 - 16	>16 - 50	>50	Alnus
Betula	0 - 0,5	>0,5 - 16	>16 - 50	>50	Betula
Chenopodiacee/Amarantacee	0 - 0,1	>0,1 - 5	>5 - 25	>25	Chenopodiaceae/Amaranthaceae
Compositae	0 - 0,1	>0,1 - 5	>5 - 25	>25	Compositae
Ambrosia	0 - 0,1	>0,1 - 5	>5 - 25	>25	Ambrosia
Assenzio	0 - 0,1	>0,1 - 5	>5 - 25	>25	Artemisia
Corylacee	0 - 0,5	>0,5 - 16	>16 - 50	>50	Corylaceae
Carpino bianco/orientale	0 - 0,5	>0,5 - 16	>16 - 50	>50	Carpinus
Nocciolo	0 - 0,5	>0,5 - 16	>16 - 50	>50	Corylus avellana
Carpino nero	0 - 0,5	>0,5 - 16	>16 - 50	>50	Ostrya carpinifolia
Cupressacee/Taxacee	0 - 4	>4 - 30	>30 - 90	>90	Cupressaceae/Taxaceae
Fagacee	0 - 1	>1 - 20	>20 - 40	>40	Fagaceae
Castagno	0 - 1	>1 - 20	>20 - 40	>40	Castanea sativa
Faggio	0 - 1	>1 - 20	>20 - 40	>40	Fagus sylvatica
Quercia	0 - 1	>1 - 20	>20 - 40	>40	Quercus
Gramineae	0 - 0,5	>0,5 - 10	>10 - 30	>30	Gramineae
Oleacee	0 - 0,5	>0,5 - 5	>5 - 25	>25	Oleaceae
Frassino	0 - 0,5	>0,5 - 5	>5 - 25	>25	Fraxinus
Frassino comune	0 - 0,5	>0,5 - 5	>5 - 25	>25	Fraxinus excelsior
Orniello	0 - 0,5	>0,5 - 5	>5 - 25	>25	Fraxinus ornus
Olivo	0 - 0,5	>0,5 - 5	>5 - 25	>25	Olea
Pinacee	0 - 1	>1 - 15	>15 - 50	>50	Pinaceae
Plantaginaceae	0 - 0,1	>0,1 - 0,4	>0,4 - 2	>2	Plantaginaceae
Platanacee	0 - 1	>1 - 20	>20 - 40	>40	Platanaceae
Poligonacee	0 - 1	>1 - 5	>5 - 10	>10	Polygonaceae
Salicaceae	0 - 1	>1 - 20	>20 - 40	>40	Salicaceae
Pioppo	0 - 1	>1 - 20	>20 - 40	>40	Populus
Salice	0 - 1	>1 - 20	>20 - 40	>40	Salix
Ulmacee	0 - 1	>1 - 20	>20 - 40	>40	Ulmaceae
Olmo	0 - 1	>1 - 20	>20 - 40	>40	Ulmus
Urticacee	0 - 2	>2 - 20	>20 - 70	>70	Urticaceae
SPORE FUNGINE					
Alternaria	0 - 1	>1 - 10	>10 - 100	>100	Alternaria



FRA-2016

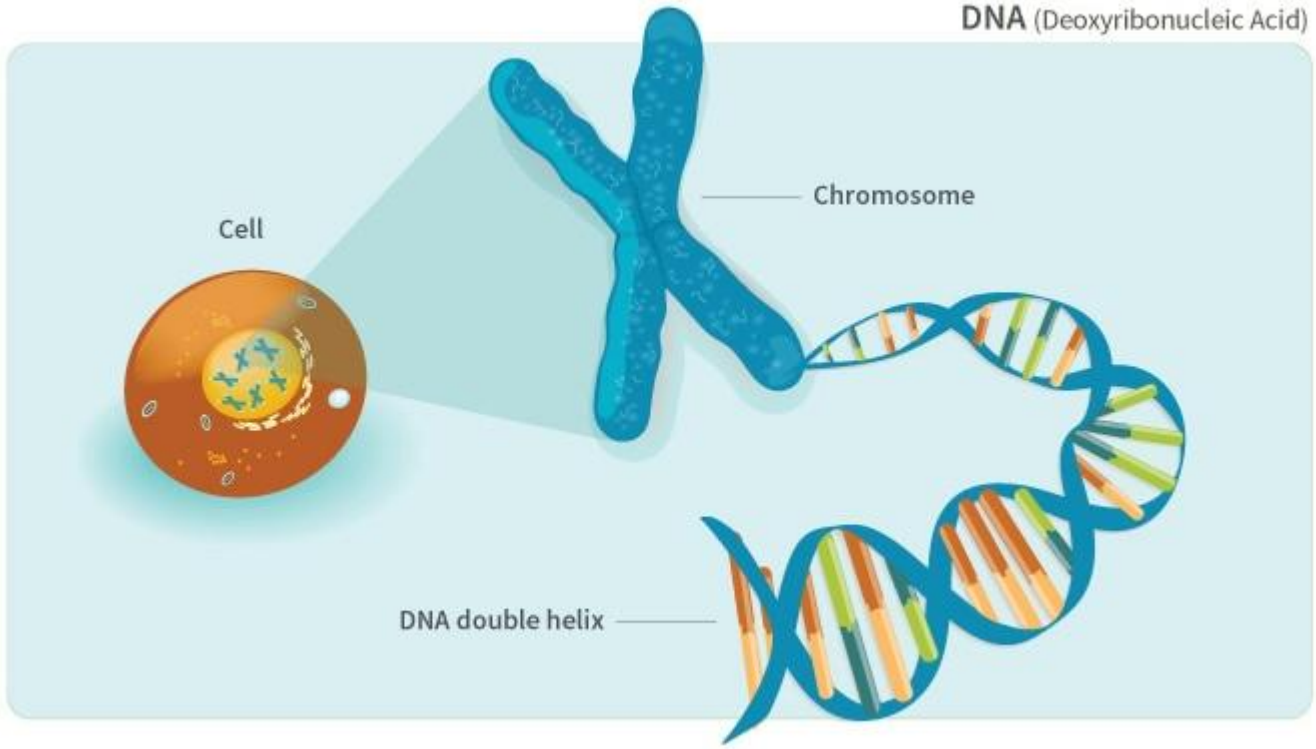
Development of DNA metabarcoding for the characterization of aerobiological samples

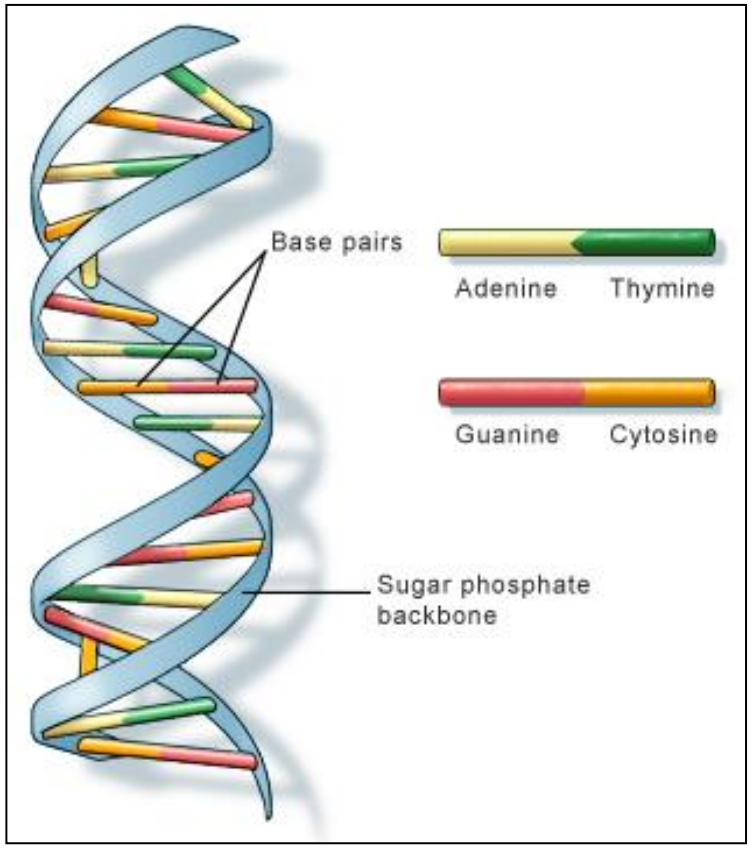
Lucia Muggia, Alberto Pallavicini, Elisa Banchi, Claudio G. Ametrano, David Stankovic, Silvia Ongaro, Enrico Tordoni, Mauro Tretiach

SCOPI DEL PROGETTO

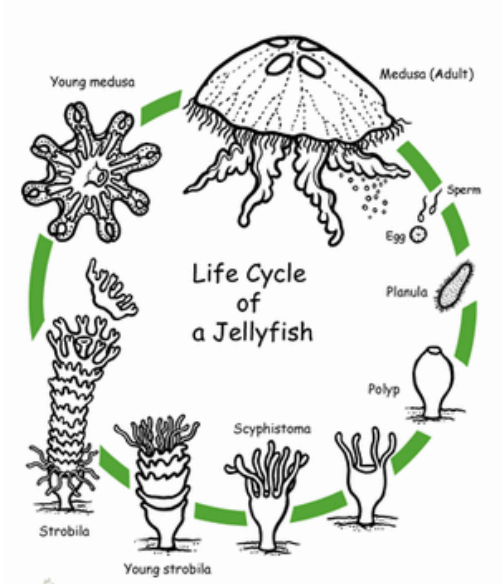
- Studiare la distribuzione di particelle aerobiologiche nello spazio e nel tempo in Italia
- Comparare i risultati con quelli della microscopia
- Identificare i principali fattori ambientali che influenzano la distribuzione di pollini e spore nell'aria
- Implementare di un database di sequenze di DNA di riferimento per piante e funghi

Perché il DNA?

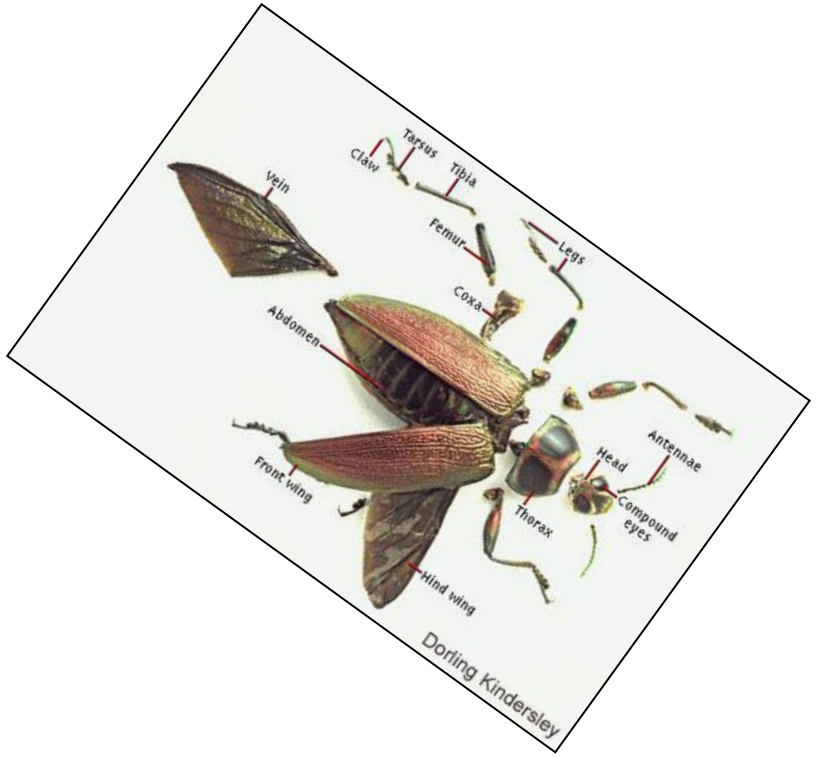




…GCTGTTGACTGCTA…

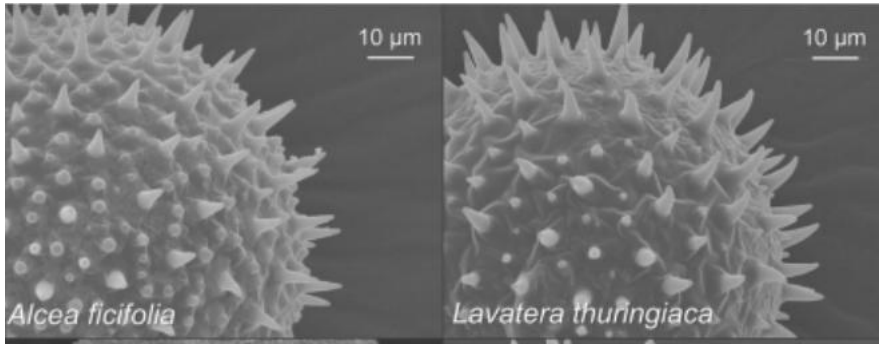












Konzmann et al. 2019

DNA Barcoding

Metodo tassonomico che usa una corta sequenza del DNA di un organismo per determinare la sua appartenenza ad una specie

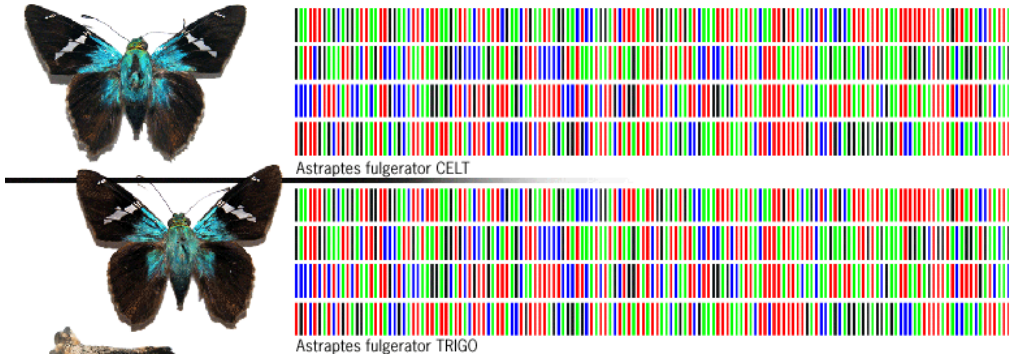
- breve tratto di DNA
- variabile tra le specie
- conservato all'interno della stessa specie
- semplice da amplificare e sequenziare



Biological identifications through DNA barcodes

Paul D. N. Hebert*, Alina Cywinska, Shelley L. Ball
and Jeremy R. deWaard

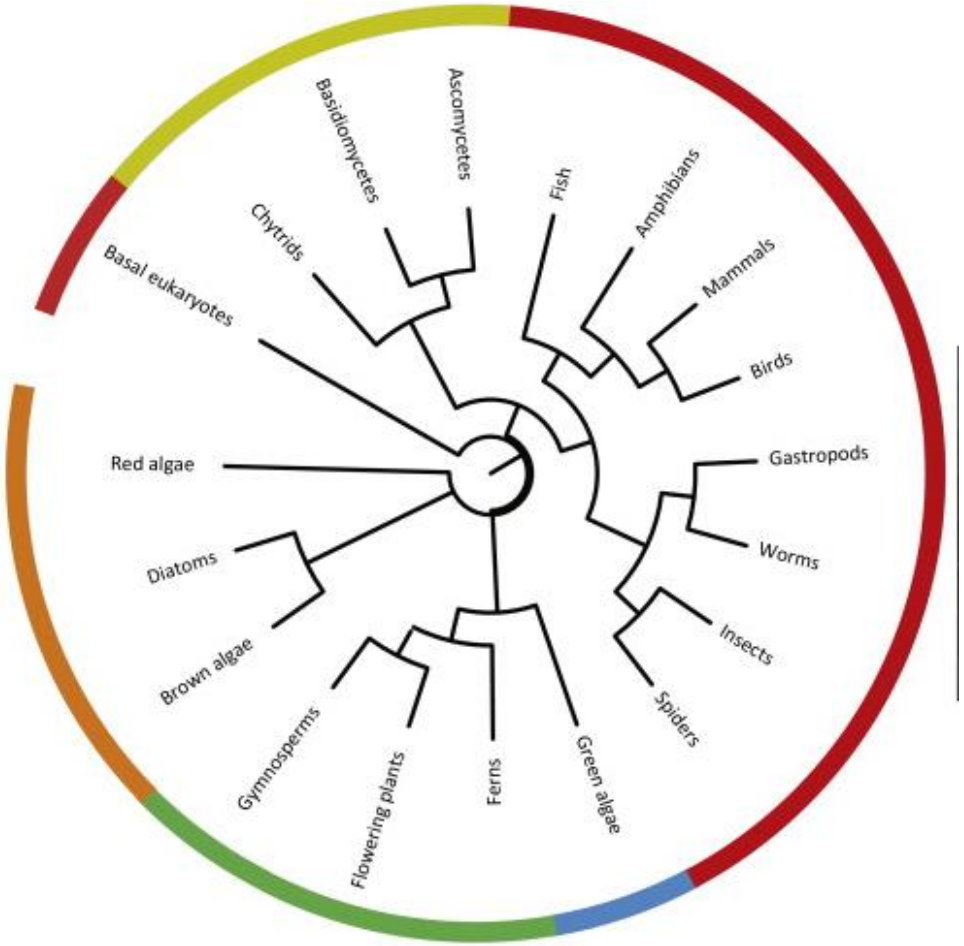
Department of Zoology, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada

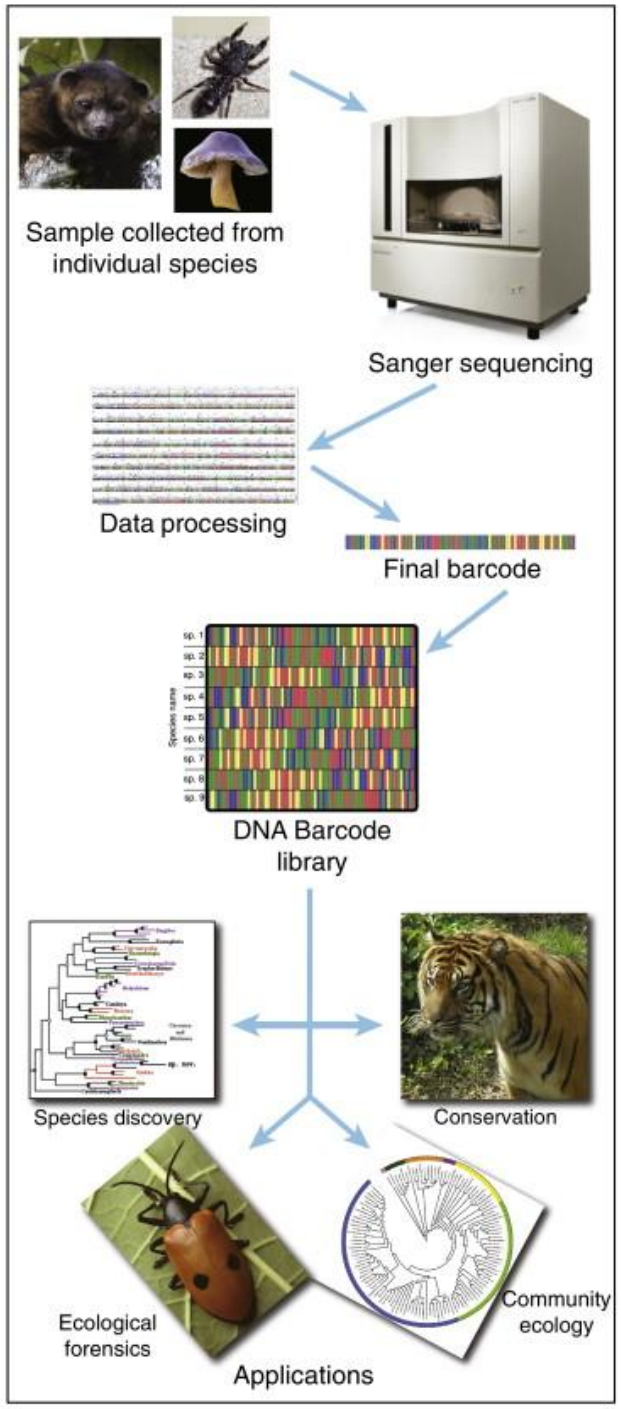


STANDARD BARCODES

Tree of life

Key:	Color	Clade	Primary barcode(s)	Secondary barcode(s)
		Animals	CO1	CO1, 16S
		Fungi	ITS	LSU D1/D2
		Green algae	*tuf*A	LSU D2/D3
		Land plants	*rbc*L/matK	*psb*A-*trn*H/ITS
		Algae	CO1-5P	LSU D2/D3





DNA barcoding

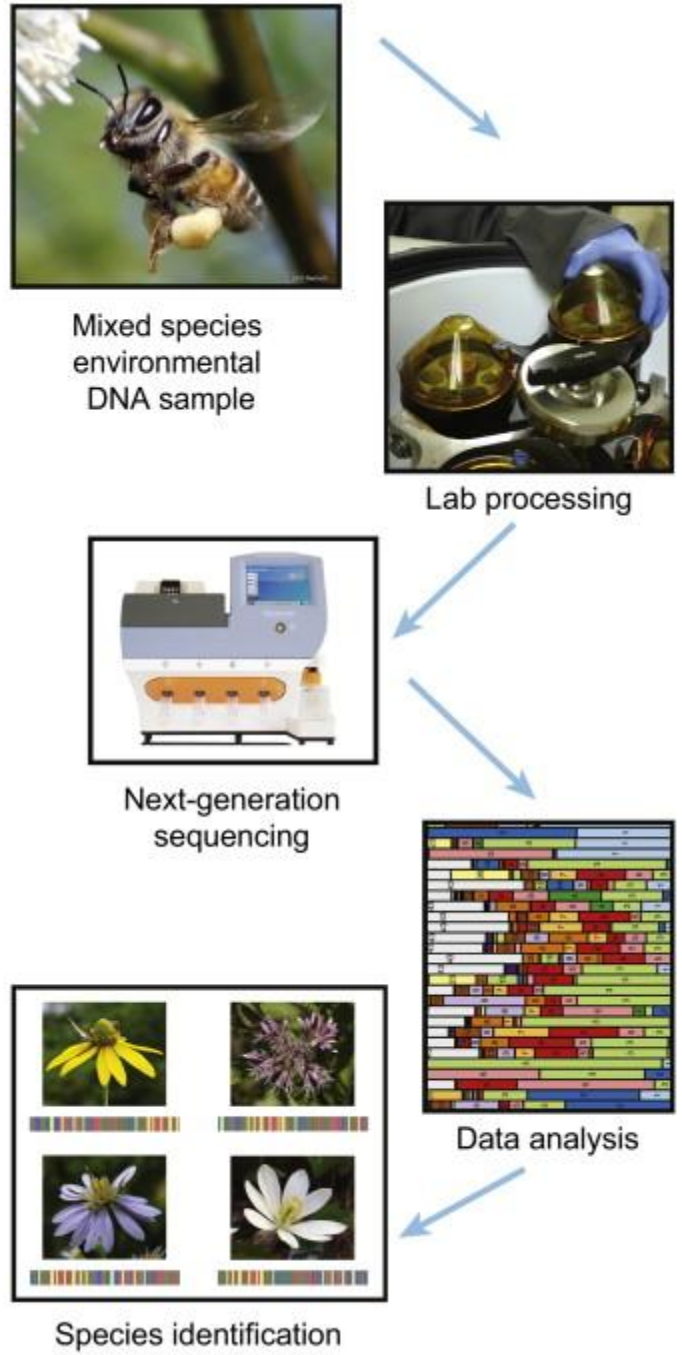
Estrazione DNA
Amplificazione (PCR)
Sequenziamento (Sanger)
Assegnazione tassonomica (Database)

DNA metabarcoding

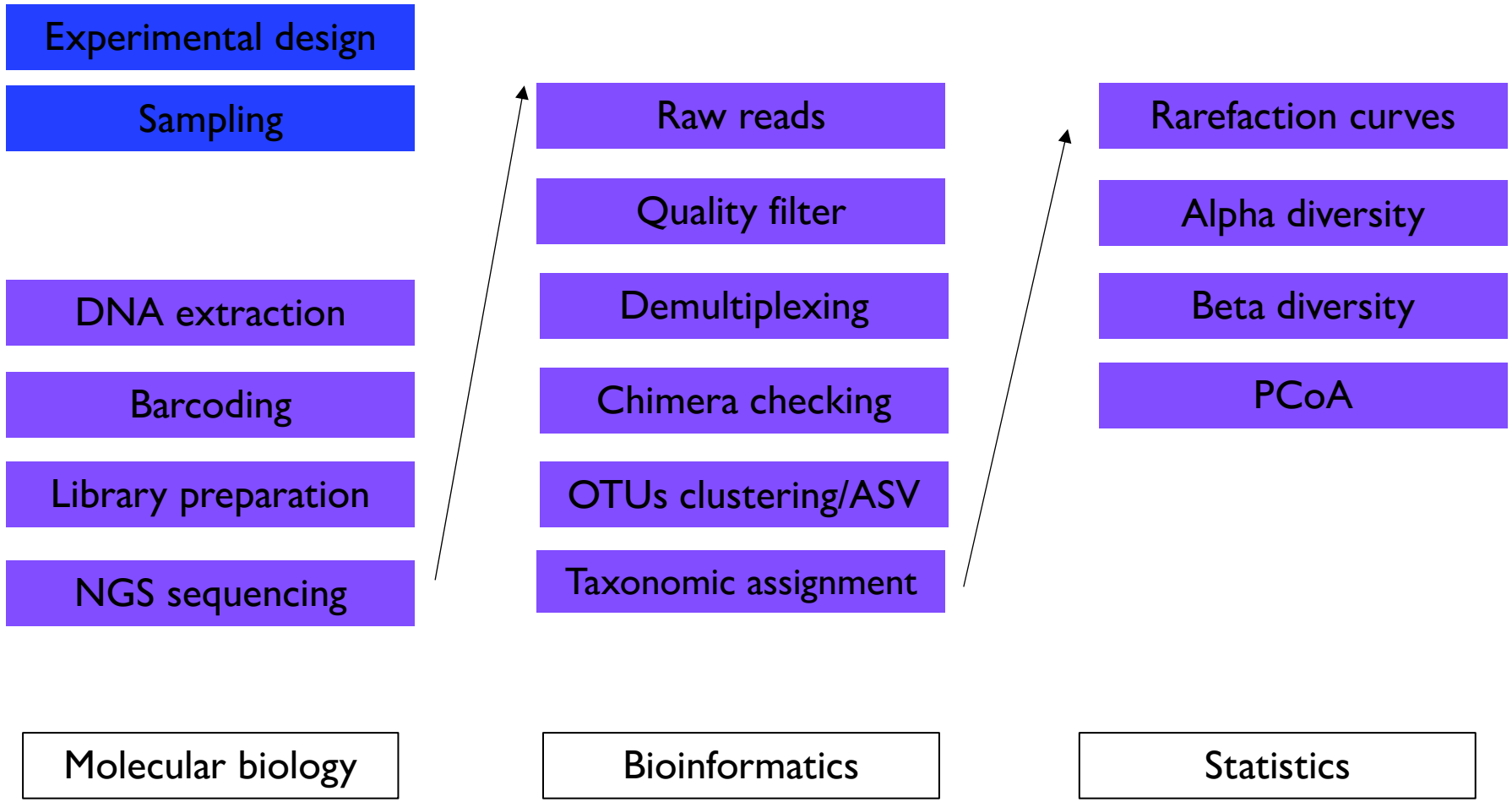
metodo di stima della biodiversità che combina:

- DNA barcoding
-Next Generation Sequencing (NGS)

CAMPIONI AMBIENTALI



Metabarcoding standard pipeline:



WHO IS THERE???

Tordoni, E., Ametrano, C.G., Banchi, E., Ongaro, S., Pallavicini, A., Bacaro, G., & Muggia, L. (2021). **Integrated eDNA metabarcoding and morphological analyses assess spatio-temporal patterns of airborne fungal spores**. *Ecological Indicators*, 121, 107032. doi: 10.1016/j.ecolind.2020.107032.

Banchi, E., Ametrano, C.G., Tordoni, E., Stanković, D., Ongaro, S., ARPA working group, Tretiach, M., & Muggia, L. (2020). **Environmental DNA assessment of airborne plant and fungal seasonal diversity.** *Science of the Total Environment*, 738, 140249. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140249.

Banchi, E., Ametrano, C.G., Greco, S., Stanković, D., Muggia, L., & Pallavicini, A. (2020). **PLANiTS: a curated sequence reference dataset for plant ITS DNA metabarcoding.** *Database*, 2020. doi: 10.1093/database/baz155.

Banchi, E., Pallavicini, A., & Muggia, L. (2019). **Relevance of plant and fungal DNA metabarcoding in aerobiology.** *Aerobiologia*, 36(1), 9-23. doi: 10.1007/s10453-019-09574-2.

Banchi, E., Ametrano, C. G., Stanković, D., Verardo, P., Moretti, O., Gabrielli, F., Lazzarin, S., Borney, M.F., Tretiach, M., Pallavicini, A., & Muggia, L. (2018). **DNA metabarcoding uncovers fungal diversity of mixed airborne samples in Italy.** *PLoS One*, 13(3), e0194489. doi: 10.1371/journal.pone.0194489.

Science of the Total Environment 738 (2020) 140249

Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

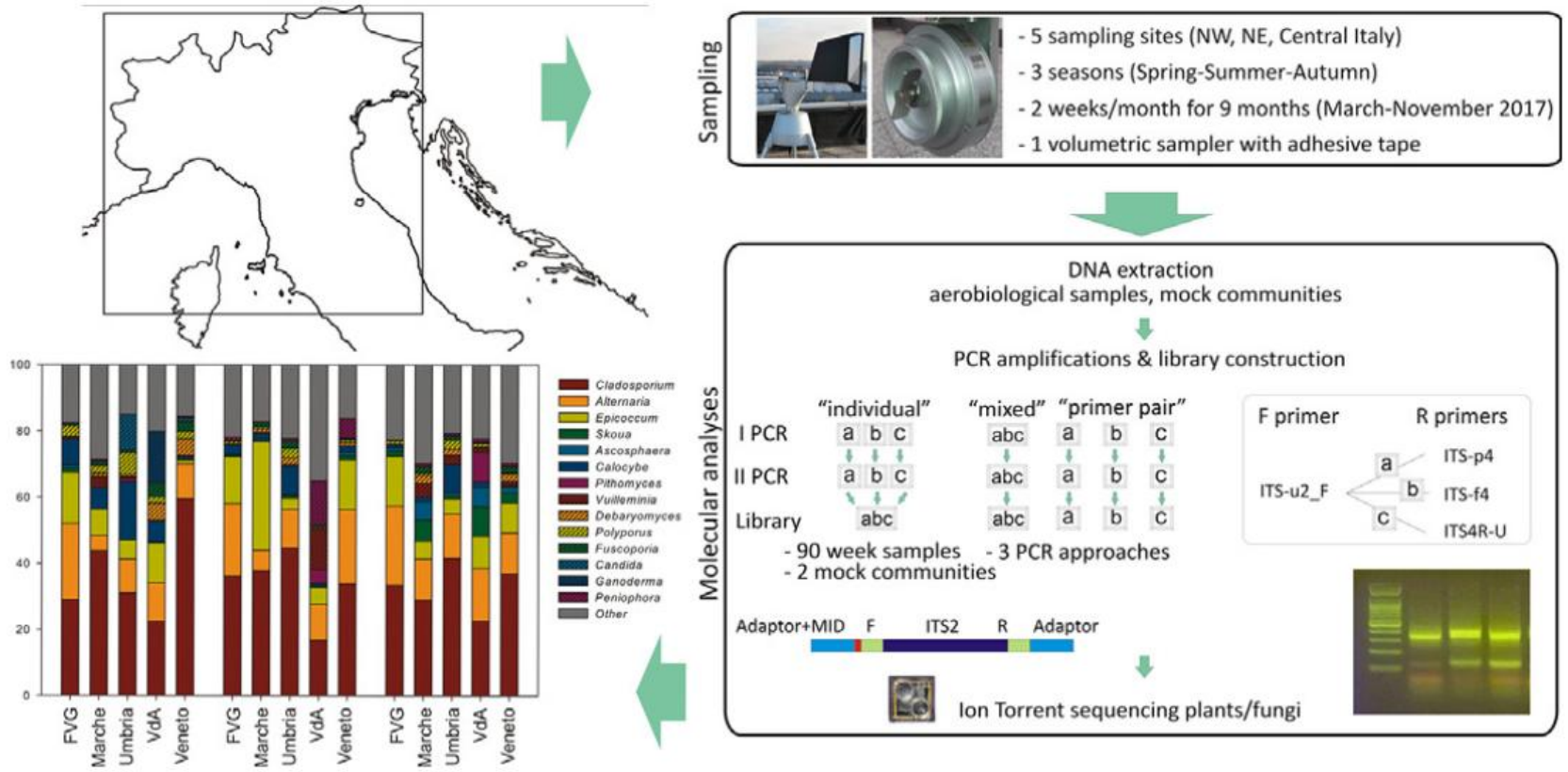
Environmental DNA assessment of airborne plant and fungal seasonal diversity

Elisa Banchi [1,2], Claudio G. Ametrano [1], Enrico Tordoni [1], David Stanković [1,3], Silvia Ongaro [1], Mauro Tretiach [1], Alberto Pallavicini [1,2,*], Lucia Muggia [1,**], ARPA Working Group:

Pierluigi Verardo [a], Francesca Tassan [a], Nadia Trobiani [b], Olga Moretti [c], Maria Francesca Borney [d], Stefania Lazzarin [e]

[a] ARPA Friuli Venezia Giulia, Italy
[b] ARPA Marche, Italy
[c] ARPA Umbria, Italy
[d] ARPA Valle d'Aosta, Italy
[e] ARPA Veneto, Italy

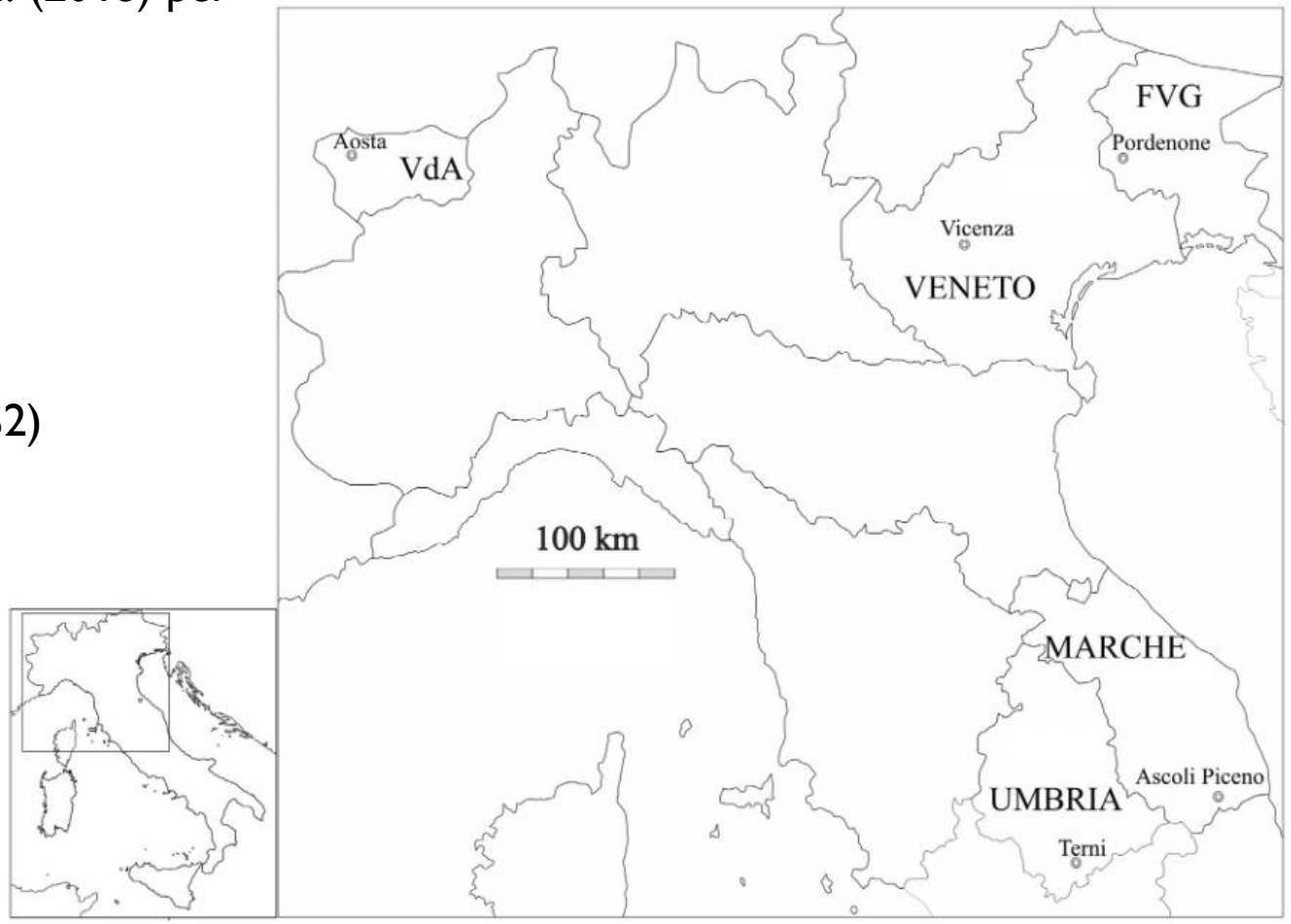
[1] Department of Life Sciences, University of Trieste, via Giorgieri 10, I-34127 Trieste, Italy
[2] National Institute of Oceanography and Applied Geophysics - OGS, via Piccard 54, I-34151 Trieste, Italy
[3] Marine Biology Station, National Institute of Biology, Fornače 41, SLO-6330 Piran, Slovenia



Principali obiettivi:

- valutare la diversità di piante e funghi aerodispersi considerando la loro variazione spazio-temporale
- consolidare e migliorare la pipeline di Banchi et al. (2018) per analizzare contemporaneamente piante e funghi

- 5 siti nel nord e centro Italia
- 9 mesi di campionamento (Mar-Nov 2017)
- 18 settimane per sito (90 campioni)
- Primo lavoro a co-amplificare piante e funghi (ITS2)
- Mock communites



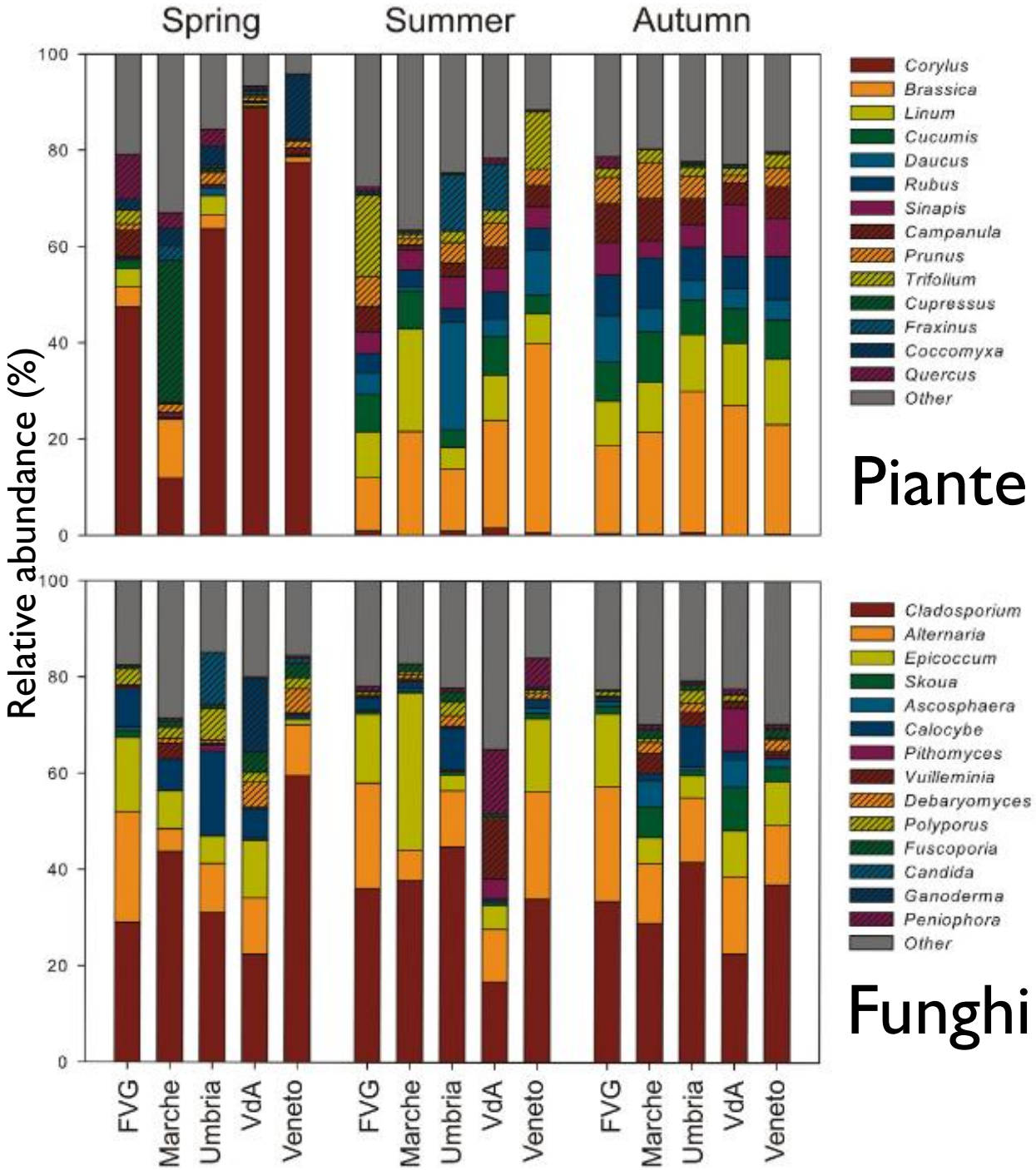
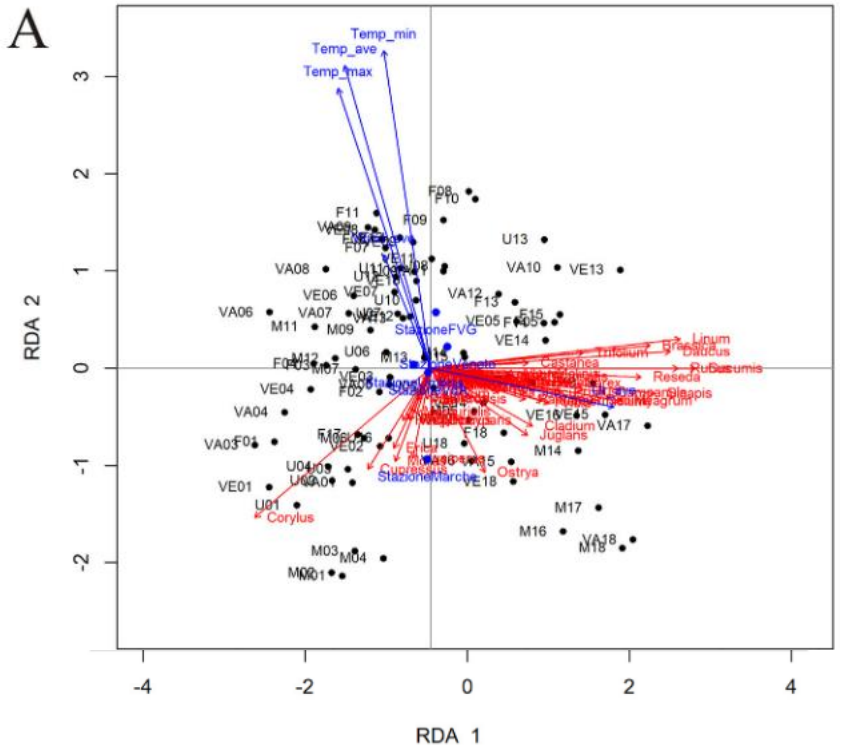


Table 3
PERMANOVA output calculated for plant and fungi datasets based on Bray-Curtis similarity and 4999 permutations of residuals under a reduced model.

Source of variation	df	MS	Pseudo-F	Variance explained (%)
Plants				
Site	4	2005.6	1.09	0.39*
Season	2	17,718	9.59***	23.16**
Site × Season	8	1863.9	1.01	0.12
Residual	72	1847	–	76.33
Fungi				
Site	4	3436.3	1.92***	4.16
Season	2	7323.5	4.09***	8.34
Site × Season	8	3271.6	1.83***	11.09
Residual	72	1790	–	76.41

*** $p < .001$.
** $p < .01$.
* $p < .05$.



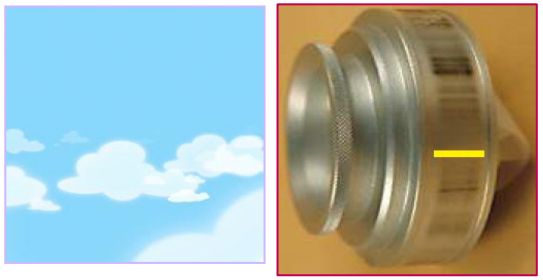
Risultati

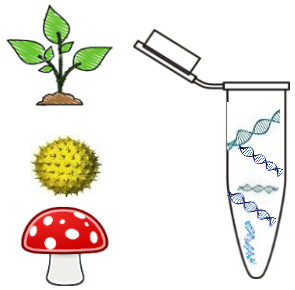
- Rilevamento di :

- 158 generi di piante (*Corylus* più abbond)
- 613 generi di funghi (*Cladosporium* più abbond)
- 43 specie piante aliene (12 specie invasive, *Robinia pseudoacacia* più abbond)
- 3 specie di fungi patogeni di piante
- Fino a **10 ×** il numero di taxa identificati con la microscopia

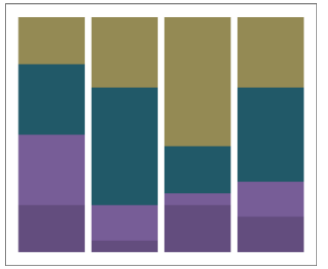
- Fattori ambientali:

- Effetto significativo della stagionalità per le piante
- Umidità relativa significativa per piante e funghi, Temperatura (min, max, avg) per piante





GCTACGTACGACTG
CGATCGATGCACCA
ATCATCACTGACCT
ATCAGCTGATCGGC



Conclusioni:

Conte al microscopio

Pro:
- ✓ quantitativo (poll/m^3)
- ✓ costi/tempi contenuti

Contro:
- ✓ operatore-dipendente
- ✓ attribuzione tassonomica meno dettagliata (fam.)
- ✓ Focus su taxa riconoscibili

DNA metabarcoding

Pro:
- ✓ accesso alla biodiversità totale
- ✓ attribuzione tassonomica più dettagliata
- ✓ operatore-indipendente

Contro:
- ✓ costi/tempi elevati (sempre meno…)
- ✓ non quantitativo (da solo…)





GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

ebanchi@ogs.it

