

## **Campanha de ciência cidadã do projeto ANERIS para observações genômicas marinhas**

**Caderno de amostragem de campo**  
com instruções pormenorizadas  
sobre como utilizar os kits de  
amostragem

## Tabela de conteúdos

<b>Introdução.....</b>	<b>3</b>
<b>Escolha dos locais de amostragem.....</b>	<b>5</b>
<b>Kit de amostragem de eDNA da água.....</b>	<b>7</b>
INSTRUÇÕES PARA O KIT DE ÁGUA.....	9
Filtrar a amostra de água.....	10
Preservar o filtro.....	12
Controlo negativo de campo (branco) para a água.....	14
<b>Kit de amostragem de eDNA de sedimentos.....</b>	<b>16</b>
INSTRUÇÕES PARA O KIT DE SEDIMENTOS.....	18
Recolher a amostra de sedimentos.....	18
Extrair eDNA do sedimento.....	19
Sedimento seco para granulometria.....	21
<b>Modelo de ficha de informação.....</b>	<b>23</b>

# Introdução

## Campanha de Ciência Cidadã do Projecto ANERIS para observações genómicas marinhas

O projeto ANERIS (operAtional seNsing lifE technologies for maRIne ecosystemS) financiado pelo Horizonte Europa introduz **o conceito de Biologia Marinha Operacional (OMB)**, que é definido como um sistema de informação sobre biodiversidade para quantificações de rotina sistemáticas e a longo prazo da vida oceânica e costeira, juntamente com a sua rápida interpretação e divulgação.

**Neste contexto, o ANERIS pretende desenvolver, testar e implementar a próxima geração de ferramentas e métodos científicos para a deteção e monitorização da vida marinha, integrando diferentes tipos de tecnologias de deteção: genómica, imagem e ciências participativas.**

Uma componente do projeto envolve o desenvolvimento de ferramentas de ciência cidadã para melhorar e operacionalizar ainda mais as iniciativas de observação marinha em toda a Europa. O conceito de OMB do projeto será validado através de quatro estudos de caso que envolvem diferentes infraestruturas de investigação.

**O Estudo de caso 2** visa complementar e alargar as redes de observação genómica existentes, utilizando os avanços tecnológicos e os procedimentos de baixo custo desenvolvidos no projeto. Utilizará e validará as seguintes tecnologias desenvolvidas no ANERIS:

**NANOMICS** - um protocolo para a identificação de múltiplas espécies com base em sequências de ADN (metabarcoding) utilizando a tecnologia Nanopore

**SLIM2.0** - um ambiente virtual para a análise bioinformática de dados genómicos, e

**MARGENODAT** - um fluxo de trabalho concebido para a gestão de dados de genómica marinha.

**A amostragem será efectuada utilizando dois kits diferentes de ciência cidadã**, um para a água do mar e outro para os sedimentos. O kit para água do mar é um produto comercialmente disponível (kit de amostragem Sylphium eDNA), anteriormente utilizado pela UNESCO durante o inquérito "Environmental DNA Expeditions in UNESCO World Heritage marine sites", enquanto o kit de amostragem de sedimentos foi especificamente desenvolvido pelo Centro Helénico para a Investigação Marinha (HCMR) para este projeto.

**O objetivo é** envolver 10 estações marinhas em toda a Europa da rede EMO BON, para recolher amostras de DNA ambiental da água e do sedimento em cada um dos 5 locais de amostragem costeira, para produzir um conjunto de mapas indicadores (produtos OMB) que ilustrem a diversidade de espécies, a variação genética intra-específica e a ocorrência de espécies não indígenas, utilizando as ferramentas desenvolvidas no ANERIS.

Os observatórios genómicos EMO BON são convidados a participar voluntariamente, contribuindo da forma que melhor se adapte às suas necessidades e requisitos operacionais.

**O projeto ANERIS fornecerá os kits de amostragem com instruções sobre a forma de os utilizar e fornecerá também formação online (<https://www.marinettraining.eu/node/5971>).**

## Escolha dos locais de amostragem

**Cada observatório marinho que participa no evento de amostragem do Estudo de Caso 2 da ANERIS tem de:**

- Determinar, antes do dia da amostragem, 5 locais de amostragem, distantes entre si 5-15 km.
- Recolher, para cada tipo de amostra (água e sedimentos), 5 amostras replicadas em cada local (mesma hora e local), mais um controlo de campo (branco).

Recomenda-se a recolha de amostras repetidas a uma distância de 10-20 metros uma da outra, podendo variar consoante a dimensão do habitat que está a ser amostrado.

### **Para a água:**

Recomendamos a recolha de amostras junto à costa. Os organismos-alvo são espécies de peixes, maioritariamente demersais.

### **Para sedimentos:**

No Atlântico e no Mar do Norte, é possível recolher sedimentos na zona entre-marés durante a maré baixa.

No Mediterrâneo, os sedimentos podem ser recolhidos por mergulhadores a 5-15 m de profundidade. Isto deve-se ao facto de, nas zonas costeiras com areia solta, a fauna de macroinvertebrados ter tendência a residir mais fundo devido à forte atividade das ondas.

**A amostragem dos sedimentos pode ser adaptada de acordo com as particularidades da zona.**

Os organismos-alvo são os macro-invertebrados do sedimento.

Cada amostragem fornecerá um retrato da biodiversidade marinha. O objetivo é que as estações marinhas recolham todas as amostras entre 20 e 30 de junho de 2025, mas este período pode variar.

O ideal é que cada estação marinha recolha todas as amostras numa ou duas datas consecutivas.

**Aviso:** Evitar fontes de contaminação, por exemplo, exposição a todas as atividades humanas, incluindo as bombas de esgoto dos navios, estações de limpeza de peixe ou zonas portuárias.

### Representação gráfica do esquema de amostragem:

Fig. 1 Exemplo de esquema de amostragem num local de amostragem no Mediterrâneo (Golfo de Heraklion, Grécia)



Fig. 2 Exemplo de esquema de amostragem num local de amostragem do Mar do Norte (Ostende, Bélgica)



## Kit de amostragem de DNA ambiental da água

Em cada um dos kits de recolha de amostras de água encontram-se os seguintes:





## **Kit de recolha de amostras de água (Sylphium®)**

### **Cada kit contém:**

- uma cápsula de filtro eDNA Dual com um conector de válvula de silicone
- uma seringa de 60 ml
- 3 mL de solução de conservação numa seringa de 5 ml
- duas tampas de fecho (uma no saco do filtro e a outra na seringa)
- saco de armazenamento para o filtro

### **As equipas locais têm de providenciar o seguinte:**

- luvas
- fichas de informação impressas e uma caneta (uma ficha por cada amostra, incluindo o negativo branco)
- água destilada (~2 litros por sítio). Disponível em supermercados e bombas de gasolina.
- 6 sacos de plástico de 5 litros ziplock (um por amostra)
- etiquetas numeradas (3 por kit)
- um recipiente de plástico (por exemplo, um balde) para pousar o saco de plástico sem verter durante a filtragem
- um recipiente de plástico 1 litro (por exemplo, copo medidor)
- um termómetro, ou uma sonda multiparámetro (temperatura, salinidade), se disponível
- um tubo falcon 50 mL por cada kit (para recolher amostras de salinidade)
- Um balde ou caixa térmica para armazenar e proteger as amostras da luz de sol directa.



## INSTRUÇÕES PARA O KIT DE ÁGUA

### Recolher metadados ambientais

- 1** Preencher as informações relativas à amostragem na **ficha de amostragem** (data, hora, local exato com coordenadas, pessoas envolvidas na amostragem, etc).
- 2** Registrar a temperatura da água à superfície no local de amostragem com a utilização de um termómetro. Anote esta informação na folha de informação da amostra.
- 3** Para determinar a salinidade, recolha 15 ml de água do local de amostragem num tubo Falcon de 15 ml, coloque uma etiqueta e coloque-o de volta no kit de amostras. O conhecimento da salinidade melhorará a análise final das amostras, uma vez que uma baixa salinidade pode revelar, por exemplo, o escoamento de terra.

### Recolher a amostra de água

- 4** Lavar o saco de plástico de amostragem três vezes, utilizando a água do local de amostragem.
- 5** Escolher o local de recolha. Se estiver perto da costa, procure recolher amostras o mais longe possível da terra para evitar a contaminação por escoamento terrestre.  
Em mar calmo e pouco profundo, pode filtrar diretamente do mar (a pé) submergindo a entrada na água. Neste caso, salte os passos 3-6 e efetue algumas filtrações de dois em dois metros.
- 6** Recolher a amostra de água por imersão do saco de recolha de amostras cerca de 30 cm abaixo da superfície. Encher o saco, cerca de 5 litros no total, com água recolhida em 5-10 pontos num raio de 2 m.
- 7** Abrir o saco e colocá-lo dentro do balde limpo e vazio (para suporte).

Uma pessoa deve segurar o saco de amostras enquanto a outra efetua a filtração.

**Nota:** Não tocar no interior do saco ou na água recolhida durante a recolha e filtragem da água.

Se estiver numa zona com fundo arenoso, deixe a amostra de água repousar durante alguns minutos antes de a filtrar, para permitir que a areia assente no fundo do saco.

## Filtrar a amostra de água

### 8 Colocar o filtro na seringa.

Avance devagar e com cuidado, pois o passo seguinte exige esforço e paciência. Se necessário, faça por turnos com a pessoa que segura o saco.



### 9 Enquanto a entrada (parte inferior, perto da seta a apontar para cima) do filtro está submerso na água de amostragem, filtrar a água do saco puxando o êmbolo da seringa até à linha dos 60 ml.



- 10** Deitar a água para fora do saco, empurrando o êmbolo. A água sairá pela outra extremidade da válvula do filtro.



- 11** Contar o número de vezes que a seringa é enchida e/ou a quantidade de água filtrada. Registrar na ficha de informação da amostra.
- 12** Quando o filtro estiver cheio, a filtragem abranda, ou seja, será mais difícil empurrar a água. Para continuar, empurrar o êmbolo da seringa devagar e deixar a água entrar no filtro lentamente. Consoante a localidade, o filtro pode ficar mais escuro.
- 13 O objetivo é repetir o processo 20-40 vezes (30 vezes = 1,8 litros)** bombeando continuamente a seringa e mantendo a parte inferior do filtro submersa.  
A quantidade total de água filtrada dependerá das condições locais. **Pare se a filtragem se tornar demasiado lenta ou demorar demasiado tempo (por exemplo, mais de uma hora).** Isto indica que o filtro está entupido.

**Aviso:** Evitar a formação de bolhas de ar no filtro, o que provocará o seu mau funcionamento. Para evitar que o ar seja aspirado, soltar o êmbolo da seringa antes de levantar a cápsula do filtro da água. Se aparecerem bolhas de ar no filtro durante a filtragem, estas podem ser facilmente removidas. Por exemplo, se a filtragem se tornar difícil após menos de 10 vezes, pode haver uma bolha de ar que esteja a obstruir o filtro. Neste caso, **consulte a secção "Como remover as bolhas de ar".**

## Preservar o filtro

- 14** Quando terminar, retire toda a água da cápsula de filtro eDNA Dual, levantando o filtro da água e utilizando a seringa para fazer passar o ar através do filtro. Manter a cápsula de filtro eDNA Dual ligada ao conector da válvula e à seringa durante este passo.

**Importante:** se não remover toda a água, o eDNA degradar-se-á.



- 15** Retirar a seringa e a válvula de silicone do filtro.
- 16** Colocar óculos de proteção e manusear o líquido de conservação com cuidado. Não engolir, evitar o contacto com a pele e os olhos e não derramar. Todo o líquido de conservação deve ser adicionado ao filtro, não sobrando nada.
- Nota:** Se aparecerem flocos brancos no líquido de conservação, aqueça-os segurando a seringa na mão até se dissolverem. Isto pode ocorrer se o líquido de conservação tiver sido exposto a temperaturas inferiores a +15°C.
- 17** Fechar a extremidade superior do filtro com a tampa da seringa pequena.



**18** Adicionar o líquido de conservação ao filtro a partir da



extremidade inferior (a da seta), utilizando a pequena seringa fornecida.

**Aviso:** Ter cuidado, pois o filtro vai ficar sob pressão. Para evitar que o líquido transborde, sem retirar a seringa, puxar e empurrar o êmbolo algumas vezes com cuidado para inserir devagar todo o líquido. Quando todo o líquido passar para o filtro e antes de retirar a seringa, aliviar a pressão do filtro puxando o êmbolo da seringa devagar para retirar todo o ar do filtro.



- 19** Fechar a extremidade inferior do filtro com a segunda tampa fornecida no kit de amostragem.
- 20** Colocar as três etiquetas fornecidas: **a.** no filtro, **b.** na amostra de salinidade e **c.** na folha de informações da amostra.
- 21** Colocar o filtro no seu próprio saco ziplock para o manter limpo durante o processamento da amostra.

- 22** Colocar todos os materiais, incluindo o filtro (no seu saco), a amostra de salinidade e a ficha de informações sobre a amostra, no saco original da amostra (amostras à temperatura ambiente).

**Aviso:** Manter os filtros afastados da luz solar direta, uma vez que a radiação UV pode degradar o DNA recolhido.

## Controlo negativo de campo para água

- 23** Depois de todas as amostras de água terem sido filtradas num local de amostragem, e ainda no campo, filtrar o controlo negativo (1,5 litros de água engarrafada) utilizando exatamente o mesmo protocolo.
- 24** Comece por registar a informação da amostra e indique na ficha de informação da amostra que se trata do controlo negativo. Não é necessário recolher metadados ambientais (local, hora, etc.).
- 25** Deitar a água engarrafada no saco de recolha de amostras e



proceder à filtragem e conservação da amostra como anteriormente.

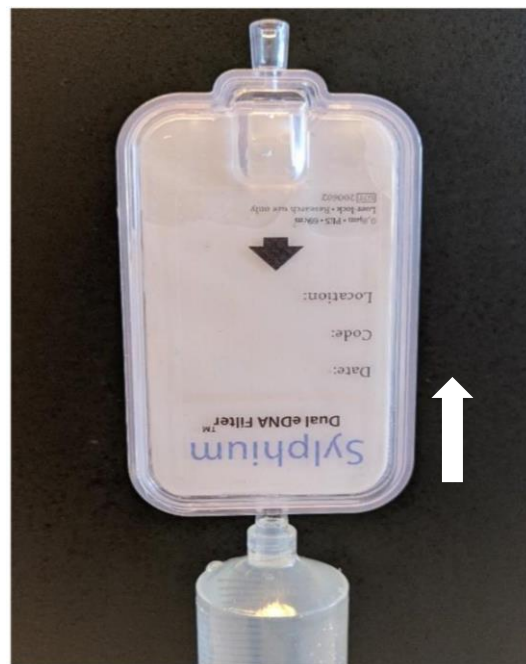
Nota: Eliminar os restantes resíduos de plástico de forma limpa e sustentável.

- 26** Todas as amostras devem ser mantidas no escuro e à temperatura ambiente, se possível (por exemplo, 20 °C). O mais importante é manter os filtros afastados da luz solar direta (por exemplo, numa caixa de cartão).

## COMO ELIMINAR AS BOLHAS DE AR

**Aviso:** Executar estes passos apenas se suspeitar que uma bolha de ar está a obstruir o filtro!

- 27** Desconectar o filtro da seringa e do conetor da válvula de silicone
- 28** Encher a seringa com água de amostra.
- 29** Ligar a seringa à saída da cápsula de filtro eDNA Dual.
- 30** Rodar o filtro para cima de modo a que as bolhas de ar se desloquem para a entrada.
- 31** Segurar a cápsula na vertical e empurrar o êmbolo da seringa até que todas as bolhas de ar sejam expelidas.
- 32** Voltar a ligar a cápsula filtrante e a seringa ao conetor da válvula e prosseguir com a amostragem.



**\*\*Aviso:\*\*** Não deixar sair água do filtro, pois isso provocará a perda de material já filtrado.

EXPEDIÇÃO DA UNESCO:

Fonte: <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000384014>

youtube video: <https://www.youtube.com/watch?v=NIqC7BhcS0s>



## Kit de amostragem de eDNA em sedimentos

Em cada kit de sedimentos, haverá:



## Cada kit de sedimentos contém:

- uma seringa de corte, estéril de 60 ml
- um saco de amostras com fecho de correr com a menção "PARA RECOLHA DE SEDIMENTOS"
- um recipiente cilíndrico de plástico de 400 ml com tampa de rosca
- um tubo de plástico com uma mistura pré-pesada de sais de fosfato (pó branco) rotulado "PS"
- uma colher de plástico descartável
- uma pipeta Pasteur de plástico descartável
- um tubo de plástico de 15 ml contendo 6 ml de conservante líquido, marcado como "PRESERVE"
- um pedaço de película aderente
- um tubo de plástico de 50 ml com a indicação "Para sedimentos secos"
- dois pares de luvas

## As equipas locais têm de providenciar o seguinte:

- ficha de informação impressa e uma caneta
- água destilada (~2 litros). Disponível em supermercados e bombas de gasolina.
- Um balde ou caixa térmica para proteger as amostras da luz de sol directa.

Usar **sempre** luvas durante a amostragem para evitar a contaminação. Toque apenas no equipamento de amostragem e mantenha-o tão limpo quanto possível. Guardar o equipamento num local limpo.

## INSTRUÇÕES PARA O KIT DE SEDIMENTO

Preencher as informações relativas à amostragem na ficha de amostragem (data, hora, local exato com coordenadas, tipo de sedimento, pessoas que efetuaram a amostragem, etc.).

*Nota:* Os kits de sedimento já vêm pré-etiquetados (código SXXXX; o saco de amostra com fecho zip, o tubo Falcon de 50 ml para SEDIMENTO SECO, e o tubo Falcon de 15 ml “PRESERVAR”). Anote este código na respetiva folha de informação da amostra.

Registe a temperatura da água de superfície no local de amostragem utilizando um termómetro. Escreva esta informação na folha de informação da amostra. Se recorrerem a mergulhadores, estes devem registar a temperatura imediatamente acima do sedimento.

### Recolher a amostra de sedimentos

- 1 Retirar a seringa de plástico, e o saco de amostras com fecho zip lock (com a etiqueta "sedimento").
- 2 Aceder ao local de amostragem a pé no período em que a maré está a descer.
- 3 Estender completamente o êmbolo da seringa.
- 4 Pressionar o corpo da seringa (e não pelo êmbolo) verticalmente no sedimento até estar quase cheio.
- 5 Abrir o saco de plástico, colocar a boca da seringa dentro do saco e empurrar o êmbolo para libertar o sedimento no saco.

**Aviso:** Não puxar o êmbolo completamente porque pode saltar fora da seringa



**6 Recolher 10 vezes a seringa cheia de sedimentos** (50 mL, subamostras) no total, num raio de cerca de 2 m, seguindo os passos 3-5, e colocá-los no mesmo saco.

6.a Os pontos de amostragem devem ter características semelhantes.

6.b Retire o excesso de água pressionando cuidadosamente os lados do saco e feche bem o saco.

**7** Levar o saco de recolha de amostras com o sedimento para a margem e retirar o excesso de água (se houver) como na etapa 6b.

### Extrair eDNA do sedimento

**8** Abra o **recipiente cilíndrico de plástico de 400 ml** e encha-o com **água destilada** exatamente até à primeira marcação (200 ml)

**9** Adicione todo o pó branco (sais de fosfato) do **tubo rotulado "PS"** ao recipiente de plástico com a água destilada batendo gentilmente algumas vezes no tubo.

*Nota:* Adicione o pó gradualmente para evitar a formação de grumos (agregados), caso contrário poderá ser mais difícil de dissolver, especialmente em condições de frio.



**10** Fechar bem a tampa do recipiente e misturar durante alguns minutos, agitando suavemente o recipiente até que o pó esteja completamente dissolvido.

**11** Misturar bem o sedimento, esfregando suavemente com a mão o saco a partir do exterior. Abrir o saco e misturar mais o



sedimento com a **colher de plástico**, se necessário. Ter cuidado para não tocar no sedimento com as luvas.

- 12** Transferir cuidadosamente, com a colher, parte do sedimento para o recipiente, enchendo-o até à segunda marcação (400 ml) [= volume total do tampão + sedimento].



- 13** Fechar bem a tampa e misturar suavemente a solução durante 15-30 minutos, invertendo o recipiente várias vezes. Certificar-se de que o sedimento está dissolvido na solução.

**Nota:** alguns sedimentos (por exemplo, lama) podem ser difíceis de dissolver bem. Pode agitar um pouco mais, mas não demasiado



- 14** Deixar o recipiente na posição vertical durante alguns minutos para permitir que o sedimento assente.

- 15** Utilizar a pipeta Pasteur de plástico descartável para transferir 6 ml do sobrenadante para o tubo de 15 ml marcado como "PRESERVE", enchendo até à marca de 12 ml. Fechar o tubo e misturar suavemente. Ter cuidado para não perturbar o sedimento durante a transferência do sobrenadante.



- 16 Envolver a tampa do tubo com película parafilme para o selar bem
- 17 Colocar os rótulos das amostras na folha de amostragem, no tubo "PRESERVE" e no tubo de 50 ml "For dry" e colocá-los todos juntos no pequeno saco com fecho de correr que continha a seringa e outros materiais.
- 18 Deite fora, de forma adequada, o sedimento e o tampão que permanecem no recipiente (**NÃO o sedimento que permanece no saco com fecho de correr**). Pode deitar o tampão no esgoto e o sedimento no lixo.

### Controlo negativo de campo (branco) para sedimentos

- 19 Para cada local de amostragem, deve executar um controlo de campo (amostra em branco) utilizando um novo kit de sedimentos da seguinte forma: encher o saco de amostras com fecho de correr (rotulado "sedimento") apenas com água destilada e executar os passos 8-18 como para as amostras reais (não é necessário misturar a solução durante 15-30 minutos, passo 13, basta fazê-lo durante alguns minutos).

### Sedimento seco para granulometria

- 20 Quando regressar ao laboratório, secar o resto do sedimento que permanece no saco numa estufa de laboratório a 60°C durante 2 dias. Para secar, pegue o sedimento e retire do saco e coloque num recipiente adequado (por exemplo, uma folha de papel de alumínio ou um disco de Petri de vidro largo). Não é necessário tomar precauções especiais nesta fase relativamente à contaminação.
- 21 Quando estiver completamente seco, encher o **tubo de 50 ml com a indicação "Para sedimentos secos"**, fechar a tampa e voltar a colocá-lo no saco para expedição.

## **\*PRECAUÇÕES\***

Evitar qualquer contacto (inalação, ingestão, contacto com a pele ou com os olhos) com o pó branco no tubo "PS" (contém sais de fosfato de sódio monobásico e dibásico) e com a solução no tubo "Buffer" (contém SDS, EDTA, base Trizma e NaCl).

Em caso de suspeita de sobre-exposição accidental:

**Em caso de inalação:** ar fresco.

**Em caso de contacto com a pele:** Retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Lavar a pele com água/chuveiro.

**Em caso de contacto com os olhos:** lavar abundantemente com água. Retirar as lentes de contacto.

**Em caso de ingestão:** beber água (dois copos no máximo). Consultar um médico se não se sentir bem.

**Para a produção de este campo amostragem brochura, utilizámos informações e fotografias de**

- ☐ [Caderno de Amostragem de Campo da "Expedição de ADN ambiental em sítios marinhos do Património Mundial da UNESCO"](#)
- ☐ [instruções para o conjunto de amostragem Sylphium eDNA \(#SYL009\)](#)



## Modelo de ficha de informação

**Tipo de amostra:**

- água
- sedimento
- controlo água
- controlo sedimentos

**Nome(s):** \_\_\_\_\_

**email(s):** \_\_\_\_\_

**ID da amostra:** \_\_\_\_\_

**Local:** \_\_\_\_\_

**Data-Hora:** \_\_\_\_\_

**Coordenadas (em decimais)**

**Lat:** \_\_\_\_\_ **Lon:** \_\_\_\_\_

**Dados ambientais**

Temperatura da água (°C): \_\_\_\_\_

Amostra de salinidade recolhida: Sim Não

Amostra de sedimentos recolhida para granulometria: Sim  
Não

**Para amostras de água**

Número de vezes que a seringa de 60 ml foi bombeada:

\_\_\_\_\_

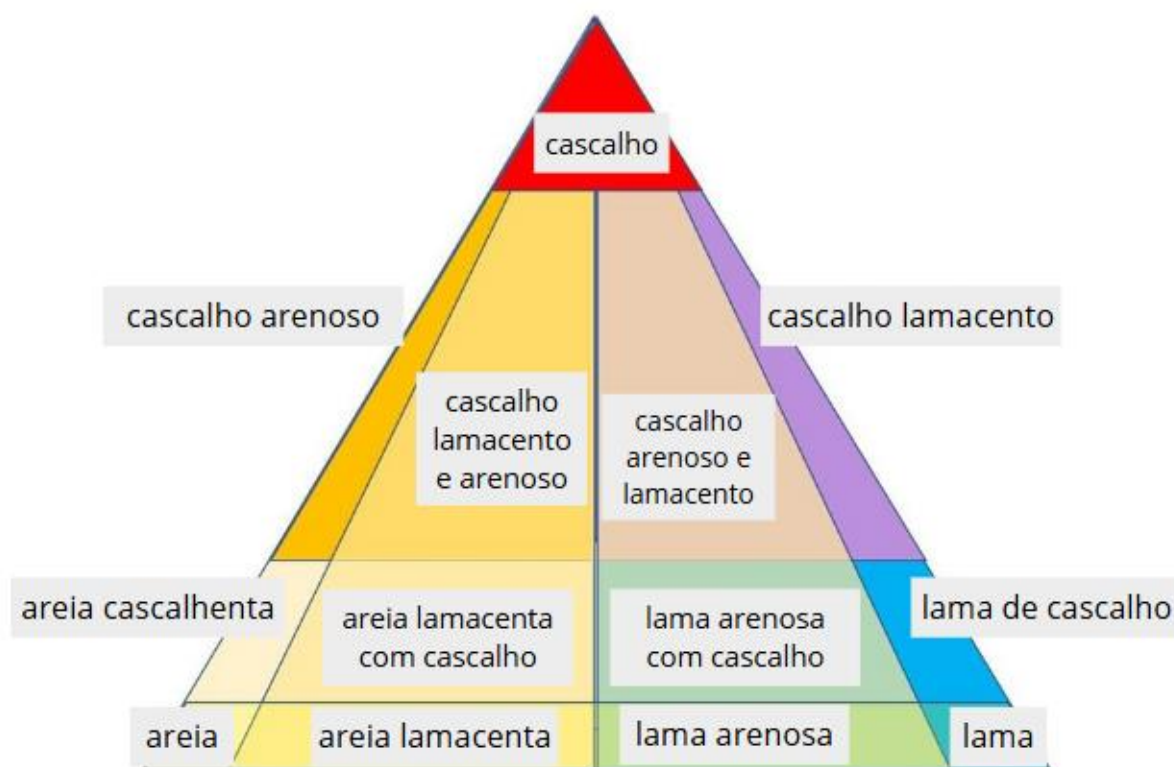
## NOTAS:

---

---

---

**Para amostras de sedimentos:** assinalar com um círculo o tipo de sedimento recolhido



**Para amostras de água e de sedimentos:** Descreva o tipo de habitat em que efetuou a amostragem:

---

---

---

---

---

---