

# **Ugotavljanje prisotnosti tujerodnih vrst potočnih rakov na območju Krajinskega parka Ljubljansko barje**

Poročilo



**CKFF**  
CENTER ZA KARTOGRAFIJO  
FAVNE IN FLORE

Miklavž na Dravskem polju  
november 2019

# **Ugotavljanje prisotnosti tujerodnih vrst potočnih rakov na območju Krajinskega parka Ljubljansko barje**

Poročilo

**Naročnik:**

**Javni zavod Krajinski park Ljubljansko barje  
Podpeška cesta 380  
SI-1357 Notranje Gorice**

**Izvajalec:**

**Center za kartografijo favne in flore  
Antoličičeva 1  
SI-2204 Miklavž na Dravskem polju**

**Vodja projekta:**

**Marijan Govedič, univ. dipl. biol.**

Datum:  
14. 11. 2019

Center za kartografijo favne in flore

Direktor  
Marijan Govedič

## **SEZNAM DELOVNE SKUPINE**

### **Center za kartografijo favne in flore Antoličičeva 1, SI-2204 Miklavž na Dravskem polju**

Marijan Govedič, univ. dipl. biol. – vodja projekta, terensko delo, poročilo  
Ali Šalamun, univ. dipl. biol. – kartografija

### **Zunanji sodelavci**

dr. David Stankovič, univ. dipl. biol. – odvzem vzorcev za okoljsko DNA (eDNA)  
prof. dr. A. Pallavicini (Department of Life Sciences, University of Trieste) – genetske analize  
dr. Chiara Manfrin (Department of Life Sciences, University of Trieste) – genetske analize

Priporočen način citiranja:

Govedič, M., 2019. *Ugotavljanje prisotnosti tujerodnih vrst potočnih rakov na območju Krajinskega parka Ljubljansko barje*. Poročilo. Center za kartografijo favne in flore, Miklavž na Dravskem polju. 13 str., pril. [Naročnik: Krajinski park Ljubljansko barje, Notranje Gorice.]

Sestavni del poročila so digitalni podatki (shp, xls format).

## KAZALO

<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>3</b>
<b>KAZALO TABEL</b> .....	<b>3</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>4</b>
<b>2. METODE DE LA</b> .....	<b>5</b>
<b>3. REZULTATI IN DISKUSIJA</b> .....	<b>8</b>
<b>4. PREDLOG NADALJNIH UKREPOV</b> .....	<b>11</b>
<b>5. VIRI IN LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
<b>6. PRILOGA: POROČILO GENETSKIH ANALIZ</b> .....	<b>13</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Mesta ugotavljanja prisotnosti tujerodnih vrst potočnih rakov na območju Krajinskega parka Ljubljansko barje v letu 2019 z metodo lova v vrše. ....	6
Slika 2: Mesta ugotavljanja prisotnosti tujerodnih vrst potočnih rakov na območju Krajinskega parka Ljubljansko barje v letu 2019 z metodo okoljske DNA (eDNA).....	7
Slika 3: Jelševci ( <i>Astacus astacus</i> ) iz ribnika pri RD Vrhnika. (foto: Marijan Govedič).....	8
Slika 4: Prvoletni krap ( <i>Cyprinus carpio</i> ) iz Lahovega grabna. (foto: Marijan Govedič) .....	9
Slika 5: Erozijski brežin potoka Bistra zaradi pašne govede. (foto: Marijan Govedič).....	10

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Seznam in koordinate lokacij odvzema vzorcev vode okoljske DNA (eDNA).....	6
--	---



## 1. UVOD

Tujerodne vrste potočnih rakov so v zadnjem času postale v Evropi pereč problem pri ohranjanju tako domorodnih vrst potočnih rakov kot vodnih ekosistemov v celoti (Souty-Grosset in sod. 2006). Na domorodne vrste, kot so koščak (*Austropotamobius torrentium*), koščeneč (*Austropotamobius pallipes*) in jelševac (*Astacus astacus*) imajo tujerodne vrste neposredni negativni vpliv prek kompeticijskega izrivanja (Holdich in sod. 2009), še bolj pereče pa je prenašanje bolezni, zlasti račje kuge (Edgerton in sod. 2002).

Za omejevanje širjenja tujerodnih vrst in omejevanje škode je ključno zgodnje odkrivanje populacijskih zametkov in hitro ukrepanje z eradikacijo (Lockwood in sod. 2007). Načini omejevanja tujerodnih populacij v kasnejših invazivnih stopnjah so sicer možni, a dokaj dragi in predvsem ne omogočajo popolnega iztrebljenja, pač pa le zmanjševanje populacije, kar predstavlja nenehno aktivnost in s tem večji stalni finančni vložek (Aquiloni in sod. 2009).

Čeprav je Slovenija v primerjavi z zahodno evropskimi državami s tujerodnimi vrstami potočnih rakov še dokaj nenaseljena država (Kouba in sod. 2014), pa je bilo v naravi ugotovljenih že pet vrst tujerodnih potočnih rakov: signalni rak (*Pacifastacus leniusculus*), rdečeškarjevec (*Cherax quadricarinatus*), trnavec (*Orconectes limosus*), močvirski škarjar (*Procambarus clarkii*) in ozkoškarjevec (*Astacus leptodactylus*) (Govedič in sod. 2015, Govedič & Miličič 2019, Govedič 2019).

Na Ljubljanskem barju nobena od tujerodnih vrst potočnih rakov še ni bila potrjena, vendar obstaja zaradi bližine Ljubljane in pomembne tranzitne poti, ki poteka po severnem robu Krajinskega parka Ljubljansko barje, povečana grožnja njihovega vnosa.

Namen naloge je bil ugotoviti morebitno prisotnost tujerodnih vrst potočnih rakov v vnaprej izbranih potokih na Ljubljanskem barju s kombinacijo metode lova z vršami in analizo okoljske DNA. V zadnjih letih so namreč razvili metodo potrjevanja prisotnosti organizmov na podlagi sledi okoljske DNA v vodi (eDNA), ki omogoča hitro zaznavo vrst, še posebej kadar so v nizkem številu in jih je težje odkriti s klasičnimi metodami vzorčenja.

## 2. METODE DELA

Območja raziskave razširjenosti so bila določena v projektni nalogi. Vzorčenje je bilo predvideno v naslednjih vodah: ribniki pri Vrhniku in Bistri, reka Ljubljanica pri Vrhniku in Podpeči, potok Bistra, potok Zrnica, Pekov graben, Tončkov jarek, potok Drobotinka, Posmreški jarek, kanal Curnovec, Iščica, Prošča in Lahov graben. Projektna naloga je predvidela vzorčenje z vršami in odvzem vzorcev vode za okoljsko DNA analizo testa na tri vrste (slika 1, 2).

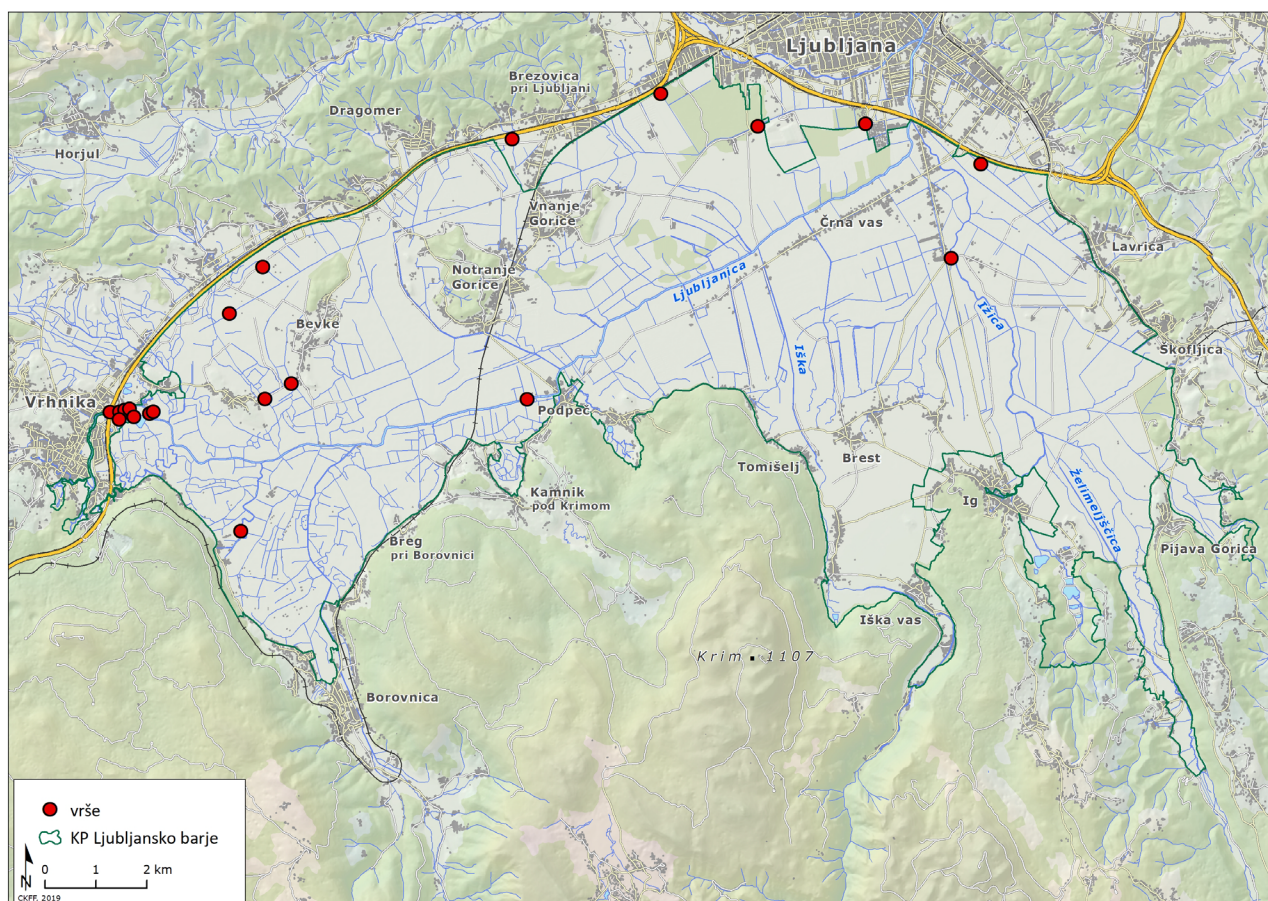
Točna mesta za postavitve vrš in odvzem vode smo izbrali glede na dostopnost posameznih lokacij, obrežno zarast in lokalno hidromorfologijo struge (tip brežine, dna...).

Metoda vzorčenja z vršami je povzeta po Govedič in sod. (2015) in zahteva najmanj dva obiska vsake lokacije. Na vsa mesta postavimo vrše istega tipa, na posamezni lokaciji pa so vse vrše postavljene samo eno noč. Na vsako lokacijo postavimo 6 vrš, predvsem zato, da bi jih v primeru izločitve (zaradi uničenja ali poškodovanja) iz statistične obdelave, še vedno ostalo vsaj 5. Vrše v potoku vedno razporedimo približno enakomerno, na vsakih 10 do 20 m, tako da je v idealnih razmerah odsek s šestimi vršami dolg približno 100 m. V manjših potokih so razdalje med vršami navadno večje, saj so dovolj globoki tolmuni lahko med seboj oddaljeni več kot 20 m, skupna lovna razdalja pa je tako tudi 200 m. V primeru, da se globlji odsek potoka razteza več kot 20 m, se v njega namesti le ena vrša, naslednjo vršo pa se namesti v naslednji globlji del potoka, ki ga od tega odseka loči plitvina. V takšnih daljših odsekih vrše vedno namestimo v zgornjo (gorvodno) tretjino globljih odsekov, saj domnevamo, da večina rakov pride do vrše proti toku, ki odplavlja vonj vabe. Za vabo uporabljamo sveža goveja ali svinjska jetra.

Vrše smo nastavljali ob jesenskih nizkih vodostajih, ko je verjetnost ujetja največja. Vedno smo vzorčili vsaj nekaj dni po deževju ob normalnem vodostaju, ko lahko v čisti prosojni vodi raka tudi enostavno opazimo in ujamemo.

Vse domorodne rake (jelševce) smo izmerili in jim določili spol. Na mestu najdbe smo jih nato žive vrnili nazaj v vodo. Popisali in prešteli smo tudi druge živali, ki so se ujele v vrše. Vsi ti podatki so predani naročniku v digitalni obliki in so dostopni na spletu ([povezava na BioPortal](#)). V poročilu izpostavljamo le najbolj zanimive najdbe.

Terenske raziskave so potekale na podlagi dovoljenja za ujetje, vznemirjanje in odvzem vseh vrst potočnih rakov (Crustacea: Astacidae) Centru za kartografijo favne in flore pod šifro 35601-35/2010-6.



Slika 1: Mesta ugotavljanja prisotnosti tujerodnih vrst potočnih rakov na območju Krajinskega parka Ljubljansko barje v letu 2019 z metodo lova v vrše.

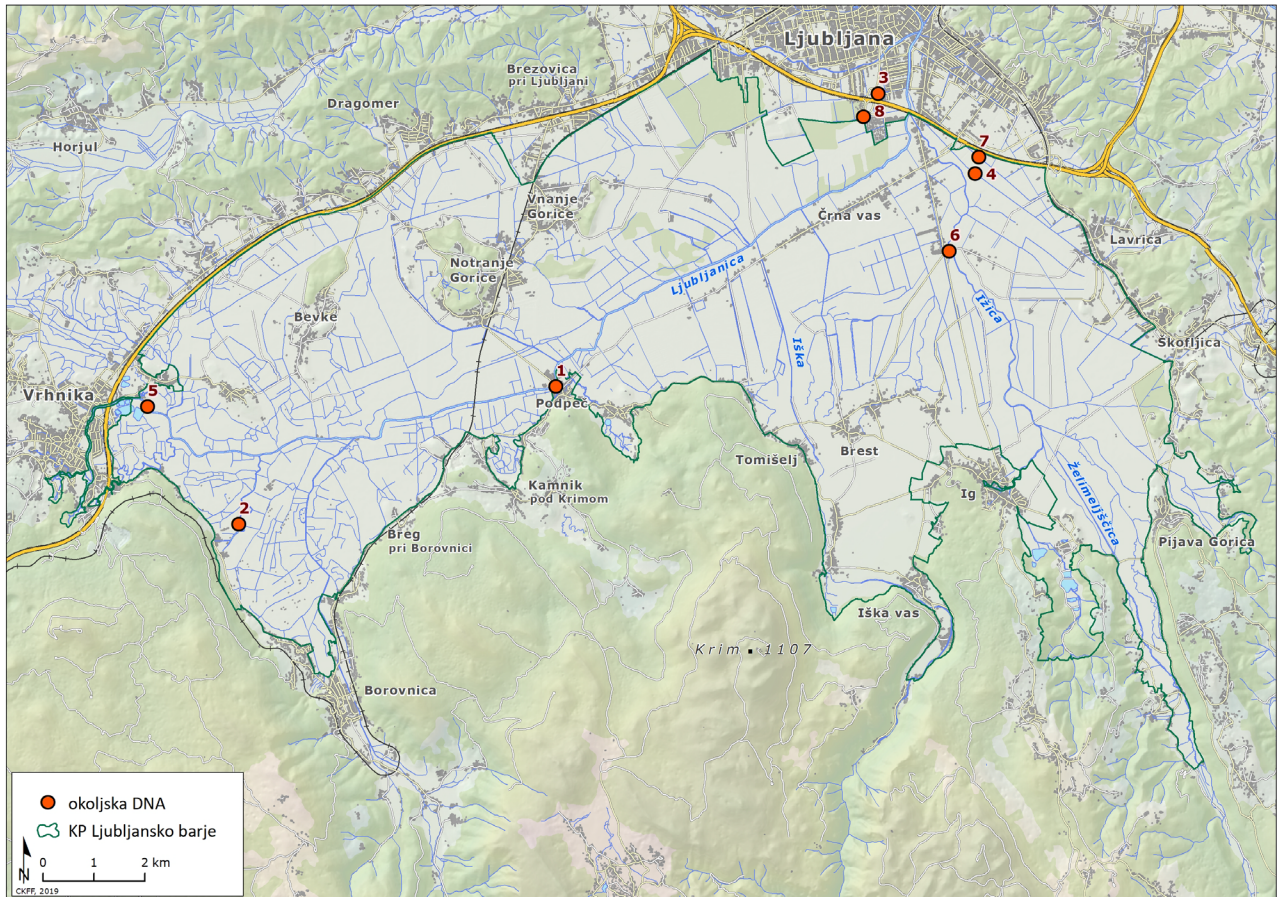
Vzorce za analizo vode smo vzeli v času aktivnosti potočnih rakov 16. in 19. 10. 2019. Septembra in oktobra je bilo nekaj padavinskih dni, ki so vplivali na nekoliko višje pretoke, vendar se je šele takrat na nekaterih lokacijah (npr. v Prošči in Lahovem grabnu) vzpostavil minimalni pretok. Hkrati padavin ni bilo preveč in pretok ni bil prevelik, da bi bila okoljska DNA preveč razredčena. Pri odvzemu vzorcev smo se držali dobre prakse in sterilnosti, predvsem z vidika kontaminacije s človeškimi encimi na koži. Uporabili smo 0,45 $\mu$ l sterivex filter.

Tabela 1: Seznam in koordinate lokacij odvzema vzorcev vode okoljske DNA (eDNA).

Št. vzorca ustreza številkam na Sliki 1.

Št. vzorca	Vzorčno mesto	X	Y	Količina prefiltrirane vode (ml)
1	Ljubljanica – Podpeč	455343	92449	540
2	Bistra	449107	89739	1560
3	Curnovec – S krak	461669	98193	180
4	Prošča	463577	96624	420
5	Ljubljanica – Vrhnika	447316	92054	1380
6	Iščica	463069	95100	900
7	Lahov graben	463646	96948	600
8	Curnovec – J krak	461384	97741	420





Slika 2: Mesta ugotavljanja prisotnosti tujerodnih vrst potočnih rakov na območju Krajinskega parka Ljubljansko barje v letu 2019 z metodo okoljske DNA (eDNA).

(številke na karti ustrezajo številkam vzorcev v Tabeli 1)



### 3. REZULTATI IN DISKUSIJA

V vrše na izbranih lokacijah na Ljubljanskem barju v letu 2019 nismo ujeli tujerodnih vrst potočnih rakov. Prav tako test okoljske DNA ni pokazal prisotnosti testiranih tujerodnih vrst potočnih rakov.

Od drugih vrst potočnih rakov smo v ribniku pri RD Vrhnika ulovili večje število domorodnih jelševcev (*Astacus astacus*) (slika 3). Vrše smo tam nastavili še v povezovalni kanal z reko Ljubljanico ter v reko Ljubljanico nad in pod ribniki, a tam jelševcev nismo ulovili. Tudi v ribnikih v nekdanjem glinokopu jelševcev nismo ulovili, čeprav so bili tam ulovljeni pred leti (CKFF 2019).



Slika 3: Jelševci (*Astacus astacus*) iz ribnika pri RD Vrhnika. (foto: Marijan Govedič)



Od drugih vrst velja izpostaviti najdbe kaplja (*Cottus gobio*) v reki Ljubljanici in ulov prvoletnih krapov (*Cyprinus carpio*) v Lahovem grabnu (slika 4). Ulov teh krapov dokazuje njihovo drst na Ljubljanskem barju. Ob Curnovcu in Iščici smo opazili večje število invazivnih nutrij (*Myocastor coypus*).



Slika 4: Prvoletni krap (*Cyprinus carpio*) iz Lahovega grabna. (foto: Marijan Govedič)

Pri terenskem delu smo opazili tudi nekatere druge negativne vplive. Negativni vpliv paše smo opazili pri Bistri, kjer velika živina (govedo) s tacanjem vpliva na erozijo brega, zaradi katere se iz zemljine sprošča fosfor, ki pospešuje eutrofikacijo (slika 5).

V času nastavljanja vrš v Tončkov graben (29. 8. 2019; 14:00) je bila voda bela kot milnica. To je običajno znak izpuščanja odpadnih vod v potoke. Naslednji dan ob pobiranju vrš je bila voda spet bistra.



Slika 5: Erozijske brežine potoka Bistra zaradi pašne govede. (foto: Marijan Govedič)



## 4. PREDLOG NADALJNIH UKREPOV

Glede na letošnje rezultate je smiselno odvzeti dodatne vzorce vode za test okoljske DNA na dvomljive vrste.

Na Ljubljanskem barju zaenkrat še ni bila najdena nobena invazivna vrsta potočnega raka. Vendar pa zaradi bližine prestolnice obstaja velika verjetnost izpusta kakšne od vrst. Zato je smiselno, da se v prihodnosti vzpostavi redni monitoring potencialne prisotnosti invazivnih rakov z metodo okoljske DNA v tekočih vodah. V ribnikih in jezerih naj zaenkrat ostane metoda vzorčenja z vršami.

Trenutno smo preverjali stanje invazivnih vrst potočnih rakov vezanih na *Uredbo (EU) št. 1143/2014 Evropskega parlamenta in Sveta o preprečevanju in obvladovanju vnosa in širjenja invazivnih tujerodnih vrst*. Na Ljubljanskem barju pa se potencialno lahko pojavlja tudi ozkoškarjavec, ki je v prosti prodaji v boljše založenih ribarnicah in trgovini Leclerc. Zato predlagamo, da se omenjeno vrsto vključi v vzorčenje invazivnih vrst z metodo okoljske DNA.

V Ribiško gojitvenem načrtu Ribiških družin na Ljubljanskem barju so potočni raki navedeni še za kar nekaj vod, ki v zadnjih letih niso bile raziskane. Predlagamo, da se te vode raziščejo, saj še vedno obstaja lokalna možnost prisotnosti tujerodnih vrst potočnih rakov.



## 5. VIRI IN LITERATURA

- Aquiloni, L., A. Becciolini, R. Berti, S. Porciani, C. Trunfio & F. Gherardi, 2009. Managing invasive crayfish: use of X-ray sterilisation of males. *Freshwater Biology* 54 (7):1510–1519.
- CKFF, 2019. Podatkovna zbirka Centra za kartografijo favne in flore (stanje z dne 1. 11. 2019)
- Edgerton, B. F., L. H. Evans, F. J. Stephens & R. M. Overstreet, 2002. Synopsis of freshwater crayfish diseases and commensal organisms. *Aquaculture* 206: 57–135.
- Govedič, M., 2019. Ugotavljanje prisotnosti raka močvirskega škarjarja (*Procambarus clarkii*) na podlagi okoljske DNA na izbranih lokacijah v letu 2018. Poročilo. Center za kartografijo favne in flore, Miklavž na Dravskem polju. 11 str. [Naročnik: Ministrstvo za okolje in prostor, Ljubljana.]
- Govedič, M., A. Vrezec, M. Jaklič, A. Lešnik, V. Grobelnik, A. Šalamun, Š. Amrožič & A. Kapla, 2015. Vzpostavitev in izvajanje monitoringa koščaka (*Austropotamobius torrentium*) in koščenca (*Austropotamobius pallipes*) v letih 2014 in 2015. Končno poročilo. Center za kartografijo favne in flore, Miklavž na Dravskem polju. 56 str. [Naročnik: Ministrstvo za okolje in prostor, Ljubljana.]
- Govedič, M. & I. Miličič, 2018. Ujemite naravo!: zbranih 10.000 fotografij. Ribič, Ljubljana 77(1–2): 6–9.
- Holdich, D. M., J. D. Reynolds, C. Souty-Grosset & P. J. Sibley, 2009. A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowl Manag Aquat Ec* 394–395: 11.
- Kouba, A., A. Petrusek & P. Kozak, 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 413, 5.
- Lockwood, J. L., M. F. Hoopes & M. P. Marchetti, 2007. *Invasion Ecology*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Souty-Grosset, C., D. M. Holdich, P. Y. Noël et al. (ured.), 2006. *Atlas of crayfish in Europe*. Muséum national d'Historie naturelle, Paris, France.

## **6. PRILOGA: Poročili genetskih analiz**



Trieste, 15<sup>th</sup> November 2019

## TO WHOM IT MAY CONCERN

**OBJECT: Detection of *Procambarus clarkii* using eDNA analysis on height Slovenian water samples.**

### Samples

Environmental DNA (eDNA) from 8 water samples (hereinafter referred from 1 to 8 collected with Sterivex Durapore PVDF 0.45 µm filters (Merck-Millipore) have been isolated through the DNeasy PowerWater Sterivex kit (14600, Qiagen) by following the manufacturer's instructions.

Each eDNA has been analysed by PCR amplification with KAPA Probe Force mastermix (KK4301, Kapa biosystems) and amplifying a *Procambarus clarkii* COI-portion of 65 bp using the primers published on Tréguier *et al.* (2014) and a *Faxonius limosus* COI portion of 70 bp (designed by Manfrin C).

The following thermal profile of 95°C for 2' and 50 cycles of 95°C 10", 63°C 10" has been used for both the system.

Each station has been amplified in 5 replicates along with a series dilutions of genomic DNA from both *P. clarkii* and *F. limosus* as control samples and negative control of pure water (each amplified in 3 replicates, as well), used to check possible contamination in the solutions used.

### Results

The Real time PCR results are summarised in the table below for each filter analysed and named accordingly with the codes reported on the filters. + indicates positive detection, - negative amplification.

Sample	PCR Amplification (- negative, + positive)									
	<i>P. clarkii</i>					<i>F. limosus</i>				
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## Conclusion

Regarding *P. clarkii* detection on 8 filters, we have no signals for 4 samples. One positive out of 5 replica resulted positive for filters number xxx.

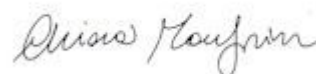
Following the indications reported in Klymus et al (2019), such a signal could highlight the presence of *P. clarkii* in the area surrounding the sampling site. However, we cannot exclude possible environmental contamination.

To be more confident about these weak signals, we will perform additional 5 replica from the same genetic material.

None of the samples analysed reported positivity to the presence of *Faxonius limosus*.

The DSV remains available for clarifications on the results obtained and for subsequent analysis and verification.

Prof. A. Pallavicini and Dr. Chiara Manfrin  
Department of Life Sciences (University of Trieste)





Trieste, 27<sup>th</sup> November 2019

## TO WHOM IT MAY CONCERN

**OBJECT: Detection of *Procambarus clarkii*, *Faxonius limosus* and *Pacifastacus leniusculus* using eDNA analysis on eight Slovenian water samples.**

### Samples

Environmental DNA (eDNA) from 8 water samples (hereinafter referred from 1 to 8 collected with Sterivex Durapore PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  filters (Merck-Millipore) ) have been isolated through the DNeasy PowerWater Sterivex kit (14600, Qiagen) by following the manufacturer's instructions.

Each eDNA has been analysed by PCR amplification with KAPA Probe Force mastermix (KK4301, Kapa biosystems) and amplifying a *Procambarus clarkii* COI portion of 65 bp using the primers published on Tréguier *et al.* (2014), a *Faxonius limosus* COI portion of 70 bp and a *Pacifastacus leniusculus* COI portion of 80 bp (both primers were designed by Manfrin C).

The following thermal profile of 98°C for 2' and 50 cycles of 95°C 10", 63°C 10" has been used for all the three systems.

Each station has been amplified in 5 replicates along with a series dilutions of genomic DNA from *P. clarkii*, *F. limosus* and *P. leniusculus* as control samples and negative control of pure water (each amplified in 3 replicates, as well), used to check possible contamination in the solutions used.

### Results

From the qRT-PCR results of the 8 eDNAs, 4 samples returned a positive hit out of 8 replicates (Figure 1, curves in red) for the system Pcla. Additional 12 PCRs have been run on blank samples of pure water to investigate possible traces of contamination possibly present in the lab or in the reagents used, but none has amplified *P. clarkii* (data not shown).

A standard curve has been calculated by using a dilution series starting from a genomic DNA (gDNA) extracted from a *P. clarkii* specimen and quantified by Qubit (DNA Broad Range kit, Thermo Fisher scientific).

The gDNA is 7.56 ng/ $\mu\text{L}$  concentrated (std-17 in Table 1) and four dilutions, each decreasing of a 10 factor (from std-18 to std-21, Table 1) have been used to estimate the DNA concentration from the filters.

Figure 2 shows how the 4 positive amplifications from eDNA are lower than the most diluted gDNA used. The highest concentrated (eDNA 6) is 6 x-fold less concentrated than the last gDNA dilution (0.000756 ng/ $\mu\text{L}$ ). Estimated concentrations of positive eDNAs are reported in Table 1 (column SQ: Starting Quantity).

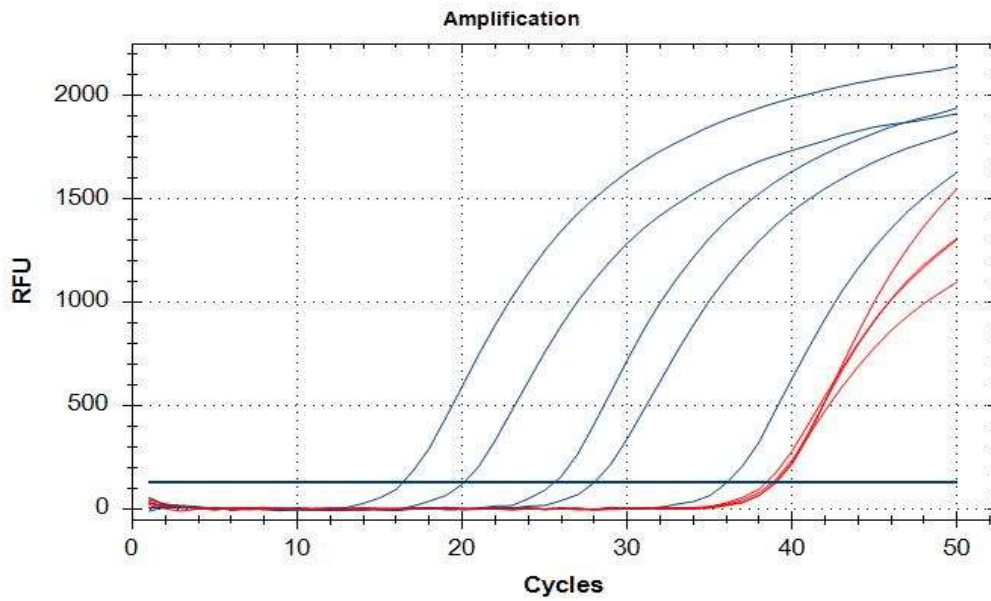


Figure 1. Amplification curves. In blue the series dilution and in red the four positive hits.

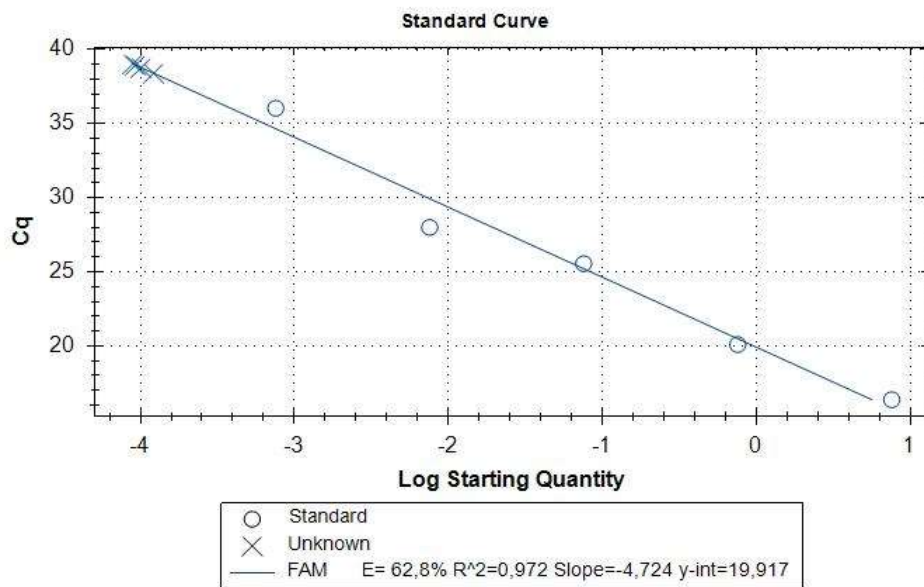


Figure 2. Standard curve built on the series dilution (circle) and with X are reported the positive hits from filters 2,4, 5 and 6. E: reaction efficiency and R<sup>2</sup>: coefficient of determination.

Table 1. Estimated quantifications calculated through the Maestro software (Bio-Rad) using an initial DNA quantified (7.56 ng/μL)

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	SQ
A11	FAM	Pcla_SPY	Std-17		16.38	7.560E+00
B11	FAM	Pcla_SPY	Std-18		20.10	7.560E-01
C11	FAM	Pcla_SPY	Std-19		25.56	7.560E-02
D11	FAM	Pcla_SPY	Std-20		28.00	7.560E-03
E11	FAM	Pcla_SPY	Std-21		36.04	7.560E-04
F02	FAM	Pcla_SPY	Unkn-11	6	38.41	1.219E-04
D01	FAM	Pcla_SPY	Unkn-07	4	38.79	1.011E-04
B04	FAM	Pcla_SPY	Unkn-03	2	38.96	9.309E-05
E05	FAM	Pcla_SPY	Unkn-09	5	39.04	8.960E-05

Here below a summary of the overall results:

Sample	PCR Amplification (- negative, + positive)																	
	P. clarkii						F. limosus						P. leniusculus					
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Conclusion**

Regarding *P. clarkii* detection on 8 filters, we have no signals for 4 samples. One positive out of 8 replicates resulted for filters number 2, 4, 5 and 6.

Following the indications reported in Klymus et al (2019), such a signal could highlight the presence of *P. clarkii* in the area surrounding the sampling site. However, we cannot exclude possible environmental contamination. The additional 12 analysis run on pure water samples likely support the lack of environmental contamination from the laboratory and the reagents used for the amplifications.

None of the samples analysed reported positivity to the presence of both *Faxonius limosus* and *Pacifastacus leniusculus*.

The DSV remains available for clarifications on the results obtained and for subsequent analysis and verification.

Prof. A. Pallavicini and Dr. Chiara Manfrin  
Department of Life Sciences (University of Trieste)

