

LifeDNAquatic: Riktlinjer för optimal hantering och analys av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöövervakning

Micaela Hellström, Martin Andersson-Li,
Viktor Birgersson, Rein Brys,
David Halfmarten, Patrick Hernvall,
Bernd Hänfling, Johan Näslund,
Jessica Sjöstedt, Johan Spens,
Cuong Tang, Marie Tjärnström,
Marcus C Öhman, Kat Bruce



LifeDNAquatic:

Riktlinjer för optimal hantering och analys av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöövervakning

av Micaela Hellström, Martin Andersson-Li, Viktor Birgersson, Rein Brys,
David Halfmarten, Patrick Hernvall, Bernd Häfling, Johan Näslund, Jessica Sjöstedt,
Johan Spens, Cuong Tang, Marie Tjärnström, Marcus C Öhman och Kat Bruce

NATURVÅRDSVERKET

Beställningar
Ordertel: 08-505 933 40
E-post: natur@cm.se
Postadress: Arkitektkopia AB, Box 110 93, 161 11 Bromma
Internet: www.naturvardsverket.se/publikationer

Naturvårdsverket
Tel: 010-698 10 00
E-post: registrator@naturvardsverket.se
Postadress: Naturvårdsverket, SE-106 48 Stockholm
Internet: www.naturvardsverket.se

ISBN 978-91-620-7106-6
ISSN 0282-7298

© Naturvårdsverket 2023

Tryck: Arkitektkopia AB, Bromma 2023
Omslagsfoto: Johan Näslund och Micaela Hellström
Figurer och tabeller: Micaela Hellström, Viktor Birgersson,
Patrick Hernvall, Rein Brys, Johan Näslund, Johan Spens,
Cuong Tang och Martin Andersson Li



Förord

Här presenteras resultaten från forskningsprojektet "LifeDNAquatic: Riktlinjer för optimal hantering och analys av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöövervakning". Projektet är ett av åtta projekt som genomförts inom ramen för forskningssatsningen DNA-metoder inom miljöövervakning. Med satsningen ville Naturvårdsverket och Havs- och vattenmyndigheten stödja forskning som kan bidra till en bättre och effektivare miljöövervakning genom införande av DNA-baserad analysteknologi.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag.

Rapporten har skrivits av

Micaela Hellström, MIX Research Sweden AB (tidigare AquaBiota Water Research, AQBWR)

Martin Andersson-Li, AquaBiota en del av Niras, Sweden (AQBWR)

Viktor Birgersson, MIX Research Sweden AB

Rein Brys, Research Institute Nature and Forest (INBO), Belgien

David Halfmarten, Research Institute Nature and Forest (INBO), Belgien

Patrick Hernvall, MIX Research Sweden AB

Bernd Häneling, University of Hull samt University of Inverness, Storbritannien

Johan Näslund, Naturvårdsverket, Sverige (tidigare AQBWR)

Jessica Sjöstedt, MoRe Research Örnsköldsvik AB Sverige

Johan Spens, SLU/Limnordic, Sverige

Cuong Tang, NatureMetrics Ltd, Storbritannien

Marie Tjärnström, MoRe Research Örnsköldsvik AB, Sverige

Marcus Öhman, WWF Sverige (tidigare AQBWR)

Kat Bruce, NatureMetrics Ltd, Storbritannien

Författarna svarar för rapportens innehåll.

Stockholm i mars 2023

Marie Uhrwing

Avdelningschef, Hållbarhetsavdelningen

Innehåll

Förord	3
Sammanfattning	9
Summary	10
1 Introduktion	11
2 Insamling i fält	13
2.1 Fältförberedelser	13
2.1.1 Fysiska och ekologiska aspekter att ta i beaktande inför fältplanering	13
2.1.2 Förberedelser gällande utrustning	15
3 Filtertyper och eDNA-konservering	16
3.1 Filtertyper	16
3.1.1 Öppna filter	16
3.1.2 Inhystra filter	16
3.1.3 Slutna filter	16
3.2 Fixering av eDNA i filter	17
3.2.1 Frysning	17
3.2.2 Torkning	17
3.2.3 DNA-fixering	18
4 eDNA-laboratoriekrav och extraktioner	19
4.1 Krav på eDNA-laboratorier	19
4.2 Positiva och negativa kontroller i eDNA-extraktioner	21
4.2.1 Kontroller för att utesluta falska positiva och negativa prov	21
4.3 eDNA-extraktion från filter	22
5 eDNA-resultat från olika laboratorier flerartsanalyser av fisk	24
5.1 Bakgrund	24
5.2 Metoder	24
5.3 Resultat	25
5.4 Slutsatser	26
6 Jämförelse av artdetektion mellan två olika eDNA-fixeringsmetoder	27
6.1 Bakgrund	27
6.2 Metoder	27
6.3 Resultat	29
6.3.1 Mängden fisk-eDNA i relation till konservering och tid	29
6.3.2 Resultat av artdetektion i relation till konservering och tid	31
6.4 Slutsatser	33
7 Integritet av eDNA i filter konserverade i etanol i 18 månader	34
7.1 Bakgrund	34
7.2 Metoder	34
7.3 Resultat	35
7.4 Slutsatser	36

8 Rumsliga insamlingsstrategier	37
8.1 Bakgrund	37
8.2 Metoder	37
8.3 Resultat	40
8.4 Slutsatser	40
9 Säsongsvariation	41
9.1 Bakgrund	41
9.2 Metoder	41
9.2.1 Fältarbete och laboratorieanalyser	41
9.2.2 Dataanalys	43
9.3 Resultat	43
9.3.1 Artdetektion i förhållande till antal replikat	43
9.3.2 Förändringar i relativ fiskbiomassa över tid indikerar reproduktionsmönster	44
9.3.3 Våtmark månadsprov	47
9.4 Slutsatser	48
10 Jämförelse i artdetektion mellan eDNA och provfiske	49
10.1 Bakgrund	49
10.2 Metoder – jämförelse mellan nätfiske och eDNA i marin miljö	49
10.3 Resultat – jämförelse mellan nätfiske och eDNA i marin miljö	50
10.4 Slutsatser – jämförelse mellan nätfiske och eDNA i marin miljö	52
10.5 Metoder – jämförelse mellan elfiske och eDNA	53
10.6 Resultat – jämförelse mellan elfiske och eDNA	54
10.7 Slutsatser – jämförelse mellan elfiske och eDNA	59
11 Kostnadsjämförelse mellan eDNA och traditionella inventeringar	60
11.1 Bakgrund	60
11.2 Metoder	60
11.3 Resultat	61
11.3.1 Nätfiske och eDNA – Karlskrona skärgård	61
11.3.2 Groddjursinventeringar – Lövsta	62
11.3.3 Groddjur – Stockholm och Uppsala län	63
11.3.4 Stormusslor – Vanda å	63
11.4 Slutsatser	64
12 Osäkerheter och felkällor	65
13 Sammanfattande konklusioner	67
14 Tack	69
15 Källhänvisning	70
Bilaga 1 Fält- och laboratorieprotokoll	76
Bilaga 2 Artdetektion över tid för olika konserveringsmetoder	80
Bilaga 3 Arternas förekomst i Moälvens avrinningsområde	84

Tabeller

Tabell 1. Faktorer att tänka på vid eDNA-provtagning i akvatiska miljöer	14
Tabell 2. Positiva och negativa kontroller som extraheras	22
Tabell 3. Översikt av variationer i metoder mellan de olika laboratorierna	25
Tabell 4. Antal prover som behöver samlas in för att detektera fiskarter som har andelen av biomassan > 5 %, 1–5 % och 0,5–1 %	44
Tabell 5. Arternas relativa biomassa under 11/12 månader (utanför förökningsperioden) och den relativa biomassan under månaden då arten reproducerar /1/12) månader	46
Tabell 6. Statistik för provfiskade nät beräknat på relativa fångster i vikt eller antal läsningar per station	51
Tabell 7. Statistik för elfisken beräknat antal arter som detekterats med eDNA (blå rader) och elfisken (gula rader)	54
Tabell 8. Fiskarnas utbredning över lokalerna (av totalt 7) där de enskilda fiskarterna påträffades genom eDNA och historiska elfisken. (Micaela Hellström)	55
Tabell 9. Sammanställning av projekt som inkluderas i kostnadsjämförelsen, samt källor för respektive kostnadsunderlag	60
Tabell 10. Sammanställning av kostnader för inventering av fisksamhället i Karlskrona skärgård	62
Tabell 11. Sammanställning av kostnader för inventering av groddjur i Lövsta	62
Tabell 12. Sammanställning av kostnader för inventering groddjur och fisk i Stockholm och Uppsala län	63
Tabell 13. Sammanställning av tidsåtgång och kostnader för inventering av stormusslor på 12 lokaler i Vanda å, Finland	64

Figurer

Figur 1. Schematisk bild av de olika filtertyperna som används för eDNA-provtagning	17
Figur 2. Vistelseschema för teknisk personal i de olika laboratorierna under en dag	20
Figur 3. Stapeldiagram som visar resultat av antal fiskarter som detekterades i de olika proverna	25
Figur 4. Figur som visar resultat av arternas förekomst i prover som analyserats i olika laboratorier	26
Figur 5. Provtagningsuppsättning	27
Figur 6. Karta över provtagningspunkterna	28
Figur 7. Våtmarkshabitat. Antal DNA-kopior av fisk per mikroliter	29
Figur 8. Sjöhabitat. Antal DNA-kopior av fisk per mikroliter	30
Figur 9. Rinnande vatten. Antal DNA-kopior per mikroliter	30
Figur 10. Marina habitat. Antal DNA-kopior av fisk per mikroliter	31
Figur 11. Boxplot som visar att eDNA-filter som konserveras i etanol detekterar flera arter än eDNA-filter bevarade i Longmire's lösning	31
Figur 12. Våtmarkshabitat. Antal unika fisksekvenser	32
Figur 13. Sjöhabitat. Antal unika fisksekvenser	32
Figur 14. Rinnande vatten. Sjöhabitat. Antal unika fisksekvenser	32
Figur 15. Marina habitat. Antal unika fisksekvenser	33
Figur 16. Karta över provpunkterna i sjön Båven	35
Figur 17. Arternas dominans inom de olika provtagningslokalerna	35
Figur 18. NMDS-ordination av fisksammansättningen i eDNA-proverna från Båven före och efter lagring	36
Figur 19. Karta som visar provtagningslokalerna inom Moälvens avrinningsområde	38
Figur 20. Diagram som visar provtagningspunkterna inom Moälvens avrinningsområde	39
Figur 21. Karta som visar de fyra provtagningslokalerna för månadsproverna	42
Figur 22. Månadsprover över arternas förekomst i Moälven (Moliden)	44
Figur 23. Månadsprover över arternas förekomst i Anundsjö (i Moälvens avrinningsområde)	45
Figur 24. Månadsprover över arternas förekomst i marin miljö (Öland, Mörbylånga)	47
Figur 25. Kartor över inventeringsområdet som visar antal fiskarter detekterade per station med 16 provfiskestationer	50
Figur 26. Fiskarnas relativa förekomst över de 16 gemensamma lokalerna med eDNA respektive nätprovfiske	51

Figur 27. Artackumulationskurvor som visar det förväntade antalet taxa som kan detekteras vid ett specifikt antal prov (röd linje) med 95 %-konfidensintervall	52
Figur 28. Karta över provtagningslokalerna för jämförelse med historiska elfisken	54
Figur 29. Stapeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst i Moliden mellan enskilda historiska elfisken sammanlagd artförekomst av alla elfisken och artdetektion genom eDNA-analys	56
Figur 30. Stapeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst i Almberget mellan enskilda historiska elfisken sammanlagd artförekomst av alla elfisken och artdetektion genom eDNA-analys	56
Figur 31. Stapeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst i c) Nedan Uttersjön och d) Hagforsen, mellan enskilda historiska elfisken sammanlagd artförekomst av alla elfisken och artdetektion genom eDNA-analys	57
Figur 32. Stapeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst i Grusgången mellan enskilda historiska elfisken sammanlagd artförekomst av alla elfisken och artdetektion genom eDNA-analys	57
Figur 33. Stapeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst i f) Nedan Gottnedammen och g) Nordsjöänget, mellan enskilda historiska elfisken sammanlagd artförekomst av alla elfisken och artdetektion genom eDNA-analys	58
Figur 34. Antal persondagar som spenderas i fält för traditionella metoder och eDNA	61
Figur B1-1. Flödesdiagram som visar de olika stegen för flerartsanalyser från fältplanering till beslut och åtgärder	76
Figur B2-1. Bubbeldiagram. Artdetektion i våtmark D1 (Malmö)	80
Figur B2-2. Bubbeldiagram. Artdetektion i våtmark D2 (Harg)	80
Figur B2-3. Bubbeldiagram. Artdetektion i Sjön Dunkern (L1)	81
Figur B2-4. Bubbeldiagram. Artdetektion i Ekeln i sjön Mälaren (L2)	81
Figur B2-5. Bubbeldiagram. Artdetektion i Dalälven (R1)	82
Figur B2-6. Bubbeldiagram. Artdetektions i älven Ätran på svensk västkusten	82
Figur B2-7. Bubbeldiagram. Marin miljö. Lokal S2 (Karlskrona innerskärgård)	83
Figur B2-8. Bubbeldiagram. Artedetektion i marin miljö S1 vid Tjärnö på västkusten	83
Figur B3-1. Arternas dominans inom de olika provtagningslokalerna	84

Sammanfattning

Naturvårdsverket och Havs- och vattenmyndigheten i Sverige beviljade åtta forskningsprojekt 2018 för att undersöka hur eDNA kan användas som verktyg inom den svenska miljöövervakningen. Projektet LifeDNAquatic, presenteras i denna rapport.

De tre första arbetspaketen inom projektet resulterade i två tekniska rapporter som behandlar fältplanering, provtagning i fält och olika sorters fältutrustning. Riktlinjer för laboratorier specifika för eDNA och extraktionsmetoder diskuteras.

Sju undersökningar (5–11) utfördes för att validera eDNA som metod och för att utröna användbarheten av eDNA-flerartsanalyser som verktyg inom miljöövervakningen. Mer än 460 eDNA-prover samlades in under undersökningstiden.

Delundersökning 5: Går det att jämföra artförekomster baserade på flerartsanalyser som kommer från helt olika eDNA-laboratorier? En jämförande undersökning utfördes där fem laboratorier deltog för att jämföra fiskdetektion från samma vatten. Artanalyserna från de olika laboratorierna visade förväntningsvärt liknande resultat. Detta innebär att resultat från olika eDNA-utövare är jämförbara och att metoden är tillförlitlig.

Delundersökning 6: Är resultaten av eDNA-analyser jämförbara då prover bevaras i olika konserveringsvätskor över tid? Analysen visade att prover som bevaras under kort tid oberoende av konservering uppvisar samma resultat. Då proverna bevaras mer än tre månader är resultaten jämförbara bara då proverna bevarats i etanol.

Delundersökning 7: Går det att analysera filter som bevarats i etanol i 1,5 år? eDNA-prover som bevarats i etanol i kycklåp i 1,5 år visar att detektionsprecisionen av den biologiska mångfalden är lika hög oberoende om proverna bevarats kort eller lång tid.

Delundersökning 8: Hur påverkar provtagningsdesign slutresultaten av en undersökning? Går det att undersöka artnärvaro i biflöden genom att enbart analysera prover från dess huvudflöde? Slutsatsen från detta är att en genomsnittlig provtagningsdesign och val av lokaler kan spara både tid och resurser då eDNA används som metod inom miljöövervakningen. För mera finskalig utbredning av arter bör flera lokaler inventeras. Vidare ger prover från huvudflöde inte information om artnärvaro i biflöden. Månatliga prover ger en mer korrekt relativ biomassa av fiskarter eftersom mjölke-eDNA då kan uteslutas från analysen.

Delundersökning 9: Kan man utröna säsongsvariationer med eDNA över ett år? Hur många prover behöver samlas in på de enskilda lokalerna? Från detta arbetspaket drar vi slutsatsen att prov som tas från samma lokal månadvis under ett år är ett mycket kraftfullt verktyg för artinventeringar eftersom både arternas inbördes dominans i fisksamhället samt reproduktionstider kan fastslås. Antal prover som behöver samlas in vid en provpunkt framgår av undersökningen.

Delundersökning 10: Hur skiljer sig resultatet mellan eDNA och nätfisken? eDNA i marin miljö detekterade 24 fiskarter jämfört med 15 arter i nätfisket. eDNA i rinnande vatten detekterade 1,2 till 4,7 gånger fler arter än sammanslagna historiska elfiskedata.

Delundersökning 11: Är eDNA kostnadseffektivt i relation till traditionella metoder? Flera olika demonstrationsprojekt visar att eDNA som metod är kostnadseffektivt i relation till traditionella inventeringsmetoder. Skillnaden beror på tidsåtgången i fält, som är betydligt högre för traditionella metoder jämfört med eDNA.

Summary

The Swedish Environmental Protection Agency and Swedish Agency for Marine and Water Management supported eight research projects in a call named “DNA-methods for use in Swedish environmental monitoring”. One of these projects called “LifeDNAquatic” is described in this report.

The three first work packages within the project resulted in two technical reports in Swedish which is in line with a handbook published within the EU DNAqua-Net consortium called “A Practical Guide to DNA-based methods for biodiversity assessments”. Four of the co-authors of the EU guide are also participants of LifeDNAquatic.

Seven field based empirical studies (ES) within the project were conducted to validate eDNA metabarcoding (multi-species surveys) mainly surveying fish, as a tool for environmental monitoring. More than 460 water samples were collected and processed within the project.

ES 5: Are eDNA results generated from different eDNA laboratories comparable? A survey based on eDNA metabarcoding of fish was performed where the participants collected water from the same source using completely different methods. The results were very similar and confirmed that data from different eDNA providers is comparable.

ES 6: Are the results from eDNA analyses comparable when the filters from the field are stored in different conservation liquids (salt buffer or ethanol) more than three months? Storage in alcohol over three months does not affect detection rates of biodiversity, storage in salt buffer over long time shows a sharp decline in detection rates.

ES 7: Is there a difference in detection efficiency of biodiversity (number of taxa) between samples stored in ethanol in the fridge for two weeks versus 1.5 years? The results showed that the detection rate is not affected by storage exceeding 1.5 years.

ES 8: How does sampling design prior to field work affect the detection rates of species in a large drainage area? Is the DNA signal from a tributary detectable in the main river? If only presence of species is of interest a small number of sampling localities is sufficient to detect species presence. By using a model taking historical, physical and chemical factors into consideration, the sample numbers in the drainage area can be reduced from 64 to 6 sites. The DNA signal from a tributary to a river or from a river to a lake disappears very quickly.

ES 9: What information can eDNA metabarcoding based on monthly sampling for a year provide managers? Monthly sampling provides species presence, dominance of species within a location, simultaneous spawning patterns and indication of changes in the environment when indicator species appear or disappear. Monthly samples provides a much more correct relative biomass of fish species as milt eDNA can be excluded from analysis.

ES 10: How does the result differ between eDNA and net/electrofishing? eDNA in the marine environment detected 24 fish species compared to 15 species with nets. eDNA in running water detected 1.2 to 4.7 times more species than historical electro-fishing data.

ES 11: Is eDNA cost-effective in relation to traditional methods? Several different demonstration projects show that eDNA as a method is cost-effective in relation to traditional inventory methods. The difference is due to the time required in field, which is significantly higher for traditional methods compared to eDNA.

1 Introduktion

Naturvårdsverket och Havs- och vattenmyndigheten i Sverige beviljade flera forskningsprojekt under 2018 med syfte att undersöka hur eDNA kan användas som verktyg inom den svenska miljöövervakningen. Projektet LifeDNAquatic (Dnr 802-0183-18) presenteras i denna rapport.

Projektgruppen inom LifeDNAquatics byggde vidare på existerande kunskap för att utveckla metoder för fältinventering, behandling och lagring av prover från olika akvatiska miljöer. Vidare utfördes fältundersökningar som jämförde hur olika konserveringsmetoder och årstider påverkar resultaten, vilka även jämfördes med konventionella provtagningsmetoder. Projektet fokuserade på fisk som taxonomisk grupp.

DNA-baserade metoder för att detektera och identifiera arter har under det senaste decenniet öppnat upp för nya möjligheter att inventera biologisk mångfald, där fokus har legat på akvatiska ekosystem. En studie som publicerades 2008 visade att det är möjligt att identifiera närväro av oxgroda i dammar genom att analysera DNA-spår med molekylära metoder i ett vattenprov, utan att själva arten är närvarande (Ficetola m.fl. 2008). Dessa DNA-spår som varje levande individ lämnar efter sig i miljön genom andning, slem, gameter, svett och avföring har fått samlingsnamnet environmental DNA eller eDNA (Taberlet m.fl. 2012, Bruce m. fl. 2021). Tidiga studier av invasiva arters framfart utfördes i USA:s stora sjöar där närväron av karpfisk undersöktes med metoden (Jerde m.fl. 2013). Analyser av en arts närväro utfördes för invasiva tusensnäckor i Nya Zealand (Goldberg m.fl. 2013) och den hotade större vattensalamandern (Biggs m.fl. 2015).

Möjligheterna att använda eDNA för praktiska undersökningar och årliga inventeringar gjorde att forskningen inom eDNA tog fart. En vändpunkt var utvecklingen av högpresterande genetisk sekvensering (NGS) som gör det möjligt att identifiera flera arter på en gång och beskriva hela artsamhället genom att analysera ett enda vattenprov (Taberlet m.fl. 2012, Valentini m.fl. 2016). Metoden öppnade upp för tanken att använda eDNA som verktyg inom miljöövervakningen för identifiering av hotade och sällsynta arter samt som en metod för årliga artinventeringar. Då metoden utvecklades i olika laboratorier fanns det under en tidpunkt flera protokoll och metodvariationer än aktiva forskare inom området (Spens m.fl. 2017; Seymour 2019). För att nå större konensus för metoder mellan forskargrupperna och för att försäkra att data mellan olika undersökningar är jämförbara bildades EU-konsortiet DNAquaNet 2016 (Leese m.fl. 2018). Fler än 400 forskare och slutanvändare träffades, besökte olika laboratorier och utförde undersökningar för att göra de olika eDNA-studierna jämförbara. Konsortiet satsade på att ta fram metoder för inventering av sjöar och vattendrag inom EU:s Ramdirektiv för vatten (WFD, 2000/60/EC) och EU:s Ramdirektiv om en marin strategi (MSFD, 2008/56/EC). Detta bidrog till att standarder för provtagning kommer att godkännas under 2023 och en handbok för eDNA inom miljöövervakningen publicerades 2021 (Bruce m.fl. 2021). EU konsortiet EU GEANS har sammanfört forskare och eDNA utövare i Europa för att nå samstämmighet för eDNA metoder i marina miljöer.

Utvecklingen av eDNA-analyser som forskningsfält till att användas som ett praktiskt verktyg inom miljöövervakningen har gått fort, och vetenskaplig rigiditet behöver kombineras med praktisk användning för miljöövervakande organ. Viktiga faktorer att tänka på innan ett eDNA-projekt går av stapeln är fältplanering, insamling, konservering av prover, laboratoriekrev och möjligheterna att kontrollera hur pålitliga metoderna är. Även potentiella felkällor och osäkerheter är viktiga att ta i beaktande.

För inventering av fisk och andra vattenlevande organismer ligger utmaningen i att påträffa arterna i fråga snarare än att identifiera dem. Konventionella metoder kan vara både tidskrävande, dyra, skadliga och ospecifika, speciellt då det gäller arter som är skygga eller sällsynta, eller om det gäller främmande arter i början av invasionsprocessen. eDNA som verktyg inom miljöövervakningen samt som komplement till traditionella metoder kan öppna nya möjligheter att utföra inventeringar av arter och biologisk mångfald under kort tid.

För att fullt ut implementera eDNA inom nationella övervakningsprogram är det därför viktigt att standardisera en metodik som är både känslig och kostnads-effektiv. Detta kräver en bättre förståelse för eDNA-dynamiken i miljön och den variation som är förknippad med olika provtagningar, vilket bland annat inkluderar en förståelse för hur den rumsliga och tidsmässiga variationen kopplas till arter och deras livsmiljöer. Följande avsnitt behandlas i denna rapport:

2. Insamling i fält
3. Filtertyper och eDNA-konservering
4. eDNA-laboratoriekrev och extraktioner
5. eDNA-resultat från olika laboratorier för flerartsanalyser av fisk
6. Jämförelse av artdetektion mellan två olika eDNA-fixeringsmetoder
7. Integritet av eDNA i filter konserverade i etanol i 18 månader
8. Rumsliga insamlingsstrategier
9. Säsongsvariation
10. Jämförelse i artdetektion mellan eDNA och provfiske
11. Kostnadsjämförelse mellan eDNA och traditionella inventeringar
12. Osäkerheter och felkällor

Avsnitt 2–4 i denna rapport avhandlar fältinsamlingstekniker samt laboratoriemetoder och sammanfattar två tekniska rapporter inom detta projekt (Hellström m. fl. 2021a; 2021b). Informationen bygger på empiriska och teoretiska erfarenheter och har även resulterat i en handbok inom konsortiet DNAquaNet (Bruce m.fl. 2021). Avsnitt 5–7 redogör för metodiska empiriska fältundersökningar som undersöker hur hantering av prover påverkar resultatet av flerartsundersökningar. Avsnitt 8–10 behandlar storskaliga fältstudier som svarar på flera frågor kring hur eDNA kan användas i praktiken inom miljöövervakningen och testar de metoder som beskrivs i avsnitt 2–7. Avsnitt 11 är en kostnadsjämförelse mellan eDNA och traditionella inventeringsmetoder. Avsnitt 12 redogör slutligen för potentiella osäkerheter och felkällor som är viktiga att ta i beaktning.

2 Insamling i fält

Insamlingsstrategier av vatten för eDNA-analyser är grundpelaren för att uppnå resultat som reflekterar verkligheten och detekterar så många närvarande arter som möjligt. De tekniska rapporter som producerades inom detta projekt (Hellström m.fl. 2021a; 2021b) samt riktlinjer som togs fram av EU-konsortiet DNAquaNet resulterade i en praktisk guide för eDNA som verktyg i miljöövervakningen (Bruce m.fl. 2021) med tydliga direktiv för insamling, filtrering och konservering av vattenprover. Vidare har två av medlemmarna i teamet varit aktiva inom pågående CEN- och SIS-standardiseringar av eDNA-provtagning inom EU och Sverige.

2.1 Fältförberedelser

2.1.1 Fysiska och ekologiska aspekter att ta i beaktande inför fältplanering

Vid planering av ekologiska undersökningar, inklusive eDNA-undersökningar, är provtagningsdesign av mycket stor betydelse för att erhålla optimala resultat.

Fysiska aspekter såsom djup, flödescirkulation, höjdskillnader, termokliner, halokliner, vatten volymer samt naturliga och antropogena barriärer i miljön är viktiga faktorer som ska beaktas vid eDNA-provtagning (Deiner & Altermatt 2014; Jerde m.fl. 2016; Deiner m.fl. 2016; Hänfling m.fl. 2016; Shogren m.fl. 2017; Pont m.fl. 2019; Bruce m.fl. 2021). I sjöar och våtmarker med stillastående eller skiktat vatten kan utbredningen av eDNA i vattnet variera vilket kan innebära att flera prover eller underprover bör tas (Deiner m.fl. 2016; Bruce m.fl. 2021). I stora skiktade sjöar där hela taxa undersöks befinner sig eDNA på olika djup. I sådana fall är det viktigt att ta prover på olika djup och beakta eventuella termokliner (Hänfling m.fl. 2016). I stora vattenmassor som i öppet hav är DNA mer utspätt vilket gör att större mängder vatten från olika djup behöver filtreras. I rinnande vatten är DNA ofta bättre blandat och mer homogen, dock kan stora rinnande vatten med bakåtgående strömmar och varierande flödesriktning påverka provtagningen (Jerde m.fl. 2016; Pont m.fl. 2018; Shogren m.fl. 2018).

Faktorer att ta i beaktande för insamling sammanfattas i Tabell 1 och baseras på Bruce m.fl. (2021) och Hellström m.fl. (2021a).

Sannolikheten för att detektera en given art med hjälp av eDNA som verktyg styrs delvis av artens livshistoria och ekologi (Bista m.fl. 2017). En viktig faktor som kan påverka om en art är närvarande är om den uppvisar säsongsberoende migrationsmönster vilket förekommer hos bland annat marina däggdjur och vandrande fiskar. Arter kan även röra sig i djupled beroende på årstid. Typiska kallvattensarter kan söka sig till djupare områden vid stigande temperaturer. Även reproduktionstiden bör uppmärksammas när prover ska tas eftersom gameter (könseller) ökar mängden DNA i vattnet (Bylemans m.fl. 2018; se avsnitt 9).

Tabell 1. Faktorer att tänka på vid eDNA-provtagning i akvatiska miljöer (Micaela Hellström).

Att ta i beaktande	Gäller alla typer av akvatiska ekosystem	Sjöar och dammar	Rinnande vatten	Marina miljöer
När? Tid, årstid, månad	<ul style="list-style-type: none"> • Säsong – ta exempelvis prover för större vatten-salamander under och precis efter reproduktions-perioden innan de vuxna lämnar vattendraget. Tänk på säsong och parningslid för fiskar. Bakterier har en högre koncentration under de varma månaderna vilket kan påverka proverna. Vinter-provtagning går därför bra för att eDNA bibehålls längre vid låg temperatur. • Provtagning parallellt med myndigheters årliga inventeringar rekommenderas för jämförbarhet av data. 	<ul style="list-style-type: none"> • Är vattnet skiktat? • Nej – ta vanliga delprover som slås ihop i ett insamlingskärl längs strandlinjen av sjön. • Ja – inkludera en djupprofil med separata grund- och djupprover om nödvändigt. • Vår- och höstcirculation. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tag prover under naturliga flödesförhållanden. • Om möjligt undvik torra perioder eller översvämningsperioder om detta icke är målet med provtagningen. 	<ul style="list-style-type: none"> • Närä strandlinjen, grunda vatten – ta säsong i beaktande. Många fiskarter rör sig mot grundare vatten under förökningsperioden och till djupare vatten under vintern. • Vissa arter föredrar djupare vatten under den varma sommarsäsongen. • För marina däggdjur – ta reda på migrationsmönster. • Provtagning parallellt med myndigheters årliga inventeringar rekommenderas för jämförbarhet av data.
Var? Välja provtagnings-lokal	<ul style="list-style-type: none"> • Undvik att vistas i vattnet före provtagning för att inte riskera kontaminering från skor. Om nödvändigt, ta proverna uppströms provtagaren. • Samla in förhandsinformation om positioner av avloppsrör, restauranger, bebyggelse etc. eftersom eDNA-signaler från dessa når vattnet. • Notera även närvärs av fåglar eftersom avföring kan innehålla DNA som inmundigats på andra ställen. 	<ul style="list-style-type: none"> • Samla prover längs litoralen. Ta topografiska variationer i beaktande som vid traditionell provtagning. 	<ul style="list-style-type: none"> • Samla in delprover över vattendraget. • Tänk på positioner av huvud- och biflöden, notera omedelbar närhet till sjöar, samt höjdskillnader som vid traditionell provtagning. 	<ul style="list-style-type: none"> • Notera djupprofiler, tid-vatten, strömmar och avstånd från land. • Undvik närheten av utlopp från rinnande vattendrag. • Flera djup kan behövas som vid traditionell provtagning.
Hur många prover behövs?	<ul style="list-style-type: none"> • Antal prover ska reflektera rumsliga variationer (olika habitat såsom vegetation, sandstrand eller klippor). • Systemets storlek och även begränsningar gällande möjligheter att nå provtagningslokalen. • För sammanslagna prover, notera rumsliga variationer. 	<ul style="list-style-type: none"> • Antalet prover beror på vattnets storlek. Provtagningsstrategi såsom sammanslagna underprover kräver färre antal prover för att detektera arterna. Om rumslig utbredning är av intresse behövs fler provpunkter och filter. Varierande strandtopografi kräver flera prover för att täcka de olika habitaten. 	<ul style="list-style-type: none"> • Då det gäller rinnande vatten beror antalet prover på älvens/ flödets längd och prover tas med jämn avstånd. 	<ul style="list-style-type: none"> • Antalet prover beror på om tidvatten och strömmar skall tas i beaktande. • Djupprofiler med djupt vatten och ytvatten kan behövas och ökar då antalet prover. • Antal replikat per lokal beror på hur proverna har samlats in. • Två till tre replikat förbättrar definitivt resolutionen av antalet arter.
Hur mycket? Vattenvolym	<ul style="list-style-type: none"> • Provvolym beror på flera faktorer (inkluderande grumlighet som anges nedan). • Majoriteten av eDNA-analyser idag fokuserar på filtrerade vattenvolymer mellan 0,5–5 liter. • Provvolym reflekteras även av provtagningsstrategi, och om sammanslagna underprover används. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mindre våtmarker kräver mindre provvolym än stora sjöar och volymer av filtrerat vatten begränsas lätt av filter som täpps till av organiskt material. 	<ul style="list-style-type: none"> • eDNA från större floder är stokastiskt fördelat och kan vara mycket utspätt jämfört med mindre rinnande vatten eller sjöar. • Delprover som sammanslås är viktiga för goda resultat. 	<ul style="list-style-type: none"> • eDNA-prover från marina miljöer är mycket utspädda vilket betyder att flera underprover samt större volymer behövs för goda resultat. Detta gäller speciellt på djupare lokaler och i öppet vatten.
Sikt och grumlighet	<ul style="list-style-type: none"> • Notera grumlighet och humusrika vatten. • Grumliga vatten kan förorsaka lilltäpta filter, förlänga filtreringstid och orsaka PCR-inhibition av DNA. 	<ul style="list-style-type: none"> • Grumlighet och hög humushalt är vanliga. Undvik att röra upp bottensubstrat vid provtagning. • Förfiltrering med filter av större porstorlek rekommenderas vid problem. • Notera regnigt väder eller algblomningar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Notera sikt, halokliner och termokliner. 	

Flertalet vatteninsamlingsstrategier har visat sig ge pålitliga resultat med mycket goda förutsättningar att detektera arter. Dessa strategier innebär antingen insamling av vatten över ett större område längs transekter med delprover som slås ihop till ett samlingsprov (Pont m.fl. 2019), eller insamling av flera individuella prover över provtagningsområdet (Hänfling m.fl. 2016). Den senare strategin ger en bild av rumslig distribution av arter men är också betydligt dyrare än samlingsprover. Oberoende av insamlingsstrategi är det av värde att ta flera delprover vid varje insamlingspunkt som sedan slås ihop till ett så kallat punkt-samlingsprov.

2.1.2 Förberedelser gällande utrustning

Förberedelser av fältutrustning ska göras i DNA-fria miljöer. Insamlingskärl som burkar, hinkar eller vattenprovtagare bör rengöras med hypoklorit eller liknande DNA-dödande ämnen och sedan sköljas noggrant. Filter, pumpar eller sprutor bör bevaras i sterila förpackningar. Fältprotokoll ska medtagas.

För att undvika kontamination av DNA eller patogener mellan provtagningslokaler ska följande punkter följas:

- Undvik återanvändning av utrustning om inte utrustningen rengörs med hypoklorit eller kommersiella DNA-förstörande produkter mellan provtagningslokaler.
- Undvik kontakt med vattenmassan innan provtagning för att förhindra att skor eller kläder överför DNA från andra ställen till provtagningspunkterna, eller stanna alltid nedströms i förhållande till provtagningspunkten i rinnande vatten.
- Skor eller stövlar ska rengöras med hypoklorit eller liknande DNA-dödande medel mellan provtagningslokaler.
- Använd sterila engångshandskar för att förhindra överföring av provtagarens DNA till proverna. Byt handskar mellan provtagningspunkter.
- För riktigt känsliga prover använd munskydd, andas inte över filter eller insamlat vatten. Om provtagaren har ätit fisk är det en risk att DNA överförs från andningen till proverna.
- Samla in regelbundna filterkontroller i fält för att försäkra att proven inte har kontaminerats i fält.
- Tänk på eventuell överföring av sjukdomsalstrare mellan lokaler vid temperatur- och pH-mätningar.

3 Filtertyper och eDNA-konservering

3.1 Filtertyper

Filtersystem och utrustning används för att samla in och fixera eDNA från vatten. Insamling av eDNA är idag nästan uteslutande filterbaserat. Vattnet körs genom ett filter med hjälp av vakuum eller mekanisk kraft. DNA från vattnet fastnar i filtret och kan sedan fixeras för senare analys.

De huvudsakliga filtertyperna är öppna filter, inhysta (housed på engelska) filter och slutna filter (Figur 1).

3.1.1 Öppna filter

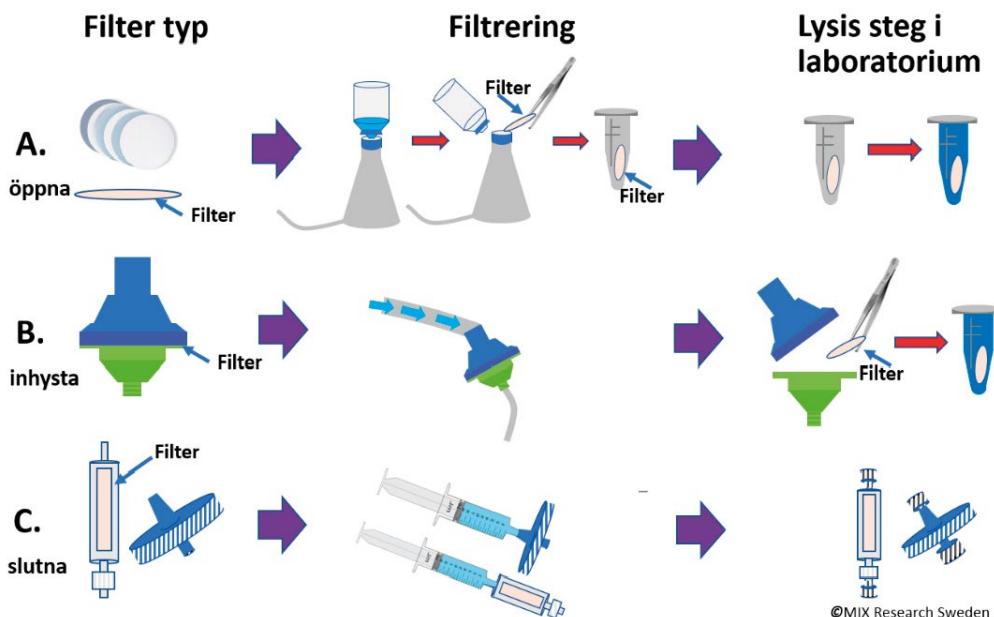
Öppna filter är runda membran som är exponerade för luft under filtrering. Vattnet filtreras vanligen i laboratoriet med en vakuumpump eller i fält med en peristaltisk pump. Vattnet hälls i en steril behållare och rinner igenom filtret. Öppna filter är billigare än de övriga filtersystemen men löper dock en större risk för kontaminering (från DNA som finns i den omgivande luften och/eller provtagaren) från omgivningen eftersom de inte skyddas av ett hölje. Rent vatten filtreras genom de negativa filterkontrollerna för att försäkra sig om att de inte har kontaminerats.

3.1.2 Inhysta filter

Inhysta filter (från engelskans “housed filters”) beskriver ett system där ett öppet filter placeras innanför en stängd kapsyl under själva filtreringsprocessen, varefter filtren öppnas och hanteras som ovan. Även här är kontamineringsrisken stor och negativa kontroller med filtrerat rent vatten är nödvändiga för att utesluta kontamineringsrisken.

3.1.3 Slutna filter

Slutna filter är system där filtermembranet är slutet innanför en kapsyl. Filtret exponeras därför inte alls för den yttre miljön vilket gör att kontamineringsrisken är liten. Konserveringsvätskan (se avsnitt 3.2.3) sprutas direkt in i filtrets membran innanför kapsylen som inte öppnas. Alternativt töms filtren på vatten, försluts och läggs i fältfrysar i -20 °C.



Figur 1. Schematisk bild av de olika filtertyperna som används för eDNA-provtagningsprocessen. Proverna filtreras och konserveras i fält (kapitel 3.2). Konserveringsvätskan avlägsnas före lysisteget förutom då lyseringsbuffert (ATL eller LM) används som konserveringsmedel. (Micaela Hellström).

3.2 Fixering av eDNA i filter

För att undvika att eDNA sönderfaller under transport väljer många utövare att konservera (fixera) DNA så fort som möjligt efter filtrering, ofta redan i fält. Detta gör att proverna kan sändas till analyslaboratorier med vanlig post direkt efter avslutat fältarbete. Vattenprover som skall frysas eller skickas i vätskeform för att filtreras i laboratorium bör filtreras så snart som möjligt (dock inom 24 timmar).

3.2.1 Frysning

Frysning är effektivt men kräver omedelbar tillgång till fältfrysar så att proverna hålls kalla under transporten till laboratoriet. För att bevara DNA-integriteten är det viktigt att proverna inte tinar och fryser. En del sänder fruset vatten till laboratoriet och filtrerar det upptinade vattnet precis före eDNA-utvinning (extraktion).

En effektiv metod är att snabbfrysa proverna i flytande kväve. Flytande kväve har en temperatur på -195,6 °C och behöver hanteras av utbildad personal eftersom vätskan kan orsaka svåra kylbrännskador.

3.2.2 Torkning

Torkning av filtermembran kräver endera silica-gel, en avfuktare eller specialpapper som torkar ut filtren. Denna metod är inte fullt utvärderad men principen är attraktiv på grund av sin enkelhet. Vidare är det en utmaning att torka inkapslade filter. Öppna filtertyper är mer lämpliga för torkning.

3.2.3 DNA-fixering

Vätskor som fixerar DNA delas in i två kategorier; konserveringsvätskor och lyseringsbuffertar.

3.2.3.1 KONSERVERINGSVÄTSKOR

Konserveringsvätskor som etanol (för eDNA minst 96 % v/v etanol av molekylär grad) och RNALater fixerar DNA på filtret och materialet konserveras och kan bevaras under längre tid fram till att DNA utvinns (extraheras). Under det första steget i extraktionsskedet då eDNA utvinns avlägsnas vätskorna från filtret och filtret torkas och extraheras med en lyseringsbuffert. För etanol torkas filtret och DNA utvinns separat från alkoholen och sammanknörs vid det första extraktionssteget.

För utvinning av akvatiskt eDNA för att analysera närvärt av rygggradsdjur och musslor har etanol visat sig vara den effektivaste fixeringsvätskan där proverna kan bevaras under lång tid utan att kvaliteten på DNA försämras (Spens m.fl. 2017). Prover bevarade i etanol i kycklåp under 15 månader visade ingen försämring av DNA-kvaliteten då de jämfördes med prover som extraherades genast efter att de ankommit till laboratoriet (Hellström m.fl. opublicerat data). Filter som fixeras i etanol kan skickas från fält till laboratoriet utan tillstånd eftersom volymerna är så små, ändå kan etanol av molekylär grad vara svårt att få tag på i andra länder. Nackdelen med etanol är att vätskan evaperar snabbt och kan förlora sin koncentration om flaskor eller filter inte tillsluts ordentligt efter användning.

3.2.3.2 LYSERINGSBUFFERTAR

Lyseringsbufferten används i första steget under eDNA-extraktion och löser upp cellväggarna så att DNA faller ut i lyseringsvätskan. Lyseringsvätskor såsom Longmire's buffert (Longmire m.fl. 1997) eller lyseringsvätskor som ingår i kommersiella DNA-extraktionskit kan användas som fixering av filter i fält för att sedan direkt användas i DNA-extraktionens första steg.

Longmire's buffert (LM) är saltbaserad och är lämpad för eDNA-analyser (Longmire m.fl. 1997; Wegleitner m.fl. 2015) men är inte tillgängligt kommersiellt och behöver tillverkas i ren laboratorium. RNALater bevarar mikrober och eRNA parallellt med makrobiotiskt eDNA. Spens m.fl. (2017) jämförde flera olika kombinationer av filtertyper och konserveringsmetoder för fisk-eDNA, där etanol och LM visade bäst resultat.

För att vidare undersöka om LM och etanol visar samma resultat då det gäller artdiversiteten i olika habitat jämfördes dessa två fixeringsmetoder (se avsnitt 6).

4 eDNA-laboratoriekrov och extraktioner

Denna del av rapporten sammanfattar de riktlinjer för laboratoriekrov och extraktionsmetoder för eDNA-analyser anpassade för svenska förhållanden som generades inom EU-konsortiet DNAquaNet. EU-konsortiet nådde konensus då det gällde både insamling av prover, fixering, filtrering, laboratoriekrov och eDNA-extraktioner, vilket resulterade i en handbok där fyra av deltagarna var medförfattare och två huvudförfattare (Bruce m.fl. 2021).

eDNA-extraktioner innebär att DNA utvinns från ett prov genom olika steg av sönderdelnings- och reningsprocesser som resulterar i ett prov med rent DNA, fritt från andra cellkomponenter.

Det filtrerade provet behöver vid ankomst till laboratoriet rengöras på utsidan från kontamineringar innan provet förs in i laboratoriet. DNA-dödande medel som 50 % hypoklorit eller DNAway rekommenderas för att rengöra filterkapslar och provrör från DNA-kontamineringar på utsidan.

DNA-extraktioner innehåller olika steg i laboratoriet från att filtren anländer till att utvunnet eDNA bevaras i ett provrör. De olika utvinningsstegen delas in i, sönderdelningsfas (lysering), bindningsfas (DNA binds till ett substrat), tvättningsfas (de celldelar som inte är DNA tvättas bort) och elueringsfas (DNA fälls ut i en konserveringsvätska).

4.1 Krav på eDNA-laboratorier

Alla sorters laboratorieundersökningar kan leda till felkällor om inte nödvändiga åtgärder vidtas.

- När eDNA-proverna anländer till laboratoriet är det viktigt att proven rengörs på utsidan innan de flyttas in till laboratoriet.
- Extraktionerna bör ske i utrymmen enbart avsedda för eDNA-extraktioner och inte i utrymmen där vävnadsprover extraheras (Goldberg m.fl. 2016; Bruce m.fl. 2021).
- Extraktionsutrymmet bör vara fysiskt åtskilt från prepareringslaboratoriet för PCR – som i sin tur bör vara separerat från PCR- och sekvenseringslaboratoriet.
- All utrustning såsom pipetter och annan laboratorieutrustning ska inte lämna laboratoriet. Lådor med provrör, kits och andra engångsprodukter skall avkontamineras (se nedan) innan de förs in i laboratoriet.
- Extraktionsrummet ska rengöras med DNA-dödande medel. Notera att autoklavering inte är effektivt för att avlägsna DNA från ytor. DNA-dödande ämnen, som inte innehåller klorin, kan med fördel användas. Exempel på alternativa produkter för detta ändamål är LabClean, PCRClean från Minerva Laboratories. Det vanligaste medlet för att avlägsna DNA-spår i laboratorier är hypoklorit (50 % klorin industriell grad), och därefter 70 % alkohol. Hypoklorit dödar DNA men kloret kan reagera med saltet guanidiniumtiocyanat som finns i vissa extraktionsbuffertar vilket gör att vätecyanidgas kan bildas, därför är avtorkning av ytorna med etanol efter rengöring med klorinreparat viktigt.

- Extraktionerna bör ske under en laminär flödeskåpa eller UV-bänk, som har ren- gjorts med klorin och som option sedan behandlats med UV-ljus före extraktionen.
- UV-ljus rekommenderas i flödeskåpan.
- Positivt tryck, HEPA-filter för inflöden samt UV-ljus rekommenderas för hela laboratoriet.
- Enbart personal som utbildats både praktiskt och teoretiskt i eDNA-extraktioner ska vistas i laboratoriet och utföra arbetet. Personalen bör även ha genomgått utbildning i molekylär laboratorieanvändning och säkerhet, vilket innefattar förståelse för reagenser och första hjälp.
- Skyddskläder såsom skoskydd, munskydd, hårskydd och laboratorierock (gäller även engångslaboratoriedräkt) och engångslaboratoriehandskar är nödvändiga. Laboratoriekläder för extraktioner kan inte användas i andra laboratorier. Varje enskilt laboratorieutrymme behöver en egen uppsättning av laboratoriekläder som är avsedda enbart för det designade utrymmet.
- Dubbla handskar ska användas. Torka av handskarna med avkontamineringssmedel och byt yttre lagret av handskar ofta under processens gång. Med dubbla handskar exponeras aldrig nakna händer som annars kan avge DNA i laboratoriet.
- Utrustningen i eDNA-laboratoriet bör inte lämna extraktionsrummet och tas in igen, vilket inkluderar pennor och anteckningsblock.
- Laboratoriearbete med eDNA kräver en noggrann planering med tanke på kontamineringsrisken mellan de olika laboratorierna. För att förhindra kontaminering mellan de olika stegen i DNA-analyserna ska teknikerna som utför extraktionerna inte besöka extraktionslaboratoriet om de vistats i pre-PCR-, PCR- eller post-PCR-utrymmen under samma dag. Flera laboratorier använder trafikljus från rött till grönt som en guide över hur man kan röra sig mellan utrymmena (Figur 2). Om personalen behöver gå från laboratorierna för vidare analys i extraktionslaboratorierna behöver de avkontamineras genom att duscha, byta kläder och klä sig i laboratorierockar, engångsdräkter, munskydd, fotskydd och handskar som är avsedda för extraktionslaboratoriet.
- Det är viktigt att laboratoriepersonalen bekantar sig med anvisningarna för användningen av rengöringsprodukterna före användning. Efter användning av extraktionslaboratoriet ska alla arbetsbänkar, pipetter, centrifuger, handtag, värmeklockor, golv, med mera rengöras med DNA-dödande ämnen.
- Efter varje användning blötläggs provrörställningar i avkontamineringsmedel enligt tillverkarnas föreskrifter.
- Extraherat eDNA bör bevaras i för eDNA avsedda utrymmen (-20°C eller -80°C beroende på vilken elueringsvätska som används).

Flödesschema för vistelse i olika analyslaboratorier under en dag



Figur 2. Vistelseschema för teknisk personal i de olika laboratorierna under en dag. Denna rapport behandlar enbart eDNA-extraktion. (Micaela Hellström).

4.2 Positiva och negativa kontroller i eDNA-extraktioner

Att inom miljöövervakning dra slutsatser baserat på artförekomst från eDNA-studier kräver data som med säkerhet kan indikera artens närvaro eller frånvaro vid en given lokal. Tillförlitligheten av data som baseras på enarts- eller flerartsanalyser av eDNA som ska fungera som underlag för åtgärder, artskydd och tillståndsprövningar ska kunna säkerställas genom att använda kontroller under hela provtagnings- och analysprocessen.

Varje utövare av genetiska analyser behöver känna till och ha erfarenhet av molekylära laboratorieprocesser och praxis. Detta gäller grundläggande genetiska analyser (Griffiths m.fl. 2005), kriminaltekniska protokoll (Board 2000; Brandhagen m.fl. 2020) och medicinska användningsområden. eDNA-undersökningar kräver förutom kunskap och erfarenheter av molekylärbiologisk praxis även ytterligare rutiner för att säkra resultatens tillförlitlighet vilket betyder att varje steg under provtagning och analyser behöver kvalitetskontroller (Goldberg m.fl. 2016; Bruce m.fl. 2021).

4.2.1 Kontroller för att utesluta falska positiva och negativa prov

Negativa och positiva kontroller är viktiga för att avgöra om proverna är rena från föroreningar och för att säkerställa att de olika stegen inom analysen lyckats.

4.2.1.1 NEGATIVT KONTROLLPROV OCH FALSKA POSITIVA PROVER

Ett negativt kontrollprov förväntas inte ge utslag för DNA för de arter man undersöker. Om provet ändå är positivt kallas detta för Typ I-fel eller falsk positiv kontroll. Notera att falska positiva utslag kan uppkomma i fältprover vid eDNA-analyser och artens DNA detekteras fast den inte är närvarande. Exempel på detta är fåglar, utter och mink som äter fisk i en sjö och förorenar nästa fiskfria sjö med avföring och därmed sprider DNA. Närhet till avloppsrör, restauranger och bebyggelse kan ge falska positiva utslag. Eftersom eDNA lätt förorenas från omgivningen och även provtagarna är det viktigt att ta hänsyn till alla situationer som kan ge upphov till falska positiva utslag.

4.2.1.2 POSITIVA KONTROLLPROV OCH FALSKA NEGATIVA PROVER

Ett positivt kontrollprov innehåller en eller flera sekvenser av målarter (s.k. ”mock communities” eller DNA från vävnadsprov) och förväntas ge positiva utslag. Ett positivt prov som inte ger en eDNA-signal fast en art är närvarande kallas för falsk negativ. Detta kallas Typ II -fel, och kan uppkomma om proverna inte är insamlade inom rätt område om det är för få prover, eller om proverna är inhiberade. Tabell 2 summerar positiva och negativa kontroller som rekommenderas vid eDNA-analyser för kvalitetssäkring.

Tabell 2. Positiva och negativa kontroller som extraheras. (Rosetta Blackmann, Micaela Hellström).

Skede i flödesschema	Positiv kontroll	Negativ kontroll	
Planering	Identifiera lokal i fält där målarterna inte förekommer.	Identifiera lokal i fält där målarterna förekommer.	Om möjligt.
Fältkontroll	Provta lokal i fält där målarterna inte förekommer.	Provta lokal i fält där målarterna förekommer.	Om möjligt.
Filterkontroll		Filtrera en negativ kontroll samtidigt som fältproverna filtreras. Destillerat vatten, DNA-fritt vatten eller mineralvatten kan användas.	Mycket viktigt.
Extraktionskontroll	Tillsätt ICP (se text) i lyseringsbufferten (LB). Om provet fixeras i LB redan i fält kontrollera att ICP tillförs. Provet kvantifieras för ICP med qPCR eller ddPCR.	Kontroller filtreras med DNA-fritt vatten i laboratoriet. Tillsätt ICP i lyseringsbufferten. Extrahera kontrollerna tillsammans med proverna.	Mycket viktigt.
eDNA inhiberingskontroll	Kontrollera om proverna är inhiberade för att undvika typ II fel. Analysera målarternas DNA med qPCR, med spädning eller kontrollera att förhållandet 230/260 finns inom rimliga värden med hjälp av Nanodrop.		Mycket viktigt.

Negativ filterkontroll innebär att ett filter behandlas precis på samma sätt som proverna som innehåller DNA men istället för vatten från akvatiska miljöer används DNA-fritt vatten som filtreras. Om proverna konserveras med lyseringsbuffert ska även en så kallad IPC (Internal Positive Control) eller exogen intern positiv kontroll adderas till bufferten. IPC kan köpas kommersiellt och innehåller artificiellt DNA som inte finns i naturen. För prover som bevaras i andra medier än lyseringsbuffert tillförs IPC med lyseringsbuffert i laboratoriet. IPC tillförs lyseringsbufferten (se nedan) i en känd koncentration för att avgöra om extraktionen lyckats. Den interna kontrollen testas med qPCR eller ddPCR i laboratorieprocedurerna som används efter DNA-extraktion. IPC ger ett mått på hur väl extraktionen lyckats. I laboratoriet tillförs även en extraktionskontroll där ett laboratoriefILTER filtreras med DNA-fritt vatten och tillförs sedan lyseringsbuffert som innehåller en IPC och extraheras tillsammans med de andra proverna. Negativa kontroller är viktiga för att försäkra sig om att proverna inte har förorenats av DNA i fält eller laboratorium.

4.3 eDNA-extraktion från filter

Extraktionsprotokoll för att utvinna eDNA baseras på modifieringar av kommersiella DNA-extraktionskit (till exempel Qiagen DNeasy, MoBio Power Water, Power Soil kits), kolumnbaserade metoder (Sellers m.fl. 2018) eller vätskefasmetoder (Renshaw m.fl. 2015; Deiner m.fl. 2018). Resultat och data som används för rutinmiljöövervakning där slutanvändare är myndigheter eller industri behöver vara jämförbara, därför rekommenderas kommersiella kit eller modifieringar av dessa eftersom reagenserna i kiten är standardiserade och certifierade för att vara fria från biologisk kontamination. Protokoll för vätskefasmetoder med fenol-kloroform-isoamyl är effektiva och producerar DNA med höga koncentrationer (Deiner m.fl. 2015). Samtidigt är fenol och kloroform olämpliga ur miljö- och hälsosynpunkt vilket gör att metoden undviks av kommersiella laboratorier.

DNA-extraktioner som baseras på kommersiella kit med eller utan avvikeler från grundprotokollet har fördelen att reagenserna är certifierade och inte varierar mellan olika kit samt tillverkningsomgångar. I kiten medföljer protokoll och även säkerhetsföreskrifter som bör följas både med tanke på utförarens säkerhet och det sluttgiltiga resultatet. Flera kommersiella extraktionskit innehåller buffertar med guanidiniumtiocyanat eller guanidiniumhydroklorid vilka som nämnts tidigare, kan reagera med klorin och bilda farliga gaser, bland annat vätecyanidgas.

De initiala stegen för DNA-extraktioner bör vara anpassade efter filtertyp och konserveringstyp av filtren (Spens m.fl. 2017; Bruce m.fl. 2021). Typen av lysering (sönderdelningsfas av celler) beror på vilka taxa som skall analyseras. Vattenprover som filtreras för eDNA-analyser innehåller enskilda celler från vertebrater och evertebrater och kan lätt delas sönder kemiskt med hjälp av en lyseringsbuffert. Kisalger kräver mekanisk sönderdelning för att cellväggarna skall brytas ner. För analys av kisalger från filter rekommenderas öppna filter. Om slutna filter används bör filtret avlägsnas för mekanisk sönderdelning där cellväggarna spräcks genom att använda små glaskuler eller sonikering (proverna utsätts för ultraljud för att sönderdela cellerna).

Enzymet Proteinase K tillförs för att bryta ner andra enzym såsom DNase som annars leder till degration av DNA i det extraherade provet över tid. Prover som extraheras utan Proteinase K kan hålla länge om de bevaras på ett riktigt sätt, men sönderfall är oundvikligt om proverna bevaras under en längre tid utan Proteinase K.

Den sista fasen av DNA-extraktioner är den så kallade elueringsfasen då DNA som finns i pelletform eller är bundet i ett filter (beroende på extraktionsmetod) blir upplöst i DNA-konserveringsvätska. De kommersiella kiten innehåller en buffert som mest består av vatten. Vätskan kan med fördel bytas ut till molekylär grad buffert TE pH 8 vilket gör att DNA-integriteten bevaras och proverna kan fraktras mellan olika laboratorier i rumstemperatur. I elueringsfasen rekommenderas att vätskan värmes upp till 70 °C för att uppnå högre DNA-koncentrationer.

5 eDNA-resultat från olika laboratorier flerartsanalyser av fisk

5.1 Bakgrund

För att kontrollera om resultat från olika utövare är jämförbara genomfördes en studie sommaren 2019 där eDNA-utövare från olika organisationer jämförde resultat baserat på eDNA-metabarkoding för fisk från ett stort samlingsprov från River Hull i Storbritannien. Ett av kriterierna för deltagandet i projektet var att deltagarna skulle ha gedigen kunskap och erfarenhet av både provtagning och analyser samt arbeta i laboratorier som följer riktlinjer för eDNA-analys. Målet med denna jämförelse är inte ett ringtest eller en validering angående vilka metoder som är bäst, utan snarare kontroll om resultat för laboratorier med väluttänkta och validerade flödesscheman visar jämförbara resultat.

Undersökning syftar till att besvara följande frågeställning: Är resultaten av flerartsanalyser på fisk mellan olika etablerade eDNA-laboratorier jämförbara?

5.2 Metoder

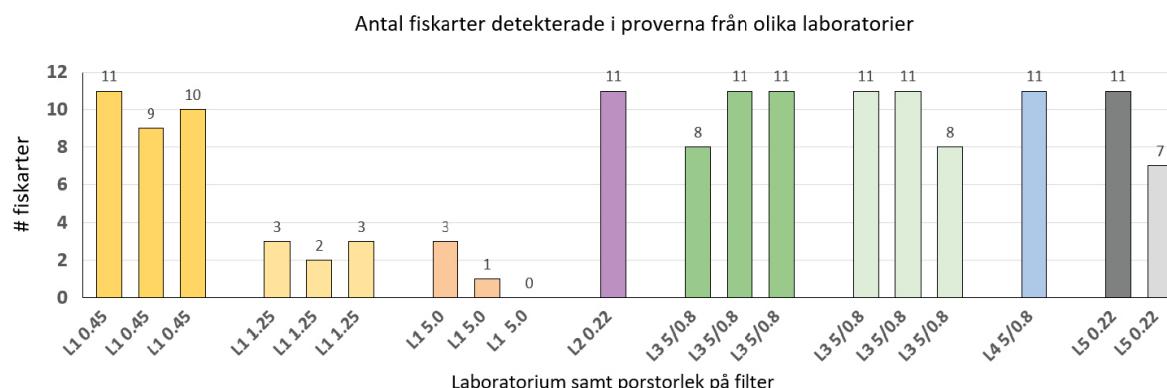
I juni 2019 anordnade FSBI (Fisheries Society of the British Isles) en konferens i Hull med 121 delegater från 27 länder med temat “Advances in eDNA-Based Approaches to Fish Ecology and Management” (Hänfling & Lawson-Handley 2021). Fem av medlemmarna inom LifeDNAquatics deltog i kongressen. En av aktiviteterna under kongressen var att jämföra resultaten för flertalsanalyser av fisk mellan olika laboratorier. Tusentals liter vatten samlades in från River Hull och överfördes som ett samlingsprov till en rengjord plaskdamm. Deltagare från fem olika anonymiseringar av laboratorier var inbjudna att ta vattenprover från fiskdammen och uppmanades att följa de protokoll som de vanligtvis använder för flerartsanalyser av fisk. Detta innebar att både filtertyp, volym filtrerat vatten, konservering samt markörer skiljer sig mellan utövarna (Tabell 3). Bioinformatiken var liknande för alla prover, med NCBI och interna databaser som referenser. Ett av proverna som togs från dammen ingår i LifeDNAquatic projektet. Fem laboratorier deltog i experimentet och använde olika protokoll enligt Tabell 3. Lab 1 testade även filter med större porstorlek –5,0 µm och 1,25 µm. Utövarna var medvetna om att dessa filter var ett test för att förstå inverkan av storleken på filterporer för slutresultaten.

Tabell 3. Översikt av variationer i metoder mellan de olika laboratorierna. (Micaela Hellström).

	Lab 1	Lab 1	Lab 1	Lab 2	Lab 3a	Lab 3b	Lab 4	Lab 5a	Lab 5b
Filter och porstorlek	0.45 MCE Whatman	Smith Root 1.25	Smith Root 5	Sterivex PES 0.45	NM Gf 5/ PES 0.8	NM Gf 5/ PES 0.8	NM Gf 5/ PES 0.8	Sterivex PES 0.22	Sterivex PES 0.22
Filtertyp	Öppna	Inhysta	Inhysta	Slutna	Slutna	Slutna	Slutna	Slutna	Slutna
Volym filtrerat	1500	1500	1500	800	1500	1500	1500	500	250
Konservering	Frysta	SP	SP	RNA later	LM	LM	EtOH	EtOH	EtOH
Extraktions-metod	Mu-DNA	Mu-DNA	Mu-DNA	Q Blood & Tissue P1	Q Blood & Tissue P2	Q Blood & Tissue P2	Q Blood & Tissue P3	Mu-DNA	Mu-DNA
Markör	Riaz 2011	Riaz 2012	Riaz 2013	Miya 2015	Miya 2015	Miya 2015	Miya 2015	Miya 2015	Miya 2015
Antal PCR replikat	3	3	3	8	12	12	12	12	12
Sekvensering	MiSeq	MiSeq	MiSeq	MiSeq	MiSeq	MiSeq	MiSeq	MiSeq	MiSeq

5.3 Resultat

Antalet detekterade arter uppvisar en viss variation mellan de olika laboratorierna. Skillnaderna är en tydlig effekt av val av filter och för utövare med filter av likartade dimensioner är resultaten jämförbara. Stapeldiagrammet i Figur 3 visar antal arter som detekterades i respektive prov.



Figur 3. Stapeldiagram som visar resultat av antal fiskarter som detekterades i de olika proverna. L1–L5 annoterar de olika laboratorierna och siffrorna i laboratorienamnet anger porstorlek på filtren. (Micaela Hellström).

Figur 4 visar vilka arter som detekterades i respektive prov och ger även en indikation på arternas relativa biomassa. Resultaten från de olika utövarna uppvisade mycket liknande resultat då data presenteras som relativ biomassa (procentuell andel). Av totalt 14 detekterade arter kunde förekomst verifieras för 12 av dessa på provtagningsplatsen.

	L1 0.45	L1 0.45	L1 0.45	L1 1.25	L1 1.25	L1 1.25	L1 1.5	L1 1.5	L2 0.22	L3a 5/0.8	L3a 5/0.8	L3a 5/0.8	L3b 5/0.8	L3b 5/0.8	L4 5/0.8	L5/0.22	L6/0.22
Mörт	X X X	X X X	X X X	X X					X	X X X X	X X X X	X X X X	X	X X X			
Abborre	X X X	X X X	X X X		X				X X X X	X X X X	X X X X	X X X X	X X X	X X X	X X X		
Skrubbskädda	X X X								X X X X	X X X X	X X X X	X X X X	X X X	X X X	X X X		
Gädda	X X X			X					X X X X	X X X X	X X X X	X X X X	X X X	X X X	X X X		
Storspigg	X X X				X				X X X X	X X X X	X X X X	X X X X	X X X	X X X	X X X		
Stensimpa	x x x								X X X X	X X X X	X X X X	X X X X	X X X	X X X	X X X		
Ål	x x x								X X X X	X X X X	X X X X	X X X X	X X X	X X X	X X X		
Lax									X X X X	X X X X	X X X X	X X X X	X X X	X X X	X X X		
Braxen	x	x	x	x					X X X X	X X X X	X X X X	X X X X	X X X	X X X	X X X		
Stäm									X X X X	X X X X	X X X X	X X X X	X X X	X X X	X X X		
Grönling									X X X X	X X X X	X X X X	X X X X	X X X	X X X	X X X		
Storspigg	x x								X X X X	X X X X	X X X X	X X X X	X X X	X X X	X X X		
Björkna	x x								X X X X	X X X X	X X X X	X X X X	X X X	X X X	X X X		
Löja	x x x																

Figur 4. Figur som visar resultat av arternas förekomst i prover som analyserats i olika laboratorier. Varje kolumn är ett prov. Storleken på X anger artens dominans inom varje prov. L1–L5 annoterar de olika laboratorierna och siffrorna i laboratorienamnet anger porstorlek. Björkna och löja är märkta i rött eftersom de upptäcktes med unika markörer. (Micaela Hellström).

5.4 Slutsatser

De preliminära slutsatserna av försöket visar att eDNA-metabarkoding är en robust metod som är jämförbar mellan olika laboratorier. Studien visar även att arter som utgör mindre än 0,5 % av biomassan detekteras. Vidare utgjorde arter som inte detekterades av samtliga utövare en mycket liten del av biomassan, med en median på 0,28 % av de totala läsningarna i de prov där de detekterades.

Resultaten indikerar även att en större porstorlek kan påverka resultaten eftersom storlek 1,25 samt 5,0 µm från L1 visade låg detektion av arter. Resultaten skiljer sig i synnerhet för arter med liten biomassa, både inom och mellan laboratorier. En av orsakerna till skillnaderna i artdetektion kan även bero på olika pipelines i bioinformatiken.

6 Jämförelse av artdetektion mellan två olika eDNA-fixeringsmetoder

6.1 Bakgrund

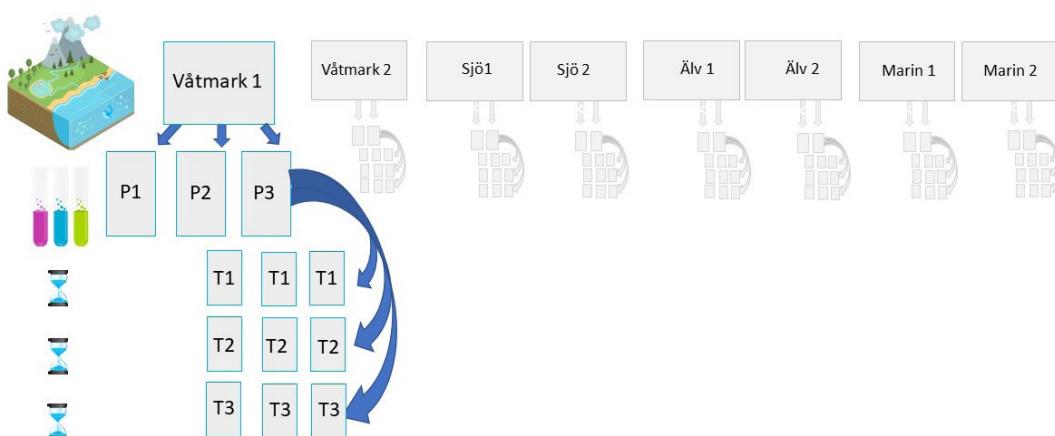
Tidigare empiriska undersökningar som jämfört utfallet av artdiversitet beroende på fixeringsmetoder av eDNA-filter har visat att etanol och LM har visat högre eDNA-koncentration och effektivare artdetektion (Spens m.fl. 2017).

De flesta jämförelser mellan konservering och filtermetoder har utförts i sötvattensmiljöer. En mesokosmstudie (Mauvisseau m.fl. 2021) visade att LM uppvisade goda resultat. Då Spens m.fl. (2017) i två enartsstudier visat att etanolfixering gav bäst resultat, byggde vi vidare på frågeställningen om eDNA fixerat med etanol och LM uppvisar liknande resultat gällande artdiversitet. Studien syftar till att besvara följande frågeställningar:

1. Vilken påverkan har konservering på integriteten av eDNA?
 - Finns det en effekt av fixeringsmetod?
 - Finns det en tidseffekt?
 - Är mönster konsekventa i olika habitat?
2. Påverkar koncentrationen av målarts-DNA detektionen av artantal?
 - Detekteras alla arter lika över samtliga prover?

6.2 Metoder

Experimentuppsättningen för denna jämförelsestudie visas i Figur 5.

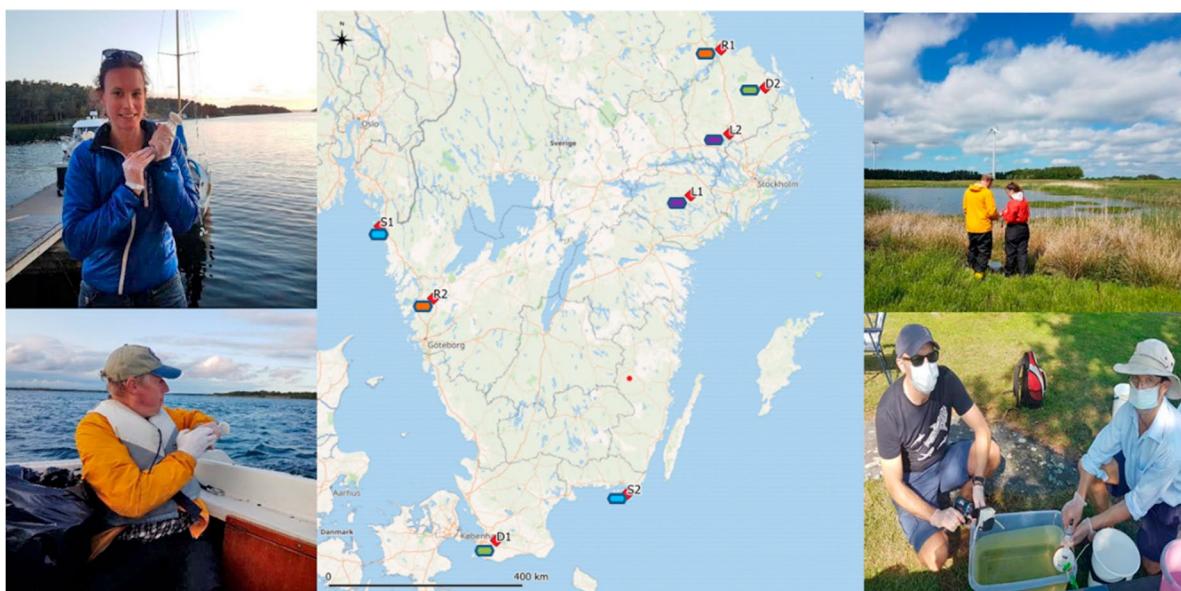


Figur 5. Provtagningsuppsättning. 4 habitat × 2 lokaler × 2 konserveringsmetoder × 3 förvaringstider × 3 replikat. (Micaela Hellström).

Fyra olika habitat, (våtmark, sjö, rinnande vatten och marina habitat) med två representativa lokaler av varje typ inkluderas i undersökningen (sammanlagt åtta lokaler, se Figur 6). På varje lokal samlades 50–100 liter vatten in i flera underprover som sammanslogs till ett samlingsprov. För varje lokal filtrerades lika volymer vatten genom 20 filter.

Filtren delades in i två huvudgrupper – P1 och P2 (från engelskans preservative), där hälften av filtren fixerades med LM och den andra hälften med etanol. Dessa grupper delades in i tre undergrupper där filtren bevarades i +4 °C fram till extraktion. eDNA extraherades inom två veckor (T1), tre månader (T2) och sex månader (T3) efter provtagningen.

Uppsättningen var följdande; fyra olika habitat × två lokaler × två konserveringsmetoder × tre tidpunkter × tre replikat samt kontroller (3×8), vilket resulterade i 177 prover och 1600 liter vatten. Flera personer deltog i fältarbetet och proverna fördelades jämnt mellan de olika grupperna och filtrerades samt fixerades omedelbart i fält med antingen LM eller etanol.



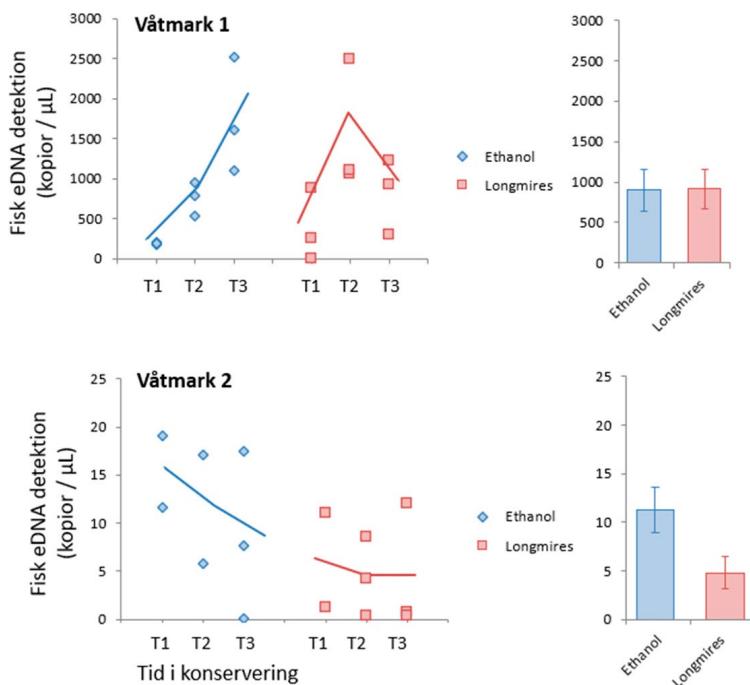
Figur 6. Karta över provtagningspunkterna för konserveringstestet samt bilder på provtagningen. (Micaela Hellström).

Proverna analyserades med eDNA-metabarkoding med MiFish-markörer (Bilaga 1). Antalet arter och DNA-koncentrationer mellan de olika behandlingarna (etanol och LM) jämfördes. Mängden eDNA i proverna mättes med antal kopior per uL då fiskmarkörer (för alla arter) användes som ddPCR-markör. DNA som inte tillhör målarter mättes alltså inte i denna undersökning.

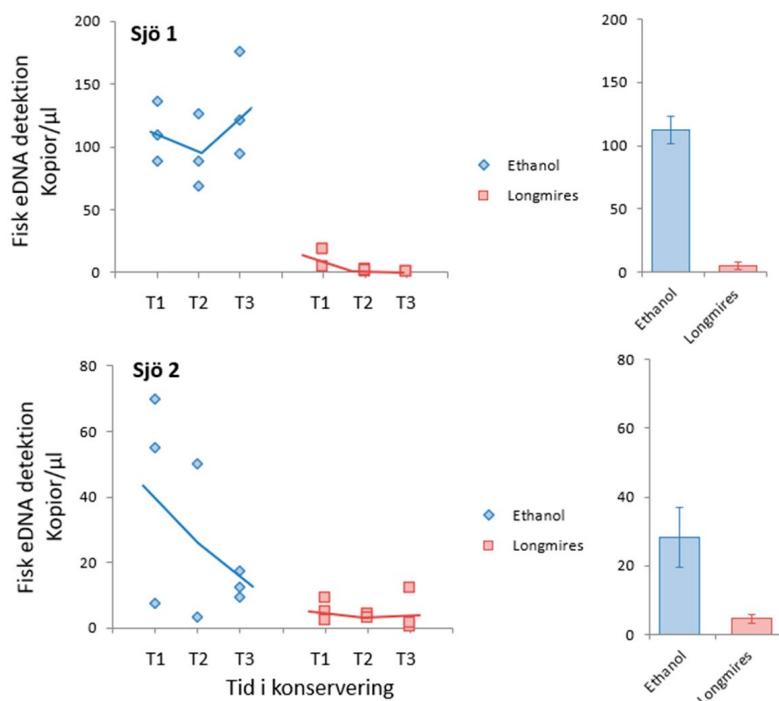
6.3 Resultat

6.3.1 Mängden fisk-eDNA i relation till konservering och tid

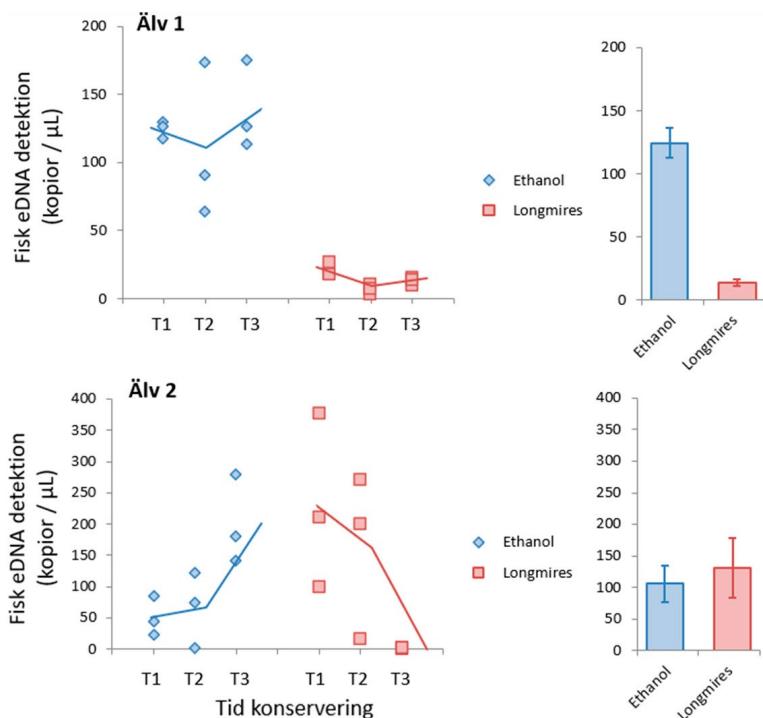
Valet av konserveringsmedel uppvisade en tydlig effekt där den erhållna DNA-koncentrationen (DNA-kopior/ μ L) var markant högre för prover som bevarats i etanol. Däremot kunde ingen tydlig effekt av tid urskiljas för någon av konserveringsmetoderna (Figur 7–10), men eftersom mängden av eDNA påverkar artdetektionen visar resultaten tydligt att etanol är att föredra. Vidare skiljde sig mängden DNA stort mellan de olika habitaten och proverna vilket inte är förvånande eftersom både artantal och DNA-koncentration varierar i olika habitat. Den relativa biomassan för de specifika arterna och vilka arter som detekterats i varje prov visas i Bilaga 2.



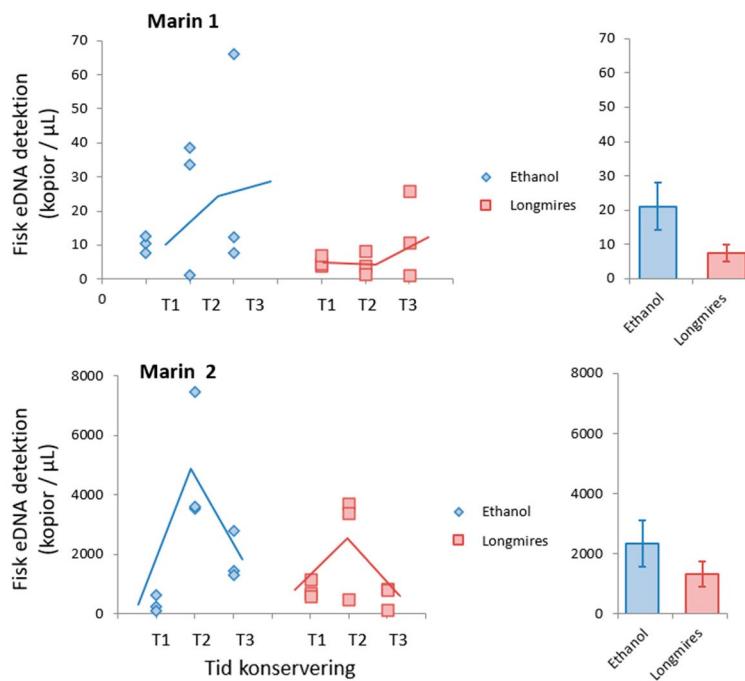
Figur 7. Vätmakrshabitat. Antal DNA-kopior av fisk per mikroliter (uppmätt med ddPCR) i proverna bevarade i etanol vs. LM-lösning över tid. (Rein Brys).



Figur 8. Sjöhabitat. Antal DNA-kopior av fisk per mikroliter (uppmätt med ddPCR) i proverna bevarade i etanol vs. LM-lösning över tid. (Rein Brys).



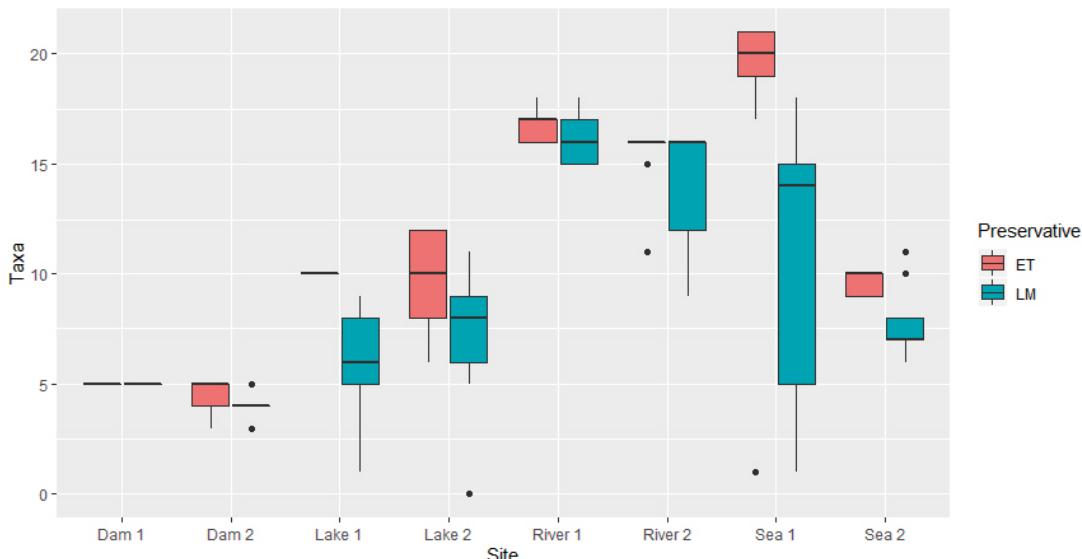
Figur 9. Rinnande vatten. Antal DNA-kopior per mikroliter (uppmätt med ddPCR) i proverna bevarade i etanol vs. LM-lösning över tid. (Rein Brys).



Figur 10. Marina habitat. Antal DNA-kopior av fisk per mikroliter (uppmätt med ddPCR) i proverna bevarade i etanol vs. LM-lösning över tid. (Rein Brys).

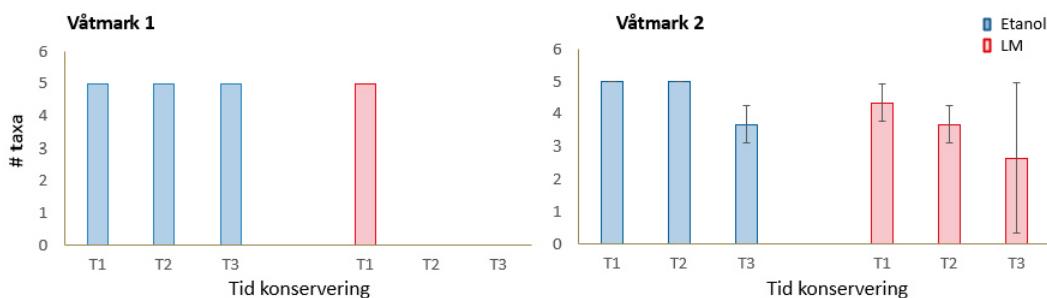
6.3.2 Resultat av artdetektion i relation till konservering och tid

Resultaten visade att prover som fixeras med etanol detekterar en större artmångfald än prover fixerade med LM (Figur 11), vilket är en funktion av att mängden målarts-DNA var högre i prover fixerade med etanol. Störst skillnad upptäcktes i marina habitat vilket kan bero på den höga salthalten som påverkar saltkoncentrationerna i LM.



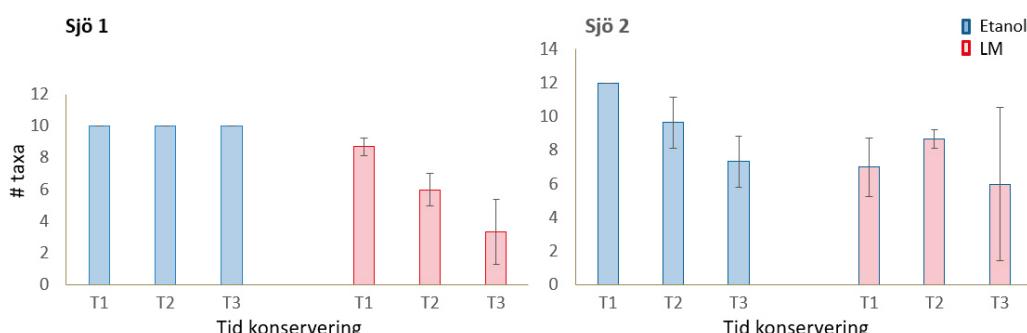
Figur 11. Boxplot som visar att eDNA-filter som konserveras i etanol detekterar flera arter än eDNA-filter bevarade i Longmire's lösning (för varje plot, n=9). (Johan Näslund).

Sett till antalet detekterade arter över tid fanns en indikation till nedgång av detektionsgrad i prover fixerade med LM medan prover fixerade med etanol var stabila. Resultaten för de olika konserveringsmetoderna i Våtmärk 1 var identiska då alla prover fixerade med LM extraherades inom två veckor efter provtagningen medan proverna i etanol extraherades och analyserades enligt tidsplanen (Figur 12).



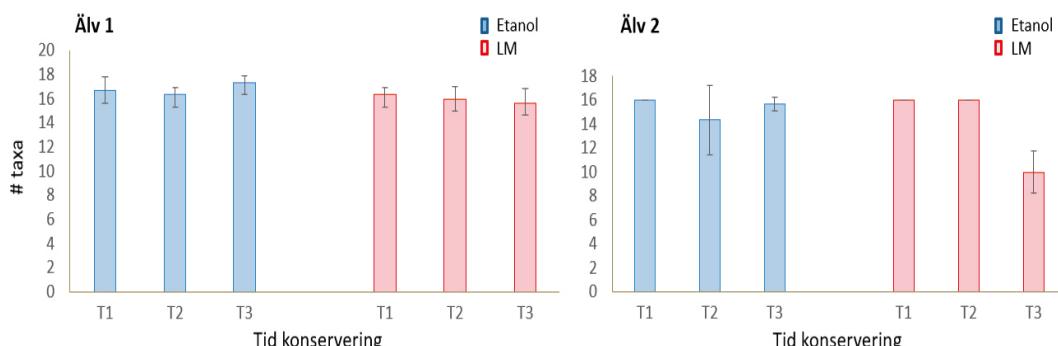
Figur 12. Våtmärkshabitat. Antal unika fisksekvenser (medelvärde och standardavvikelse) som detekterades i proverna uppbevarade etanol eller Longmires lösning. (Micaela Hellström).

Proverna från sjöarna visar jämförbara resultat med de olika konserveringsmetoderna för T1 men artmångfalden sjunker över tid för LM (Figur 13).



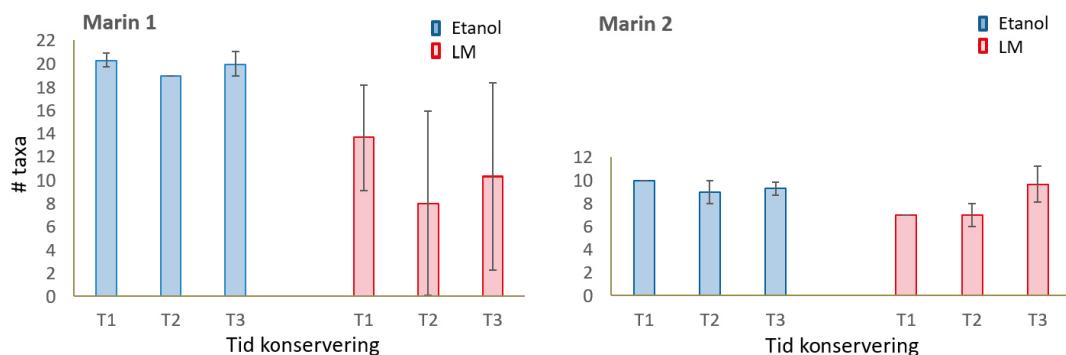
Figur 13. Sjöhabitat. Antal unika fisksekvenser (medelvärde och standardavvikelse) som detekterades i proverna uppbevarade etanol eller Longmires lösning. (Micaela Hellström).

Proverna från rinnande vatten visar också jämförbara resultat med de olika konserveringsmetoderna förutsatt att proverna analyseras inom mindre än tre månader från att de anländes till laboratoriet. För T3 sjunker artmångfalden över tid för LM (Figur 14). Etanolproverna detekterade flera arter än LM-proverna.



Figur 14. Rinnande vatten. Sjöhabitat. Antal unika fisksekvenser (medelvärde och standardavvikelse) som detekterades i proverna uppbevarade etanol eller Longmires lösning. (Micaela Hellström).

Proverna från marina miljöer visar ingen artförändring hos prover som bevarats i etanol medan artdiversiteten för LM-prover minskar över tid. För T3 sjunker artmångfalden över tid för LM (Figur 15). Proverna som bevarats i etanol visade ingen skillnad i artmångfald över tid och detekterade flera arter än LM-proverna.



Figur 15. Marina habitat. Antal unika fisksekvenser (medelvärde och stdev) som detekterades i proverna uppbevarade etanol eller Longmires lösning. (Micaela Hellström).

6.4 Slutsatser

Skillnader i artdetektion som en funktion av val av konserveringsmedel i filter och bevaring över tid är små då proverna genast processas. Bevaring i etanol över tid har ingen tydlig påverkan på integriteten av eDNA eller antal arter som detekteras. I miljöer med högre artdiversitet och för arter som inte är dominanter finns en större variation i detektion över tid då LM används. Undersökningen fastslår att etanol är en säker konserveringsmetod som resulterar i högre målartskoncentrationer och detektionssannolikhet jämfört med LM.

7 Integritet av eDNA i filter konserverade i etanol i 18 månader

7.1 Bakgrund

För eDNA-studier som utförs i avlägsna områden långt från elektricitet och laboratorier är det av stor vikt att kunna bevara prover under längre tid innan de analyseras. Ibland tas även extra prover under fältfasen som back-up för senare analyser. Renshaw m.fl. (2015) och Spens m.fl. (2017) visade att filtrerade och konserverade vattenprover kan bevaras i 14 dagar i LM eller alkohol utan att påverka integriteten av eDNA. Mauvisseau m.fl. (2021) jämförde effekterna av olika konserveringsmetoder av filter från ett mesokosm-experiment och visade att LM och frysta prover gav goda resultat, dock undersöktes inte etanol som konserveringsämne i studien.

Eftersom Avsnitt 6 i denna rapport visar att den erhållna eDNA-koncentrationen och antalet detekterade arter är högre för prover som konserveras med etanol utfördes denna underökning av eDNA-integritet över tid med prover som bevarats i etanol.

I augusti 2018 inventerades fisksammansättningen i sjön Båven (Näslund m.fl. 2019) med eDNA-flerartsanalyser. Sammanlagt 18 lokaler provtogs för eDNA-analyser. På femton av lokalerna togs två separata prover av vilka det ena analyserades inom två veckor efter provtagningen och det andra bevarades i +4 °C i 470 dagar innan det analyserades.

Kapitlet syftar till att undersöka huruvida det finns skillnader i artdetektion mellan filter som bevarats i etanol under fyra veckor före extraktion jämfört med prover som bevarats i 16 månader.

7.2 Metoder

Femton av provuppsättningarna (n=30) fanns tillgängliga för att göra en jämförande analys för förekomster av fiskarter i filter bevarade i etanol i två veckor (T1) och 470 dagar (T2). Proverna för T2 bevarades i +4 °C fram till att de extraherades. Proverna analyserades för förekomst av fisk för båda perioderna och även för förekomst av stormusslor (enbart från DNA insamlat under T2). Laboratoriemetoderna för fisk och musslor beskrivs i Bilaga 1.

Proverna från T1 och T2 analyserades på samma sätt från extraktion till PCR och sekvensering. Sekvenseringsdjupet (antal läsningar per prov) var högre vid T2. År 2018 användes en separat markör för att detektera mal i Båven. Arten togs bort från analyserna från T2 för att resultaten skulle vara jämförbara mellan de två tidpunkterna. Analyserna jämförde relativ biomassa, det vill säga arternas procentuella andel av läsningar per prov.

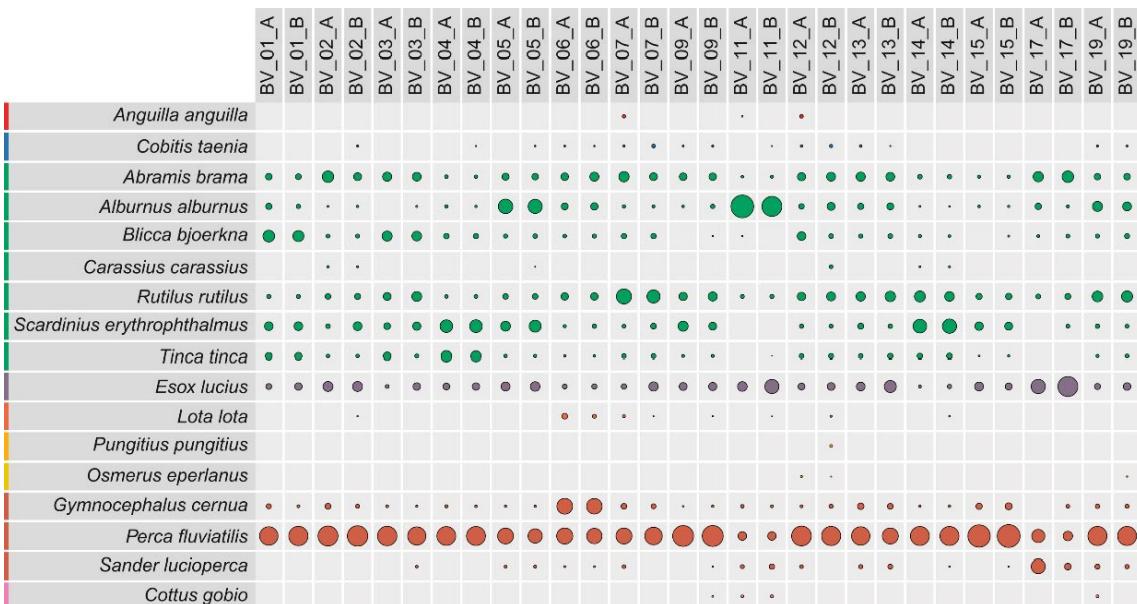
Provlokalerna för insamlingen i sjön Båven under 2018 visas i Figur 16.



Figur 16. Karta över provpunkterna i sjön Båven. (Nicklas Wijkmark, Johan Spens).

7.3 Resultat

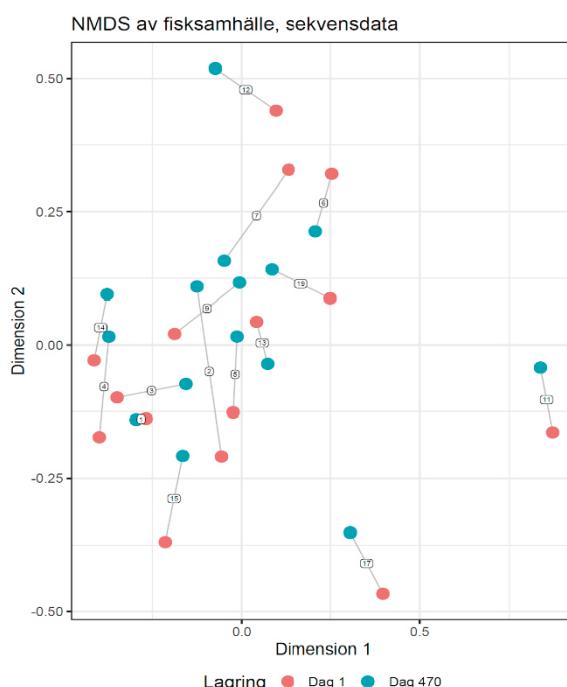
Den totala DNA-koncentrationen var högre i T1-proverna jämfört med T2. En ddPCR-mätning av proverna med samma markörer som i metabarkoding-PCR visade dock att koncentrationen av målarts-DNA var högre vid T2. Detta kan bero på att sekvenseringsdjupet vid T1 var lägre (436 048 målartssekvenser) än för T2 (962 760 målartssekvenser). Sammanlagt 17 arter detekterades av vilka 15 påträffades vid båda tidpunkterna (Figur 17).



Figur 17. Arternas dominans inom de olika provtagningslokalerna. Den relativt biomassan anger hur många gånger en sekvens av en art blivit läst (kolumner). Varje kolumn representerar ett prov. Varje kolumn visar hur många procent en art är läst av totalt 100 %. A anger prover från T1 och B prover från T2. (Cuong Tang).

Ål detekterades enbart i två prover från tid T1, medan småspigg detekterades i små mängder på en lokal under T2. Den erhållna artsammansättningen var mycket snarlik mellan T1 och T2. Mal detekterades både i T1 och T2, men arten togs bort från analyserna eftersom artens förekomst analyserades med separata markörer under T1.

Figur 17 visar proverna från T1 och T2 bredvid varandra för varje lokal. Art-detektioner för arter som var dominanterande detekterades vid båda tidpunkterna. Variationen av antal arter i proverna var inte större än skillnaderna mellan vanliga replikat. Antal arter som detekterades i genomsnitt per prov var 10,6 med en median på tio för T1 och 11,2 för T2. NMDS-ordinationen av fisksammansättningen i eDNA-proverna visar att T2 registrerade en aning högre antal artförekomster (Figur 18). Eftersom sekvenseringsdjupet var högre vid T2 beror inte skillnader i detektion på att proverna visar bättre resultat då de bevarats längre.



Figur 18. NMDS-ordination av fisksammansättningen i eDNA-proverna från Båven före och efter lagring. Punkterna utgör de enskilda proven, ljusröda: dag 1 (T1), turkosa dag 470 (T2), de grå linjerna visar sammanhörande duplikaten och dess provnummer. Dimension 1 och 2 visar den totala skillnaden mellan prover i samtliga inkluderade parametrar (de 17 fiskarterna).
R, vegan, NMDS, dimensioner: 2, distance: Bray-curtis, stress: 0.154). (Martin Andersson-Li).

7.4 Slutsatser

En mycket viktig slutsats baserat på detta resultat är att prover som fixeras med etanol kan bevaras i över 1,5 år utan att det påverkar resultaten. Detta öppnar nya möjligheter för eDNA-utövare och användare att ha möjligheter att analysera väl-bevarade prover långt efter genomförd provtagning. Resultaten från undersökningen i Avsnitt 6 understöder slutsatserna i denna studie. Rekommendationen är att fixera prover i etanol om de inte analyseras inom några veckor efter provtagningen.

8 Rumsliga insamlingsstrategier

8.1 Bakgrund

I denna delstudie demonstrerar vi hur eDNA effektivt kan användas för att kartlägga komplexa vattennätverk och hur en inventering kan optimeras för att detektera maximal artmångfald genom att ta fysiska, kemiska och biologiska faktorer i beaktande. Moälvens avrinningsområde är ett heterogent vattennätverk av vattendrag, våtmarker och sjöar. Avrinningsområdet omfattar en areal på 2 310 km², med en höjdgradient från havsnivå upp till 515 meter, och mynnar i Bottenhavet utanför Örnsköldsvik. Förutom sin varierade topografi har avrinningsområdet en väldokumenterad fiskfauna. Detta härrör från en rik sportfiskekultur samt den mångåriga forskning som bedrivits i området (Spens & Ball 2008). Sammantaget gör det området särskilt lämpat för undersökning av inventeringsdesign och rörelse av eDNA i landskapet.

Studien syftar till att besvara följande frågeställningar:

1. Vilken förmåga besitter eDNA att kartlägga områdets fiskpopulationer och vilka faktorer är viktigast att ta i beaktande under provtagningens planeringsstadium?
2. Hur rör sig eDNA i vattennätverket och vilken spatial utbredning representerar eDNA-proven?

8.2 Metoder

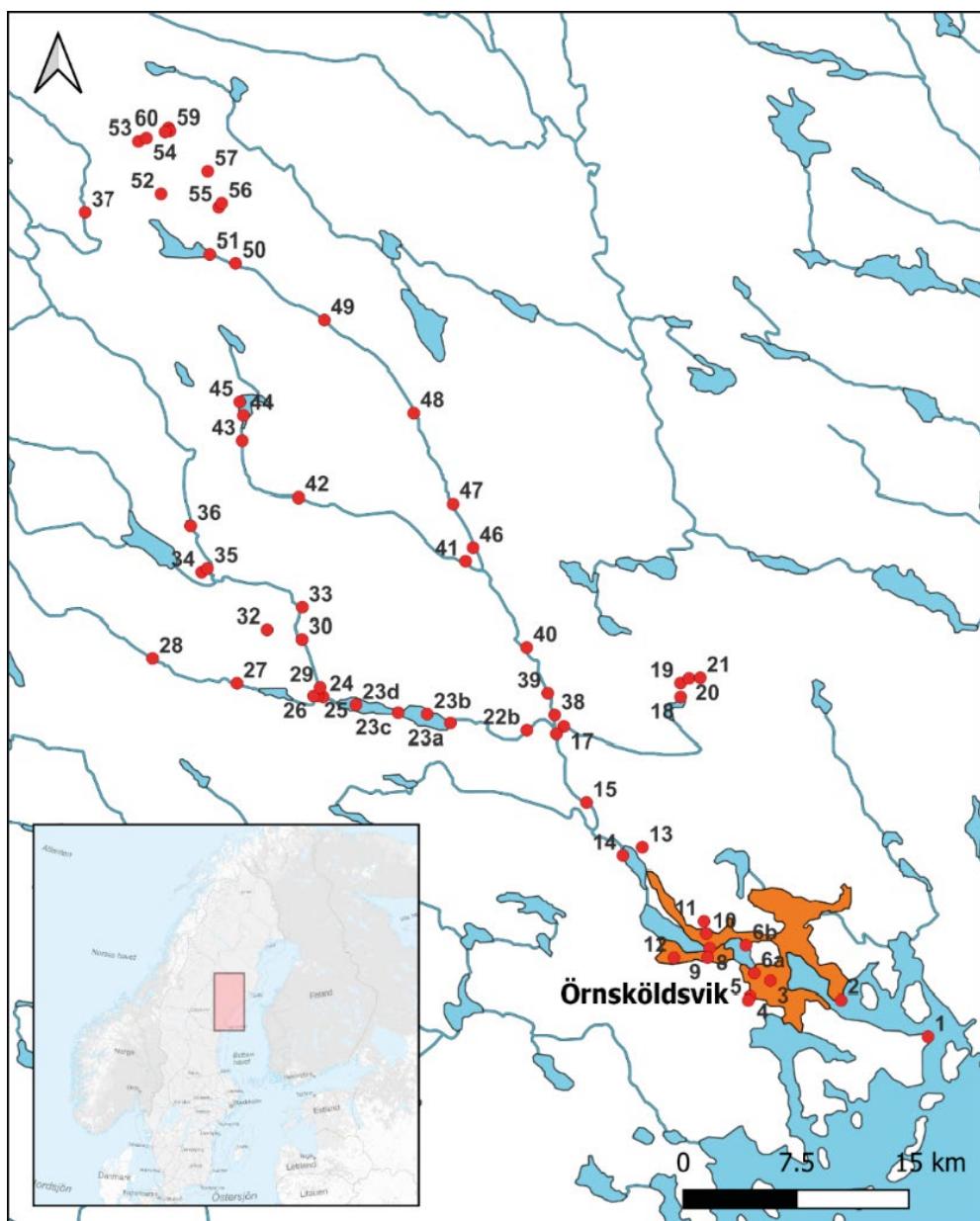
Vid planering av eDNA-inventering i Moälvens avrinningsområde övervägdes ekologiska aspekter kring förväntad artförekomst tillsammans med fysiska förhållanden såsom djup, flödescartigheter, vattenskiktning, höjdskillnader, vattenvolymer samt naturliga och antropogena barriärer i miljön (Spens m.fl. 2007a; 2007 b; Spens & Ball 2008; Jerde m.fl. 2016; Deiner m.fl. 2016; Hänfling m.fl. 2016; Shogren m.fl. 2017; Pont m.fl. 2019, Bruce m.fl. 2021). Faktorerna att ta i beaktande finns beskrivna i Avsnitt 2.1.

Inom ett avrinningsområde bromsar sjöar vattnets rörelse, och därmed eDNA-partiklarnas, med effekten att vattendrag uppströms får en minskad betydelse för kompositionen av eDNA-partiklar. I rinnande vatten är eDNA ofta bättre blandat och mer homogen, undantag kan dock uppkomma som en effekt av strömmar och skiftande flödesriktning (Jerde m.fl. 2016; Pont m.fl. 2018; Shogren m.fl. 2018). Kunskap om arters livshistoria och ekologi kan fördelaktigt vägas in i provtagningsdesignen för att öka chansen för detektion (Bista m.fl. 2017).

Förekomst av vandringshinder inom vattennätverket lokaliseras inom undersökningsområdet. Vidare togs nivån för högsta kustlinjen i beaktande då denna historiskt påverkat fiskarternas utbredning och skapat refuger för glaciala reliktarter i landskapet.

Vid planeringen av provtagningslokaler beaktades även historiska utplanteringar av fisk (framför allt fjällröding, regnbåge och bäckröding), tidigare rotenonbehandlingar samt historiska och befintliga elfiskelokaler. Vidare testades en lokal i Anundsjö där prover togs på djupt vatten nära ett avloppsrör för att förstå hur kontaminering kan fungera.

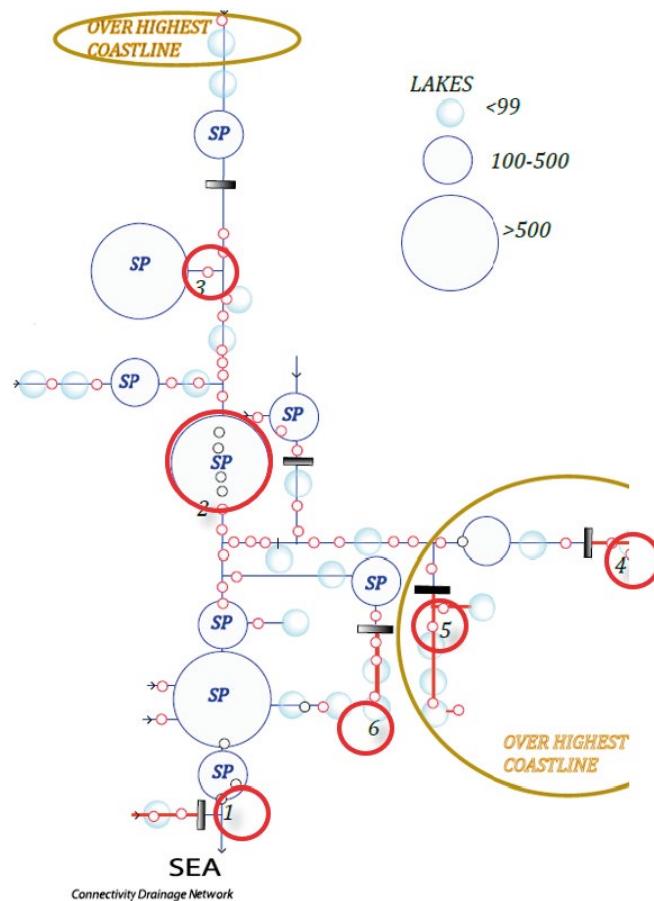
Totalt valdes 66 provtagningslokaler inom Moälvens avrinningsområde ut, fördelade mellan huvudfärnor, biflöden, sjöar och estuarier. Detta för att kunna kartlägga biodiversiteten samt förändringen av eDNA-signalen när den rör sig från avrinningsområdets högsta delar ner mot mynningen i Bottenviken. Inventeringen genomfördes av fyra personer i två team mellan den 15–17 juni 2020. Provtagningspunkterna visas på kartan i Figur 19.



Figur 19. Karta som visar provtagningslokalerna inom Moälvens avrinningsområde. Bakgrunds-karta: Lantmäteriet, CCO. (Viktor Birgersson).

En analys utfördes i syfte att uppnå maximalt antal detekterade arter inom provtagningsområdet genom att välja ut provpunkter med faktorer i beaktande som påverkar arters utbredning i miljön (Spens & Ball 2008, se avsnitt 2.1.1). Totalt sex lokaler valdes ut för att uppfylla något av följande kriterier (Figur 20):

- Älvens nedersta punkt
- Största sjö
- Högt belägen sjö (över högsta kustlinjen)
- Högt beläget vattendrag (över högsta kustlinjen)
- Utsättningsvatten och tillstånd
- Antropogena barriärer
- Utlopp till havet



Figur 20. Diagram som visar provtagningspunkterna inom Moälvens avrinningsområde. Notera att huvudfåran som i verkligheten har riktningen nordväst anges som huvudlinje i diagrammet. Sidolinjerna anger biflöden. De lokaler som ringats in med röda cirklar är de som utvalts för a priori analysen och innehåller flera prover. SP anger sourcepopulations (Spens 2008). (Johan Spens).

8.3 Resultat

Samtliga 26 sötvattensfiskarter inom avrinningsområdet som påträffats historiskt inom avrinningsområdet återfanns vid eDNA-inventeringen 2020. Vidare påträffades marina arter på de marina lokalerna. Notera att kontaminerings DNA togs bort. Proverna nära kontamineringspunkten i Anundsjö visade utslag på torsk, makrill och olika sorters vitfisk som importerats från Norge och kan köpas i matvarubutiker. Lokal 26 visade mycket abborre fast arten inte fiskats där förut. Det kom fram att en utsättning av arten hade skett i sjön.

Fiskarterna som förekom på flest lokaler inom inventeringen var abborre, gädda, mört, lake och öring (se Bilaga 3). Jämförelse av lokalförekomster med sammanställd historiska elfiskedata redovisas i Avsnitt 10.

Ovan nämnda arter förekom i 68–88 % av alla undersökta lokaler, och utgjorde närmare hälften av de detekterade fiskförekomsterna från undersökningen. Harr och lake förekom i färre sekvenser än de andra arterna, men var jämnt fördelade. Detta antyder likartad men låg densitet över avrinningsområdet, i kontrast till exempelvis fjällröding som förekom vid få lokaler men med höga sekvensantal.

Vid optimalt urval krävdes enligt modellen sex provlokaler totalt för att detektera 100 % av den kända fiskfaunan i vattensystemet. Hur mycket av faunan som i vanliga fall detekteras går inte att veta, eftersom Moälven är ett välstuderat vattendrag var detta möjligt.

Spårningen av eDNA-rörelser i vattenätverket i relation till kända förekomster, visade att eDNA i genomsnitt kunde återfinnas ett par hundra meter nedströms om den kända lokalen. Resultaten visade även att då ett biflöde rinner in i ett huvudflöde eller in i en sjö släcks signalen. Utöver detta bör ett fåtal prover fördelas över platser med hög potential att husera mer sällsynta fiskarter, till exempel biflöden som kan vara mycket artrika, speciellt eftersom signalen från biflöde till huvudflöde snabbt släcks ut. Faktorer som kända utplanteringar och lokaler med potentiella postglaciala reliktarter kan ytterligare bidra till kartläggning av diversiteten.

8.4 Slutsatser

En optimering av provlokalernas rumsliga fördelning gav en avsevärd förbättring i andelen detekterade arter per analyserat prov. Resultatet visar att det finns goda möjligheter att sänka kostnad och arbetsinsats vid inventering av fiskfaunan med en väl genomtänkt provtagningsdesign, förutsatt att målet är att uppskatta den totala diversiteten samt skapa en generell överblick av dess fördelning i landskapet.

Nyckellokalerna i Moälvens avrinningsområde var inom, eller låg i anslutning till, de största vattenförekomsterna och var belägna relativt långt ner i vattensystemet. Även om detta är en enskild studie talar välkända faktorer såsom art-area-förhållandet (Preston 1962) och vandringshinders blockering av uppströms migration för att likande förhållanden förekommer i många vattensystem. Inhämtnings av information såsom vandringshinder och den dokumenterade fiskdiversiteten från undersökningsområdet är därmed god vägledare vid en *a priori*-identifiering av nyckellokalerna i ett område.

Kartläggning av eDNA-rörelse i området visade att eDNA-signalen i genomsnitt upphörde cirka en kilometer nedströms om den kända förekomsten. Då habitatet växlade från biflöde till huvudflöde eller till sjö släcktes signalerna ut.

9 Säsongsvariation

9.1 Bakgrund

Förekomst av arter i olika vattenhabitat varierar med säsong till följd av arternas ekologi och reproduktionsbiologi. Traditionella provfisken i Sverige utförs ofta i augusti-september för att data från år till år skall vara jämförbara (Karlsson 2015). Vid eDNA-provtagning bör man ta förökningsbiologi och arternas migration i beaktande, vilket man även gör för traditionella inventeringar. Säsongsberoende migrationsmönster mellan hav och land, eller sjö och anslutande vattendrag påverkar chanserna till detektion.

Reproduktion skall även beaktas vid fältdesign då ägg och spermier kraftigt ökar mängden DNA i vattenmassan, vilket ökar den relativa abundansen (observerat som DNA-sekvenser) av reproducerande arter (Bylemans m.fl. 2018) medan icke-reproducerande arter får avsevärt lägre abundans. Är målet att belysa fiskabundans eller fiskbiomassa är det därmed viktigt att undvika reproduktionsperioder vid provtagning. Vid inventering av mer svårdetekterade arter, såsom flodpärlmussla och kräftor, bör inventering däremot utföras under parningssäsongen för att maximera detektionschansen (Wacker m.fl. 2019).

Studier har visat att flerartsstudier med eDNA är en effektiv metod för att beskriva förändringar i artkomposition över året hos fisksamhällen. Detta är möjligt eftersom förhållande mellan alla detekterade arter undersöks samtidigt (Lawson Handley m.fl. 2019; Di Muri m.fl. 2020; 2022; Brys m.fl. 2021).

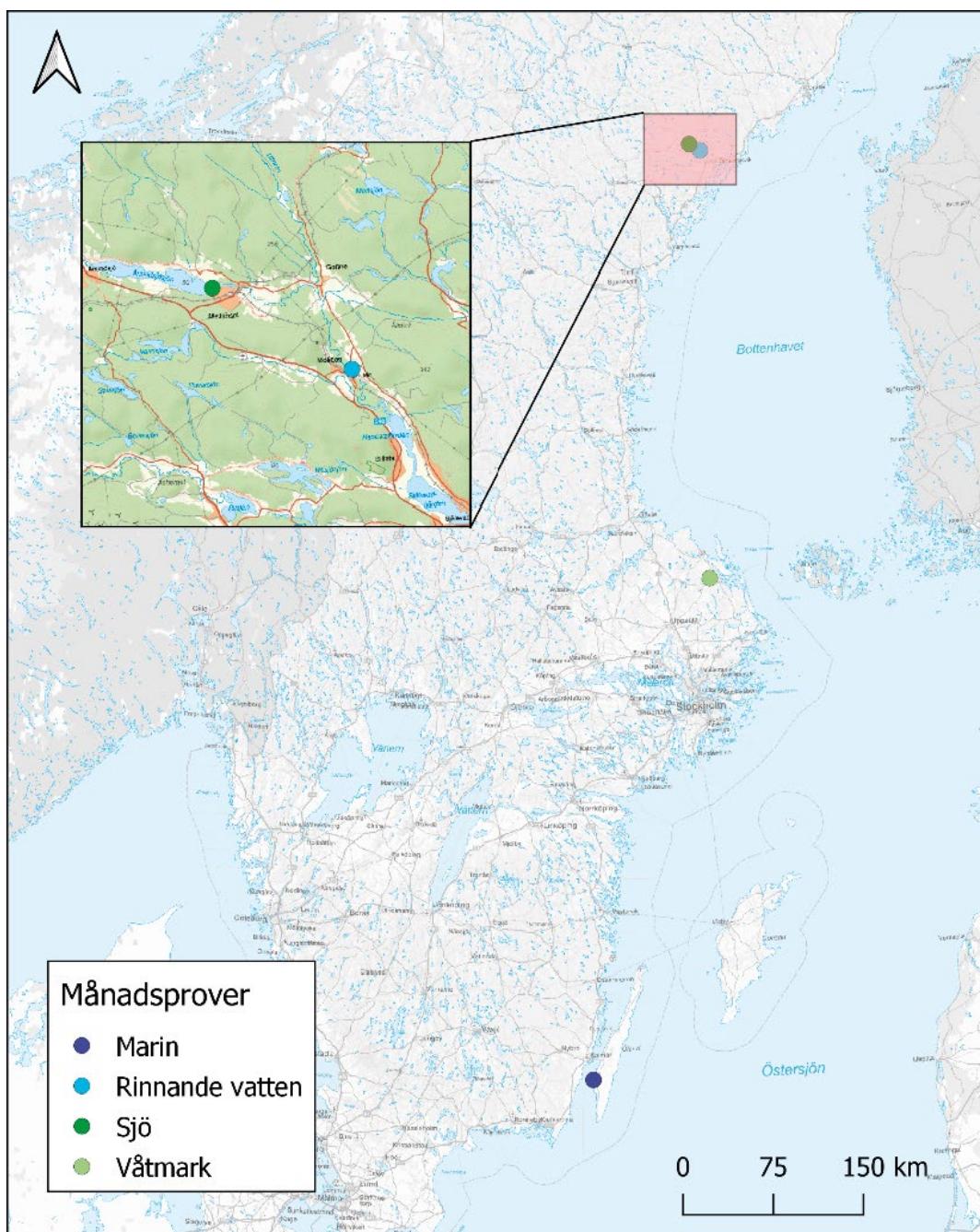
Denna del av projektet undersökte hur olika årstider påverkar eDNA-resultaten, eftersom eDNA registrerar arternas förekomst i nutid. Migration registrerar arter under en kortare tid, medan reproduktion överskattar förekomsten av arter då större ansamlingar av individer samt könsceller i vattnet gör att arter vid vissa tidpunkter är närvarande i större proportioner än utanför reproduktionstiden.

Detta delprojekt undersöker antalet rekommenderade prover som bör samlas in i fält för att detektera vanligt förekommande arter, arter som utgör mer än 5 % av den relativa biomassan arter som utgör mindre än 5 %, samt arter som utgör mindre än 1 %. Vidare syftar detta kapitel till att undersöka vilken den mest optimala tidpunkten för provtagning är för att undersöka närvärav av fisk, samt huruvida flerartsanalyser kan ge information om reproduktions- och migrationsmönster då prov tas varje månad.

9.2 Metoder

9.2.1 Fältarbete och laboratorieanalyser

Fyra habitat inkluderades i undersökningen – sjö (utloppet av Anundsjön), rinnande vatten (Moliden i Moälven), marin miljö (Mörbylånga på Öland) och en våtmark (Harg i Uppsala län) (Figur 21).



Figur 21. Karta som visar de fyra provtagningslokalerna för månadsproverna. Bakgrundskarta: Lantmäteriet, CC0. (Viktor Birgersson).

För varje habitat togs fyra separata vattenprover och en negativ filterkontroll med en månads mellanrum. Vatten från sjön och älven samlades in på månadsbasis från juni 2020 till maj 2021, medan vatten från våtmarken och den marina lokalen samlades in från december 2020 till november 2021. Vattentemperaturen mättes under varje provtagningstillfälle. Tre av vattenproverna samlades in genom att ta minst fem underprover som sammanslogs till ett samlingsprov på fem liter vatten som sedan filtrerades tills filtren täpptes till. Det fjärde provet samlades in utan underprov. Alla prov analyserades för fisk, i våtmarken undersöktes även förekomst av groddjur

och i det rinnande vattnet förekomst av stormusslor. Eftersom analyserna av de två sistnämnda artgrupperna inte gjordes för alla prover ströks de från denna analys. I Anundsjön togs proverna 11 gånger, Moliden i Moälven 12 gånger, Mörbylångas marina prov på Öland tio gånger och våtmarken åtta gånger. Detaljerad insamlings-teknik och laboratorieanalyser anges i Bilaga 1.

9.2.2 Dataanalys

Då data samlades in över flera månader och under fyra säsonger var det möjligt att registrera plötsliga ökningar i biomassa och kontrollera om dessa tidpunkter sammanfaller med reproduktionstid som styrs av vattentemperatur. Eftersom tre likvärdiga separata prover samlades in vid varje provtagningstillfälle analyserades antal replikat som krävs i de olika habitaten för att detektera så många arter som möjligt. Antalet läsningar per prov anger den relativa biomassan, vilket innebär att ju fler gånger en arts DNA blir läst under sekvenseringen, desto större antal läsningar uppvisar arten. Då antalet läsningar jämförs mellan olika prover anges den relativa biomassan per art som procent per prov.

Data delades in i arter som förekommer mer än 5 % av den relativa biomassan i provet, arter som förekommer 1–5 % och arter som förkommer mindre än 1 %.

9.3 Resultat

Proverna i Moälven (rinnande vatten) registrerade 18 fiskarter och 3 655 592 fisksekvenser. Medelantal läsningar per prov var 84 000. I Anundsjön registrerades 19 fiskarter och 2 966 625 fisksekvenser med ett medeltal på 70 633 sekvenser per prov. På den marina lokalen på Öland registrerades 19 fiskarter och 2 966 625 fisksekvenser med ett medeltal på 70 633 sekvenser per prov. Dammen i Harg visade sammanlagt 11 fiskarter och totalt 833 070 fisksekvenser med ett medeltal på 36 220 sekvenser per prov.

9.3.1 Artdetektion i förhållande till antal replikat

Tabell 4 visar antalet prover som behöver samlas in för att detektera arter vars relativa biomassa utgör mer än 5 %, 1–5 % och 0,1–0,5 % på en lokal. För varje habitat jämfördes tre prover per provtagning.

Sannolikheten att detektera arter som utgör mindre än 1 % av den relativa biomassan var 46–54 % när endast ett filter användes. Vid användning av två filter ökade dock sannolikheten markant till 73–80 % vid tre filter var motsvarande intervall 89–90 %. Vid inventering av mer vanligt förekommande fiskarter (mer än 1 % av den relativa biomassan) var sannolikheten för detektion vid användning av ett filter betydligt högre (90–94 %). Vid användning av två filter är sannolikheten 95–100 %. Kapitel 5 i denna rapport visar att då dominansen av en art i läsningar understiger en median på 0,28 % och medeltal på 0,5 % minskar detektionsgraden.

Tabell 4. Antal prover som behöver samlas in för att detektera fiskarter som har andelen av biomassan > 5 %, 1–5 % och 0,5–1 %. Sannolikheterna för att detektera arterna anges i %. n anger antal artförekomster över 12 månader som registrerats. (Johan Spens).

A. Sjö ANUNDSJÖ

Andel fiskmängd	(n)	% 3 filter	% 2 filter	% 1 filter
> 5 %	162	100	99	98
1–5 %	149	98	95	90
0,5–1 %	46	90	73	46

B. Älv MOÄLVE (Moliden)

Andel fiskmängd	(n)	% 3 filter	% 2 filter	% 1 filter
> 5 %	318	100	100	94
1–5 %	169	99	99	94
0,4–1 %	50	89	80	54

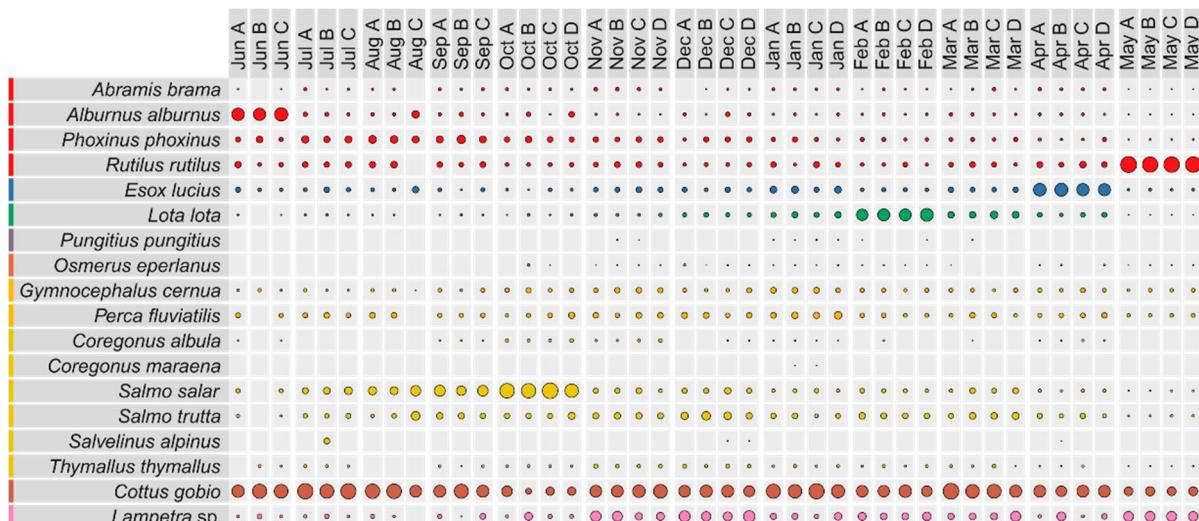
C. Marin ÖLAND (Västra)

Andel fiskmängd	(n)	% 3 filter	% 2 filter	% 1 filter
0,1–73 %	203	94	91	81

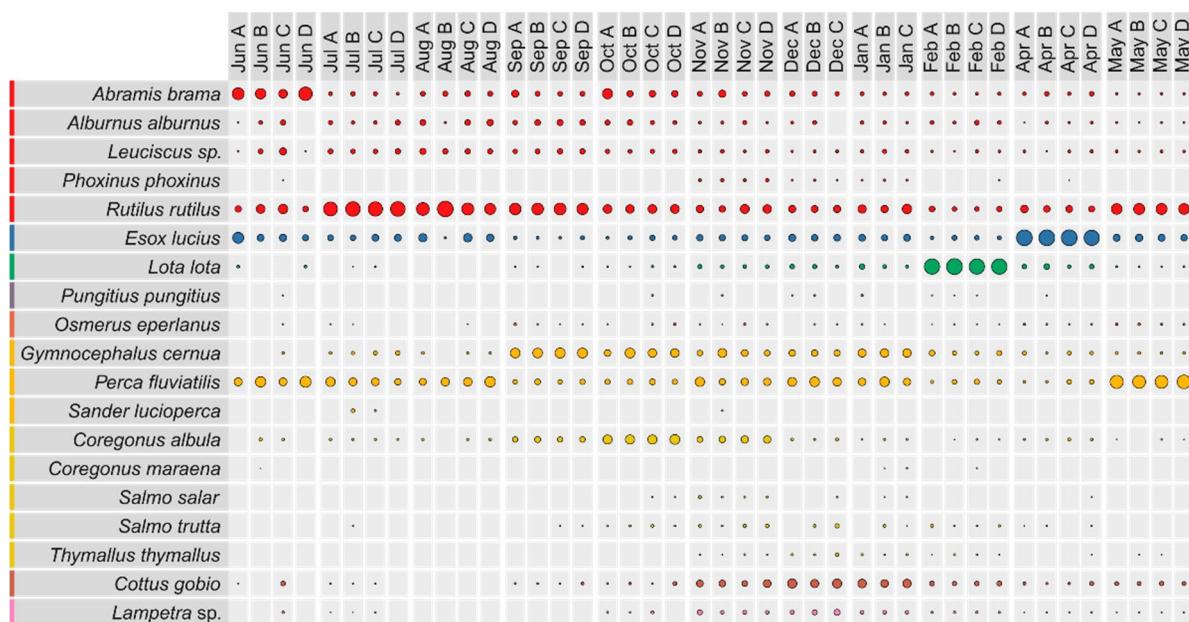
9.3.2 Förändringar i relativ fiskbiomassa över tid indikerar reproduktionsmönster

9.3.2.1 SJÖ OCH RINNANDE VATTEN

Beständen av fisk i Anundsjös utlopp och i lokalen för rinnande vatten i Moälvens avrinningsområde uppväxer mestadels fasta bestånd av fisk, med undantag av örning, lax och nejonöga som migrerar från havet till sina förökningsfloder under vissa tider på året. De fasta fiskbestånden visade jämn fördelning av den artspecifika relativta biomassan över året förutom under förökningsmånader då andelen av de reproducerande arterna ökade kraftigt (Figur 22–23).



Figur 22. Månadsprover över arternas förekomst i Moälven (Moldiden). Varje kolumn motsvarar ett analyserat prov och visar den relativta biomassan (hur många procent en art är läst av totalt 100 %). (Cuong Tang).



Figur 23. Månadsprover över arternas förekomst i Anundsjön (i Moälvens avrinningsområde). Varje kolumn motsvarar ett analyserat prov och visar den relativa biomassan (hur många procent en art är läst av totalt 100 %). (Cuong Tang).

Fluktuationer i arternas relativa biomassa över året med en plötslig höjning under vissa tider sammanföll med de specifika arternas reproduktionstid och de vatten-temperaturer som är arttypiska för reproduktion. Hos de fiskarter som förekommer i små mängder ökar andelen läsningar under förökningsperioden, men deras relativa biomassa maskeras av andra arter som förökar sig samtidigt. För att åtgärda detta gjordes en omräkning av data så att en art i taget analyserades. De övriga arterna inkluderades i förekomst utanför sin förökningsperiod och medeltalet av deras relativa biomassa för 11/12 månader infördes i analysen. De omräknade värdena gjorde att förökningsperioden av bland annat gös (som visar en mycket låg relativ biomassa) kunde identifieras. De förhödda biomassorna av olika arter sammanföll med reproductionstemperatur och tid på året. Tabell 5 visar relativ biomassa under 10–11/12 månader för alla arter samt relativa biomassan under reproduktionsmånaden.

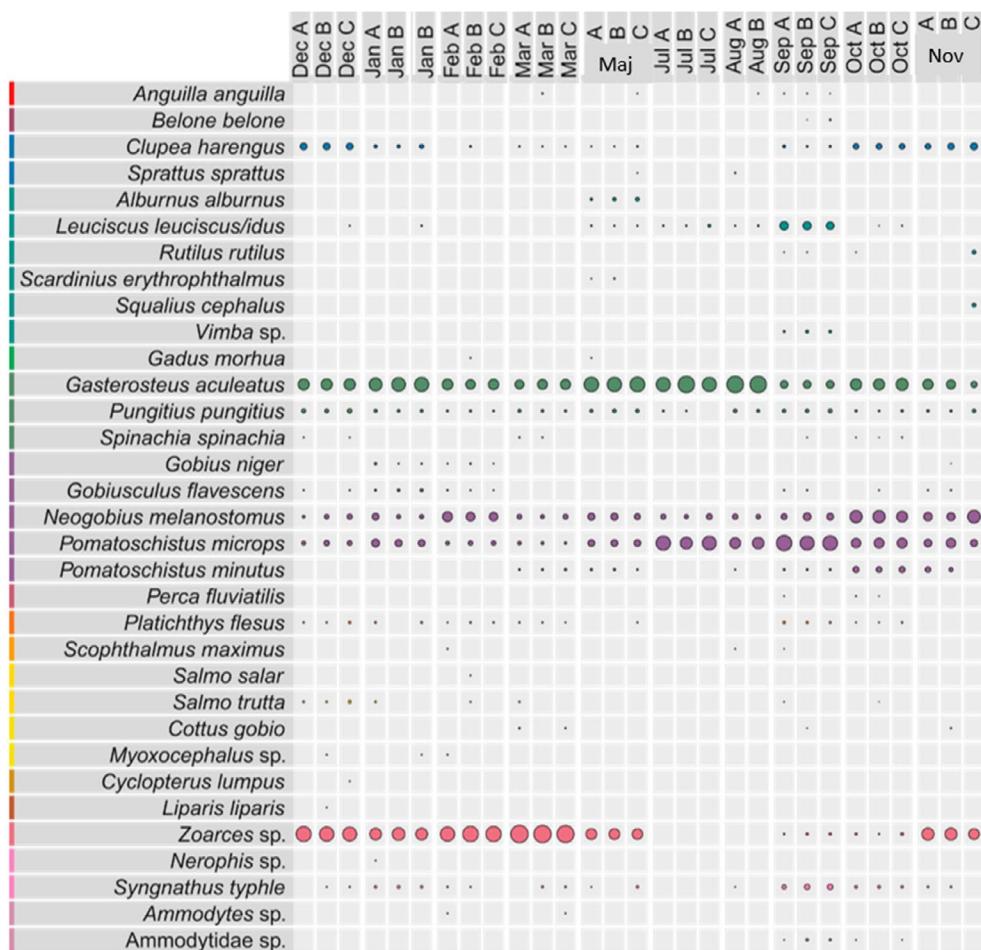
Detta visar att en fördjupad analys av eDNA-data kombinerat med ekologisk kunskap och längre tidsserier för provtagning kan ge viktig information om arters förökning och närvaro i miljön.

Tabell 5. Arternas relativa biomassa under 11/12 månader (utanför förökningsperioden) och den relativa biomassan under månaden då arten reproducerar /1/12) månader. De uppmätta temperaturerna korrelerar med arternas reproductionstemperatur. LS (lake Spawning) anger arter som enbart reproducerar i sjöar, RS (River Spawning) anger arter som enbart förökar sig i rinnande vatten. (Johan Spens).

ÄLV (MOLIDEN MOÄLVEN)					SJÖ (ANUNDSJÖ)		
Art	Förökning månad	T°C i älvdal	eDNA % 11/12 månader	Reproduktion eDNA % 1/12 månader	T°C i sjö	eDNA 10 månader	Reproduktion eDNA% 1/12 månader
Lake	FEB	0	5	44	0	4	66
Gädda	APR	4	9	50	2	14	69
Abborre	MAJ	8	9	26	9	16	59
Gärs	MAJ	8	6	22	9	12	NA
Mört	MAJ	8	11	63	9	31	55
Nejonöga	MAJ	8	16	62	9	3	RS
Nors	MAJ	8	0,5	2	9	0,6	3
Stäm/Id	MAJ	8	2	11	9	4	RS
Braxen	JUN	18	2	LS	21	8	30
Elritsa	JUN	18	11	32	21	1	RS
Harr	JUN	18	2,5	6	21	NA	RS
Löja	JUN	18	4	59	21	5	NA
Gös	JUL		NA	NA	16	0,4	2
Lax	OKT	5	8	55	5	1	RS
Öring	OKT	5	14	15	5	2	RS
Siklöja	OKT	5	1	4	5	3	22
Bäckröding	NOV	1	0,4	5	NA	NA	RS

9.3.2.2 MARIN MILJÖ MÅNADSPROV

eDNA-flerartsanalyserna på Öland detekterade 39 fiskarter. Artförekomsten vid varje enskilt provtagningstillfälle visade att artsammansättningen i alla tre prov var mycket likartade och närvaro av arterna kunde konstateras. Arter som lever i grunt vatten detekterades vid alla provtagningar, och svartmunnad smörbult var närvanande vid alla årstider. En del av arterna visade toppar i relativa biomassa som kan indikera förökning (Figur 24).



Figur 24. Månadsprover över arternas förekomst i marin miljö (Öland, Mörbylånga). Varje kolumn motsvarar ett analyserat prov visar den relativ biomassan (hur många procent en art är läst av totalt 100 %). (Cuong Tang).

9.3.3 Våtmark månadsprov

Våtmarken i Harg var en anlagd våtmark där markägaren höjde och sänkte vatten-nivån. Provpunkten flyttades därför under vissa månader. Då våtmarker är små och homogena brukar ett till två prover, tagna med underprover runt hela dammen fånga upp artdiversiteten. Eftersom våtmarken i denna studie var grund till följd av tidvis konstgjord dränering och översvämning representerar data inte månadsvariationer och resultaten togs bort från analysen.

9.4 Slutsatser

En av frågorna som uppkommer vid planering av eDNA-provtagning är hur många separata prover som bör tas på en lokal för att detektera maximalt antal arter. Då proverna samlas in som flera underprov som sammanslås i ett samlingsprov ökar sannolikheten att detektera närvaro av arter. Baserat på resultaten i denna undersökning bör minst två prover per provtagningslokal tas för att maximera sannolikheten till detektion av mer ovanliga arter. Är syftet ändå att endast erhålla en bild av de mest vanligt förekommande arterna kan ett prov vara tillräckligt.

En viktig aspekt för miljöövervakningen är att fastställa tidpunkten för reproduktion hos olika arter för optimalt bevarande och nyttjande. Traditionella metoder som undersöker reproduktionsaktivitet kan vara både destruktiva och är ofta ospecifika. Detta är speciellt problematiskt då hotade arter skall undersökas.

Denna undersökning visar att regelbunden månadsprovtagning av vattenprover för flerartsanalyser ger information både om artförekomster och om tidpunkten för arternas reproduktionstid. Undersökningen visade att denna sorts analyser kan identifiera på vilka lokaler och tidpunkter arter reproducerar sig.

Flera studier har visat att månatliga eDNA-prov över året ger information om arternas reproduktionstid, eftersom den relativa biomassan hos arter som förökar sig stiger de månader då reproduktion pågår (Bista m.fl. 2017; Beentjes m.fl. 2019; Tsuji & Shibata 2021; Di Muri m.fl. 2022; Wu m.fl. 2022). Vidare kan förändringar i artkomposition och dominans i miljöer med fasta bestånd visa att indikatorarter ökar eller minskar som en funktion av övergödning och andra förändringar i miljö (Hellström & Spens 2021). Enartsanalyser har använts för månatliga prover för att detektera förekomst av gädda (Karlsson m.fl. 2022).

Vattenprover som samlas in på månadsbasis från samma inventeringslokal och genererar förekomst och information av gametfri relativ biomassa hos fisk kan utgöra ett kraftfullt verktyg för miljöövervakningen. Genom regelbundna vattenanalyser fås information om arternas närvaro, dominans, förökningsmönster, och indikatorer för förändringar i miljön.

10 Jämförelse i artdetektion mellan eDNA och provfiske

10.1 Bakgrund

eDNA har visat sig vara en effektiv metod då det gäller att inventera stora mängder arter på kort tid, vilket ofta kan ge en mer precis bild av artsammansättningen på en lokal jämfört med andra metoder. Vidare är inventering av ett stort antal lokaler och på en stor geografisk skala möjlig, eftersom provtagningen i fält kräver mindre tid än traditionella metoder. En organism behöver inte fastna i ett nät eller upptäckas av en kamera för att detekteras. eDNA som verktyg inom miljöövervakningen har en stor potential att effektivisera inventering och övervakning av arter. Ett stort antal undersökningar som jämför detektionsgrad av fiskförekomster med eDNA analyser och traditionella fiskemetoder i sötvatten har genomförts. Liknande jämförelser i marina miljöer är färre.

En metastudie som jämförde observerad artdiversitet baserat på provfisken (nät/elfiske, fällor) och eDNA-flerartsanalyser visade att eDNA detekterar flera arter än traditionella metoder (Keck m.fl. 2022). Vidare konstaterades att få jämförande studier finns för marina miljöer (Andruszkiewicz m.fl. 2017).

Vi utförde en direkt jämförelse mellan översiktsnät och eDNA i marin miljö (Blekinge Skärgård) i augusti 2019 (Näslund m.fl. 2019) (se avsnitt 10.2; 10.3; 10.4).

Vidare gjordes en jämförelse mellan artdiversitet av fisk från tillgängliga historiska elfisken i sötvatten och eDNA i Moälvens avrinningsområde (se avsnitt 10.5; 10.6; 10.7). eDNA i den senare studien är baserat på prover som samlades in inom detta projekt för den spatiala provtagningsanalysen.

Delprojektet syftar till att undersöka skillnader i artdetektion mellan eDNA och traditionella inventeringsmetoder.

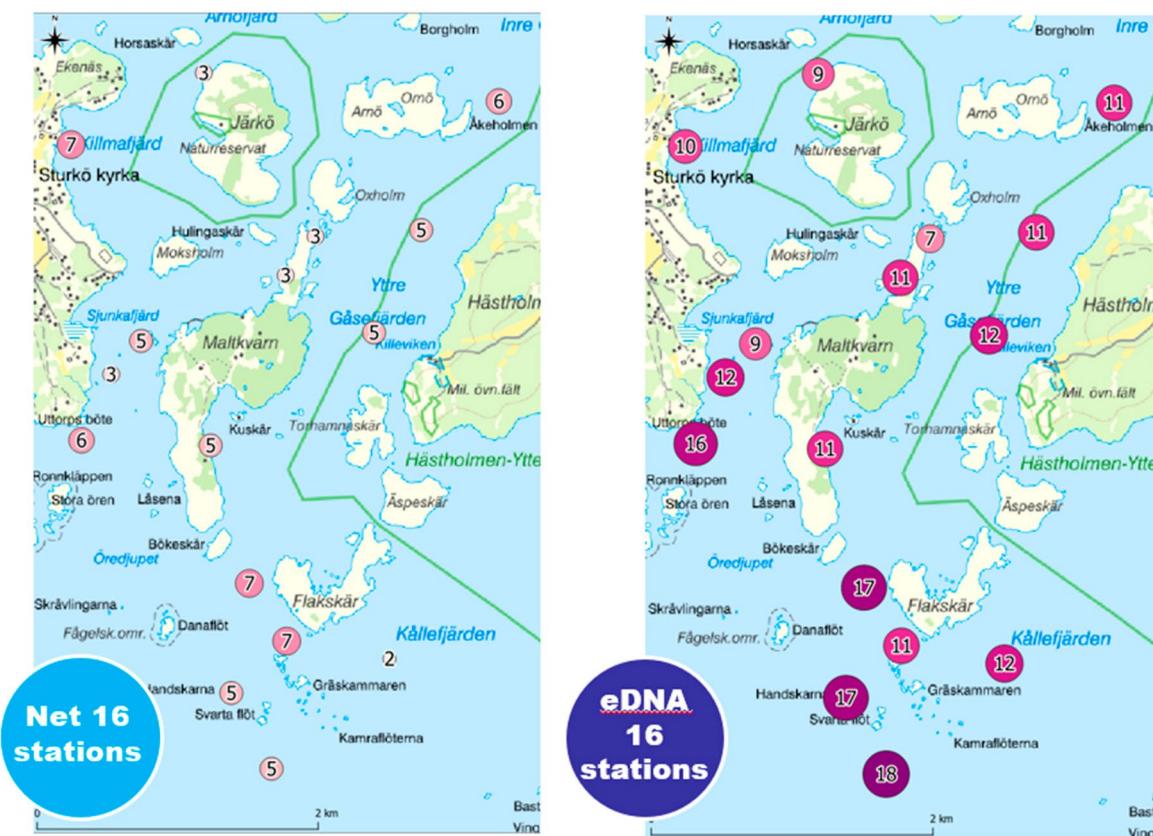
10.2 Metoder – jämförelse mellan nätfiske och eDNA i marin miljö

I denna jämförande undersökning utfördes provtagning av eDNA på 16 stationer i Blekinge skärgård. I samband med provtagningen utfördes även provfiske med nordiska kustöversiktsnät där tre nät lades per lokal (Ljunghaar & Karlsson 2015; 2020; Karlsson 2015). Vattenproverna samlades in precis innan det korresponderande nätet lades ut. Fältarbetet genomfördes 12–15 augusti 2019. Fältinsamling och laboratorieanalyser beskrivs i Bilaga 1.

10.3 Resultat – jämförelse mellan nätfiske och eDNA i marin miljö

Överensstämmelsen var generellt god mellan de fiskar som fångades i provfisket och de som detekterades med eDNA på respektive station, i synnerhet de arter som vanligtvis fångas i nät som mört, abborre och sill. Flera arter som detekterades med eDNA fångas inte i provfisket av olika anledningar. Till exempel tenderar små arter som sandstubb, storspigg och småspigg bli underrepresenterade då de inte fastnar lätt i nät. Dessa arter kan vara väldigt viktiga ur ett ekosystemperspektiv och mycket svensk forskning har utförts på senare tid kring spiggens roll i Östersjöns ekosystem. Vidare undviker gäddor nät, och under nätläggningen observerades gäddor i vattnet som undvek näten. Antalet arter som detekterades med de olika inventeringsmetoderna skiljde sig kraftigt åt (Tabell 6), med i medeltal 12 arter per station för eDNA och sex arter per station för nätfiske. Att andelen marina arter var högre för eDNA beror allt på att spigg inte fångades med nät.

Det totala antalet detekterade förekomster av respektive art vid stationerna som undersökts med båda metoderna visas i Figur 25.

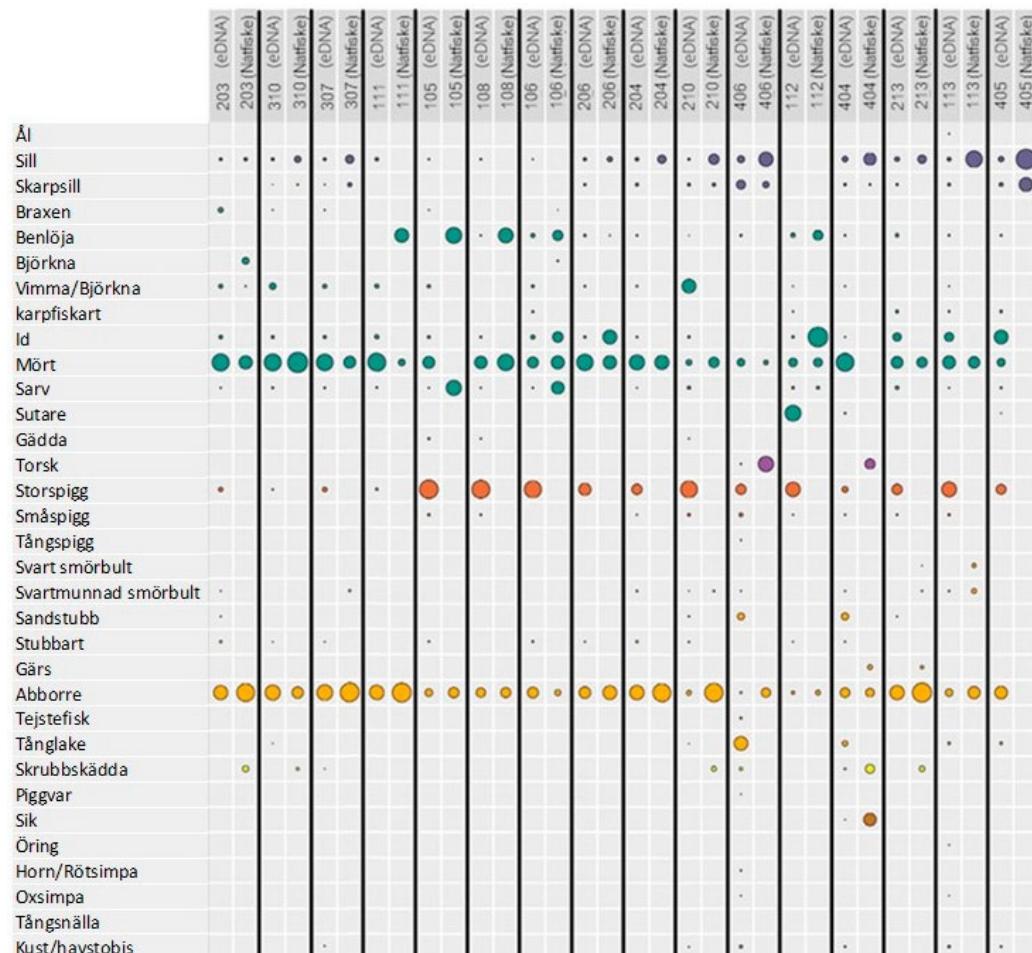


Figur 25. Kartor över inventeringsområdet som visar antal fiskarter detekterade per station med 16 provfiskestationer (vänster) och 16 eDNA-stationer (höger), där storleken och toningen på cirklarna är skalad efter antalet arter. Bakgrundskarta från Lantmäteriet, CC0. (Johan Näslund).

Tabell 6. Statistik för provfiskade nät beräknat på relativa fångster i vikt eller antal läsningar per station. För värden beräknade på den totala fångsten/läsningar för hela området sammantaget. Nätfiskestationer där kvoter inte kunde beräknats har exkluderats. ± avser 95 % konfidensintervall. (Johan Näslund).

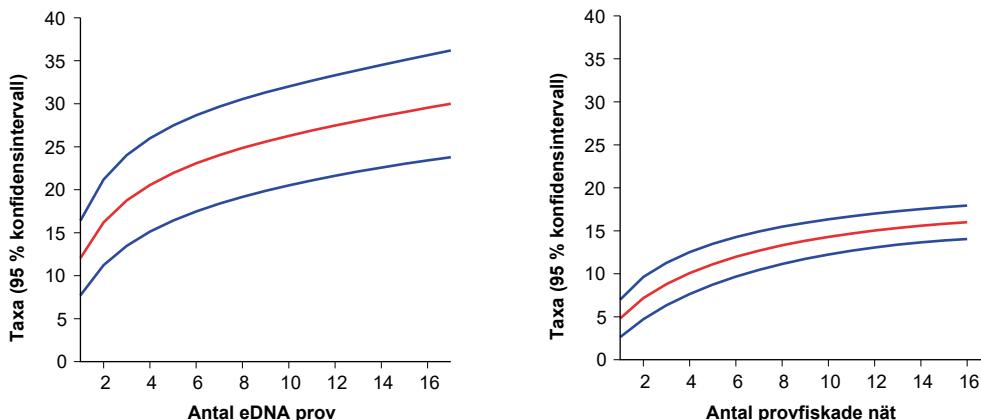
	eDNA, 16 stationer	Fiske, 16 stationer
Medelantal arter detekterade per station	12,1 ± 1,5	5,8 ± 0,8
Totalt antal detekterade arter	24	16
Maximalt antal detekterade arter per station	18	8
Minimialt detekterade arter per station	7	3
Medel av Shannon index per station	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Medel av Abborre/karp-kvot per station	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,6
Medel av Andel rovfisk per station	22 ± 6 %	35 ± 11 %
Medel av Andel marina arter per station	34 ± 11 %	24 ± 15 %

Mörт, abborre och sill detekterades vid majoriteten av stationerna med både eDNA och provfiske (Figur 26).



Figur 26. Fiskarnas relativa förekomst över de 16 gemensamma lokalerna med eDNA respektive nätfiske. Storleken på cirklarna relaterar till andelen läsningar/relativ biomassa och olika fiskfamiljer är markerade med olika färger. *För mörт har eDNA-resultaten en lägre tillförlitlighet för tio av stationerna pga. möjlig influens från provkontaminering. (Cuong Tang).

Artackumulationskurvor som visar det förväntade antalet taxa som kan identifieras med ett specifikt antal prov visas i Figur 27 och visar att antalet förväntade arter börjat plana ut för nätfiske redan vid 16 nät till skillnad från analys av eDNA.



Figur 27. Artackumulationskurvor som visar det förväntade antalet taxa som kan detekteras vid ett specifikt antal prov (röd linje) med 95 %-konfidensintervall (blå linje) för eDNA-prover respektive nätfiske. (Johan Näslund).

10.4 Slutsatser – jämförelse mellan nätfiske och eDNA i marin miljö

Sambandet mellan biomassa av fisk och antalet läsningar från eDNA-prover finns bland annat beskrivet i Hänfling m.fl. (2016), Bruce m.fl. 2021, Di Muri m.fl. (2022). Osäkerheterna är fortfarande stora, precis som för nätfiske, och det är svårt att dra tydliga slutsatser med det kunskapsläge vi har idag. I denna undersökning stämmer den relativa biomassan av fångad mört och abborre relativt väl med andelen läsningar för dessa arter vid de undersökta stationerna. Ytterligare en fråga som kvarstår för båda metoderna är vilken yta som provtagningen faktiskt representerar då den påverkas kraftigt av flera omvärldsfaktorer som vattentemperatur, strömmar och vindar, samt aktivitetsgraden av individuella fiskar. I havet förekommer sannolikt fisklek och resulterande mjölke i vattenmassan under varje månad under hela året, vilket gör att alla fiskarters eDNA (utom den lekande arten) underskattas betydligt. Det är därför betydligt svårare att göra beräkningar av den relativa biomassan av fisk i havet i jämförelse med sjöar, rinnande vatten och dammar.

Gärs och svart smörbult detekterades inte med eDNA men ett fåtal individer fångades med nätfiske (22 respektive fem individer av totalt 3 366 fiskar). En möjlig orsak till att dessa två arter inte detekterades med eDNA kan vara att dessa individer har förekommit på platsen efter det att eDNA-prov har samlats in. Det skulle ha varit intressant att samla in eDNA-prov även direkt innan nätfiske, men eftersom fiskarna släpper stora mängder DNA genom att fastna i näten skulle data vara starkt påverkat av den faktiska fångsten (bias/metodfel). Antalet individer av gärs samt svart smörbult var lågt och då arterna är relativt små blir även den förväntade eDNA-signalen av dessa arter liten. Om man extrapololerar lutningen i artackumulationskurvan för eDNA-proverna så är det uppenbart att fler tagna eDNA-prov med stor sannolikhet skulle ha detekterat ytterligare arter. Det är svårt att utifrån befintliga

data bedöma när en platå skulle nås där väldigt få ytterligare arter detekteras men tio prov till bör ha resulterat i detektion av ytterligare cirka 5–10 arter och det är väldigt troligt att både gärs samt svart smörbult då skulle detekteras.

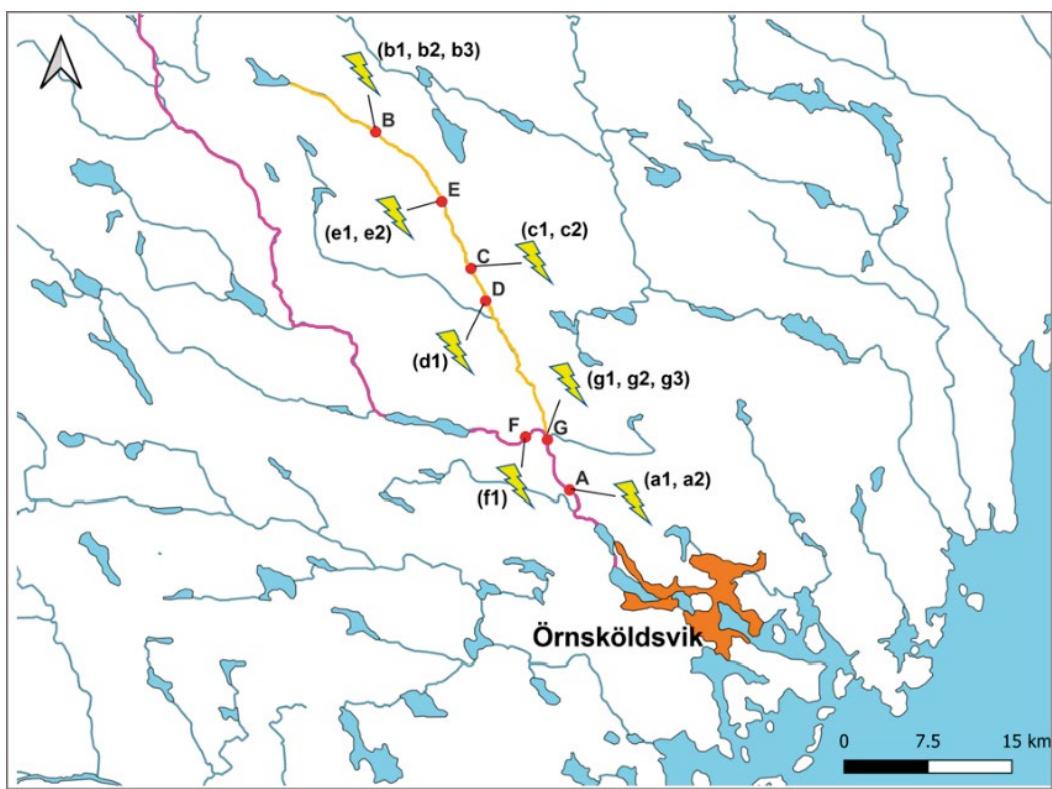
Nätprovfiske och eDNA kompletterar varandra som metoder eftersom de bidrar med olika typer av information och detaljgrad. Kostnader för nätfisket i denna undersökning utgjorde cirka 2/3 av de totala kostnaderna och eDNA den resterande 1/3. eDNA som metod är alltså att föredra ur kostnadssynpunkt då den detekterar fler arter till en lägre kostnad. Nätprovfiske kan ärenemot bidra med information om abundans, biomassa, könsmognad samt information om storleksfördelning och tillväxt.

Antalet fiskar som fångats i svenska provfisken var totalt 6 411 934 individer under 2016 enligt Jordbruksverket (Ljung & Bornestaf 2016), vilket innebär att ett betydande antal fiskar avlivas med främsta syfte att samla in information om biologisk mångfald. Dessutom förekommer ibland bifångster i form av sjöfåglar och däggdjur. Här har eDNA en stor fördel ur ett bevarandeetiskt perspektiv (vi behöver inte skada eller störa den biologiska mångfald vi vill skydda). Inom denna undersökning fångades totalt 3 366 fiskar och inga bifångster av sjöfåglar eller däggdjur förekom.

10.5 Metoder – jämförelse mellan elfiske och eDNA

I denna studie jämfördes tillgänglig fångstdata från elfiskelokaler med eDNA-resultat i Moälven och Utterån. I studien inkluderades samtliga eDNA-lokal (inom delprojekt 8, rumsliga insamlingsstrategier) som var positionerade inom 0 till 1,5 km från befintliga elfiskelokaler (Figur 28).

Sammanlagt 14 eDNA-prover tagna under 2020 jämfördes med 207 korresponderande elfisken från 69 tillfällen. Antalet arter per ansträngning och totalt antal arter per lokal för båda metoderna jämfördes. Även totalt antalet detektioner jämfördes. Notera att eDNA enbart togs totalt en gång under en dag medan elfisket genomförts under 20 år. Vidare jämfördes det totala antalet arter som detekterades med båda metoderna.



Figur 28. Karta över provtagningslokalerna för jämförelse med historiska elfisken. (ljusröd markering, Moälven, gul markering Utteråns). Bakgrundskarta: Lantmäteriet, CCO. (Viktor Birgersson).

10.6 Resultat – jämförelse mellan elfiske och eDNA

Resultatet visade att eDNA detekterade 1,12 till 4,7 gånger fler arter än summan av allt officiellt historiskt provfiske som införts i fiskdatabasen SERS sedan 1992 (Tabell 7).

Tabell 7. Statistik för elfisken beräknat antal arter som detekterats med eDNA (blå rader) och elfisken (gula rader). Kvoterna avser jämförelse av antal arter per ansträngning och per lokal. ± avser 95 % konfidensintervall. (Micaela Hellström).

Lokalnamn	Lokal	# arter totalt	# anstr totalt	medel# arter/år	max# arter	min# arter	# arter el:eDNA /anst	# arter el:eDNA totalt
Moliden	A	14	2	14.0	14	14	1:3,9	1:1,6
	A	9	39	3,6 ± 1,5	7	2		
Almåttseberget	B	9	2	8.0	8	8	1:2,3	1:1,5
	B	6	42	3,4 ± 1,6	3	4		
Nedan Uttersjön	C	14	2	13.0	13	13	1:4,2	1:1,75
	C	8	27	3,1 ± 0,6	2	4		
Hagforsen	D	14	2	14.0	14	14	1:4,7	1:4,7
	D	3	3	3.0	3	3		
Grusgropen	E	15	2	15.0	15	15	1:3,1	1:1,9
	E	8	24	4,9 ± 0,8	3	6		
Nedan Gottned	F	13	2	12.5 ± 9,7	12	13	1:2,8	1:1,9
	F	7	15	4,4 ± 1,1	3	6		
Norsjöänget	G	9	2	9.0	9	9	1:2,1	1:1,12
	G	8	57	4,3 ± 1,2	2	6		

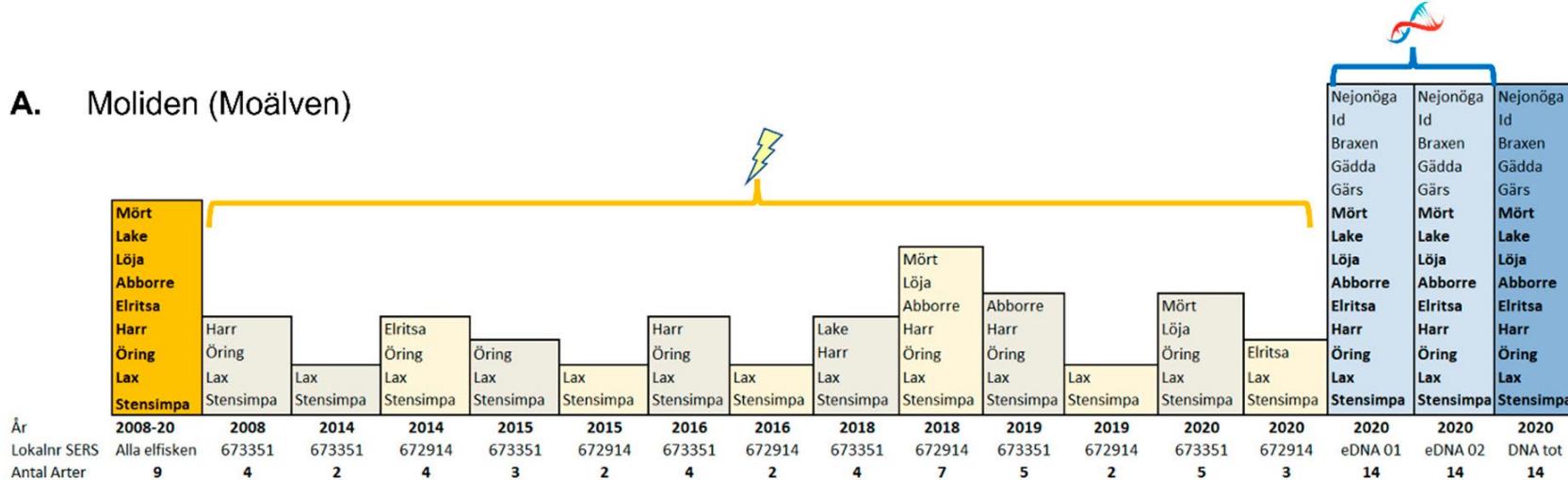
Totalt registrerades 15 fiskarter och 68 artdetektioner med eDNA och 10 arter och 38 artdetektioner med historiska elfisken (Tabell 8).

Tabell 8. Fiskarnas utbredning över lokalerna (av totalt 7) där de enskilda fiskarterna påträffades genom eDNA och historiska elfisken. (Micaela Hellström).

Art	eDNA	elfiske
Abborre	5	2
Amerikansk Bäckröding	1	
Braxen	3	
Elritsa	6	6
Gädda	6	4
Gärs	4	
Harr	4	5
Id/Stäm	4	
Lake	6	3
Lax	6	6
Löja	6	2
Mört	5	1
Nejonöga	6	3
Siklöja	2	
Stensimpa	5	6
Antal detekterade arter	15 arter	10 arter
Antal artobservationer	69	38

Stapeldiagrammen i Figur 29–33 visar fångstdata per år, baserat på tre elfisken per elfiskelokal, och jämförs med två eDNA-prover tagna på respektive lokal 2020. Bilden illustrerar stora skillnader i artdetektion mellan eDNA och elfiske och förstärker resultat från tidigare studier att eDNA är att föredra då biologisk mångfald skall undersökas. Vidare visar resultaten av upprepade provtagning varje månad på samma lokal att reproduktion och förändringarna i fisksamhällets komposition kan detekteras med eDNA flerartsanalyser.

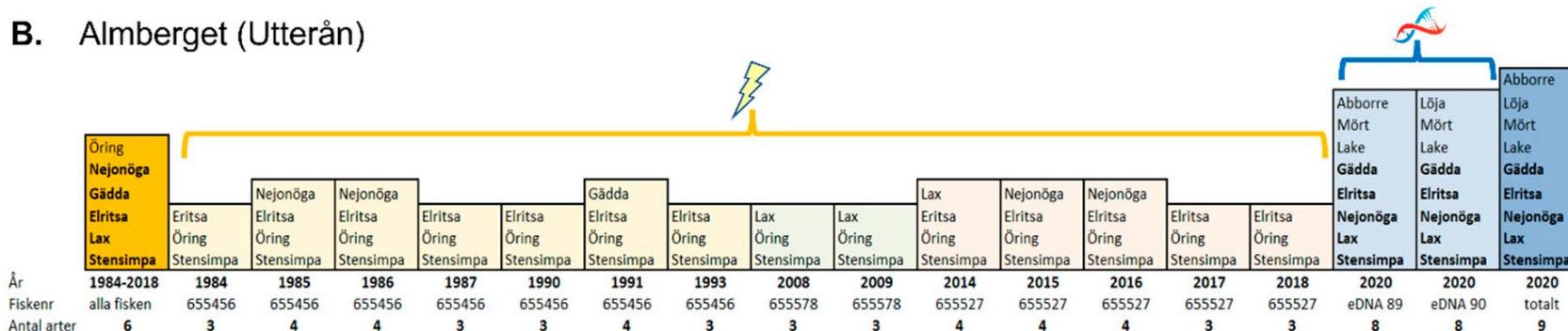
A. Moliden (Moälven)



Figur 29. Stapeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst i Moliden mellan enskilda historiska elfisken (staplar i ljusgula nyanser) sammanlagd artförekomst av alla elfisken (brandgula staplar) och artdetektion genom eDNA-analys (två prov per lokal, ljusblå staplar) samt sammanlagda detektioner av arter med eDNA (mörkblå staplar). Provfishenummer från SERS databas, elfiskeår, och antal detekterade arter anges. Artnamn i fetstil indikerar detektion med båda metoderna. (Micaela Hellström & Patrick Hernvall).

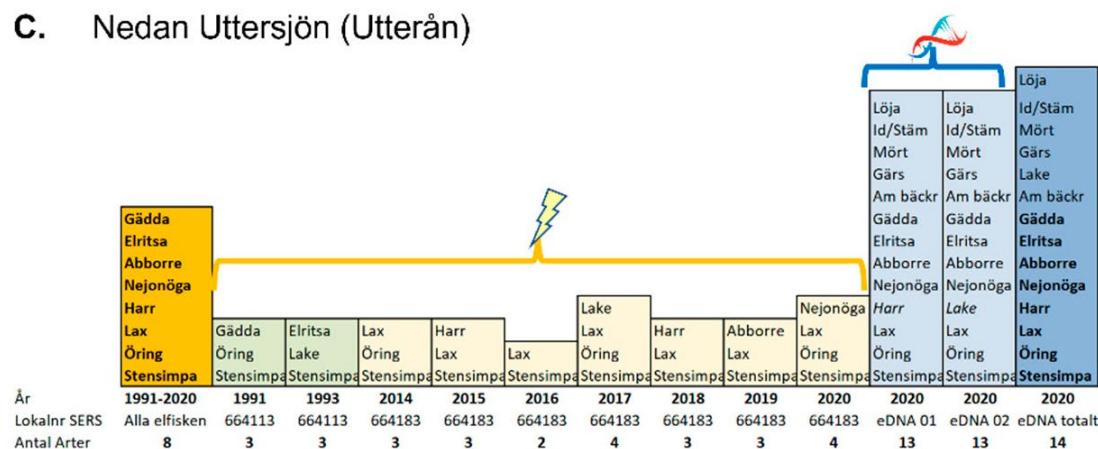
56

B. Almberget (Utterån)



Figur 30. Stapeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst i Almberget mellan enskilda historiska elfisken (staplar i ljusgula nyanser) sammanlagd artförekomst av alla elfisken (brandgula staplar) och artdetektion genom eDNA-analys (två prov per lokal, ljusblå staplar) samt sammanlagda detektioner av arter med eDNA (mörkblå staplar). Provfishenummer från SERS databas, elfiskeår, och antal detekterade arter anges. Artnamn i fetstil indikerar detektion med båda metoderna. (Micaela Hellström & Patrick Hernvall).

C. Nedan Uttersjön (Utterån)



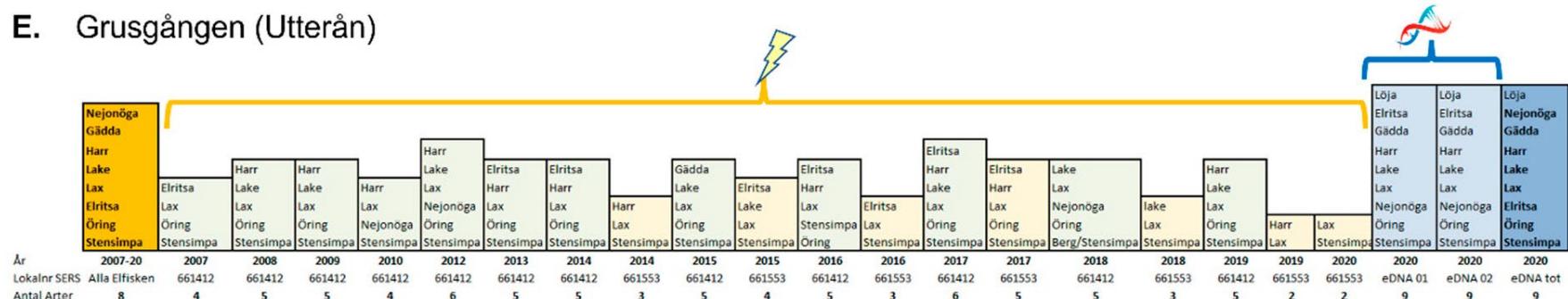
D. Hagforsen (Utterån)



Figur 31. Stapeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst i c) Nedan Uttersjön och d) Hagforsen, mellan enskilda historiska elfisken (staplar i ljusgula nyanser) sammanlagd artförekomst av alla elfisken (brandgula staplar) och artdetektion genom eDNA-analys (två prov per lokal, ljusblå staplar) samt sammanlagda detektioner av arter med eDNA (mörkblå staplar). Provfishenummer från SERS databas, elfiskeår, och antal detekterade arter anges. Artnamn i fetstil indikerar detektion med båda metoderna. (Micaela Hellström & Patrick Hernvall).

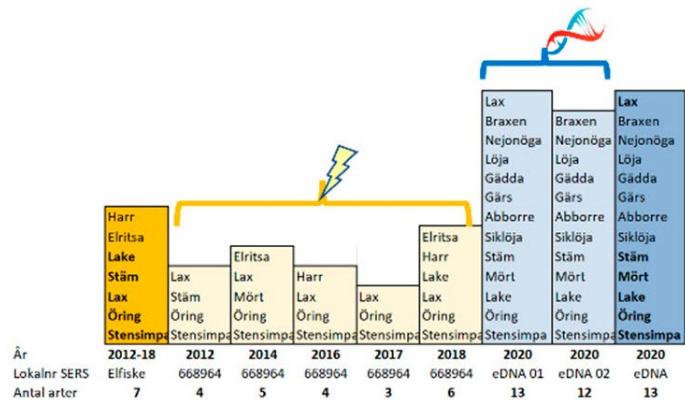
57

E. Grusgången (Utterån)

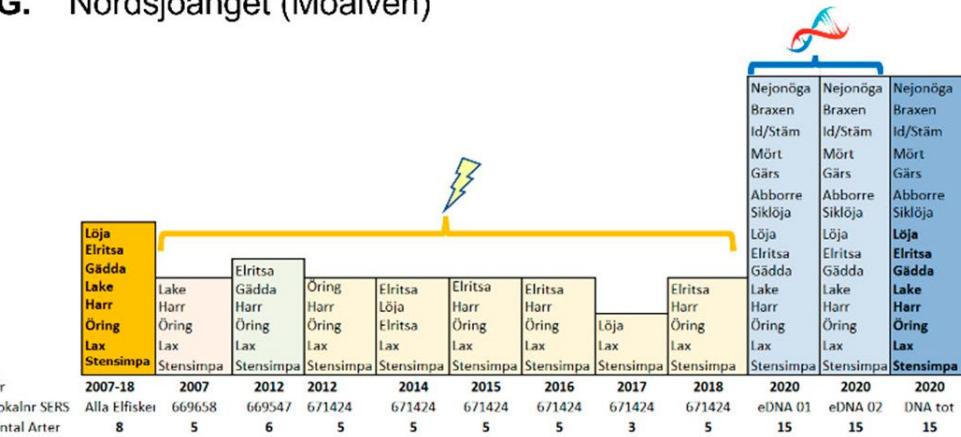


Figur 32. Stapeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst i Grusgången mellan enskilda historiska elfisken (staplar i ljusgula nyanser) sammanlagd artförekomst av alla elfisken (brandgula staplar) och artdetektion genom eDNA-analys (två prov per lokal, ljusblå staplar) samt sammanlagda detektioner av arter med eDNA (mörkblå staplar). Provfishenummer från SERS databas, elfiskeår, och antal detekterade arter anges. Artnamn i fetstil indikerar detektion med båda metoderna. (Micaela Hellström & Patrick Hernvall).

F. Nedan Gottnedammen (Utterån)



G. Nordsjöänget (Moälven)



Figur 33. Stapeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst i f) Nedan Gottnedammen och g) Nordsjöänget, mellan enskilda historiska elfisken (staplar i ljusgula nyanser) sammanlagd artförekomst av alla elfisken (brandgula staplar) och artdetektion genom eDNA-analys (två prov per lokal, ljusblå staplar) samt sammanlagda detektioner av arter med eDNA (mörkblå staplar). Provfishenummer från SERS databas, elfiskeår, och antal detekterade arter anges. Artnamn i fetstil indikerar detektion med båda metoderna. (Micaela Hellström & Patrick Hernvall).

10.7 Slutsatser – jämförelse mellan elfiske och eDNA

Resultatet ligger i linje med tidigare studier som påvisat eDNA:s fördelaktiga förmåga att detektera artdiversitet relativt elfiske. Flertalet tidigare undersökningar har visat att eDNA registrerar upp till fyra gånger mer arter än sammanslagna historiska provfisken (Hänfling m.fl. 2016; Civade m.fl. 2016; Pont m.fl. 2018).

Initialt designades elfisken för att detektera vissa målarter samt undersöka storleksfördelning och årsklasser, information som inte erhålls med eDNA. Är målet ändå att inventera diversitet så är eDNA som metod optimal. Vidare visar resultatet från avsnitt 9 (säsongsvariation) att även reproduktion kan registreras med eDNA då metoden detekterar gameter vilket ger arter en oproportionerligt stor biomassa i proverna under de perioder då deras reproduktion sker.

11 Kostnadsjämförelse mellan eDNA och traditionella inventeringar

11.1 Bakgrund

För slutbeställare är det inte bara viktigt att utröna om eDNA eller traditionella metoder är de mest optimala för specifika frågeställningar, utan också att erhålla en uppskattning av kostnadsskillnader metoderna emellan. Syftet med detta arbetspaket är att jämföra tidsåtgång i fält, såväl som kostnader för material och analyser, för traditionella inventeringsmetoder och eDNA. Detta kommer göras genom att presentera kostnadsjämförelser för fyra konkreta projekt med fokus på målartsggrupperna fisk, groddjur och stormusslor. Befintlig litteratur som behandlar ämnet diskuteras.

11.2 Metoder

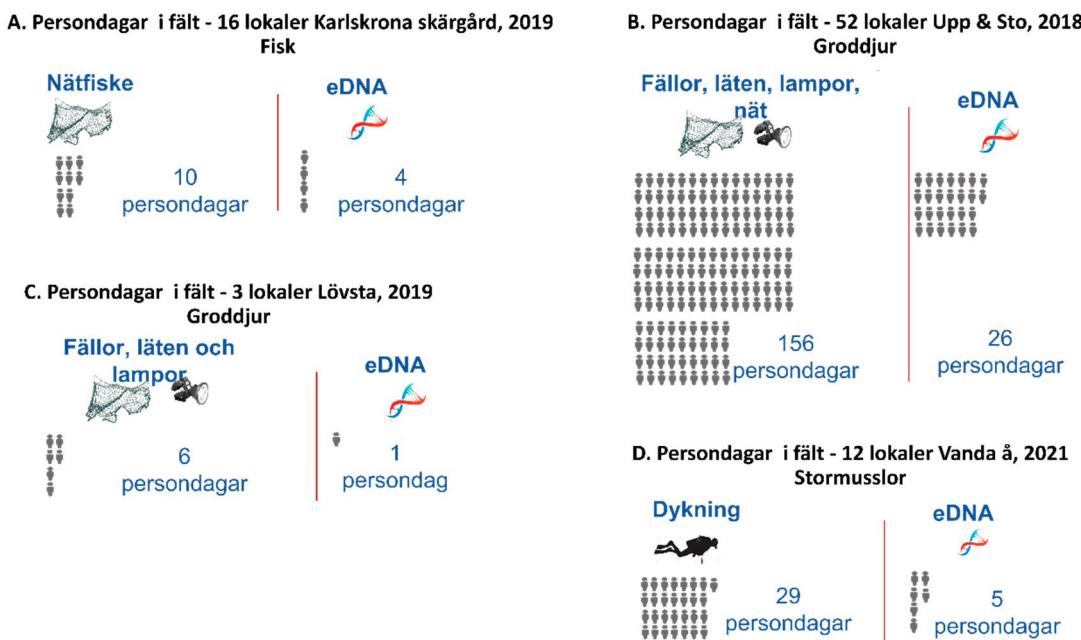
Jämförelsen görs genom att sammanställa och presentera kostnader av traditionella inventeringsmetoder och eDNA för fyra olika projekt. Kostnadsuppskattningar baseras på materialkostnad (såsom nät, ryssjor och filtreringsmaterial etc.) antal persondagar för förberedelser, fältarbete och efteranalys-/arbete. Under kostnader för DNA-analyser inkluderas fältmaterial och kostnader för analyser. Den senare inkluderar reagenser, material, bioinformatik samt arbetstid i laboratorium. Uppgifterna är hämtade från respektive utövare och arbetskostnaderna som anges grundar sig på persondagar (åtta timmar) samt standardiserade timpriser (700 kr/timme). Rapportskrivning och kommunikation med olika aktörer inte harräknats in i priserna. Tabell 9 visar de uppdrag som har inkluderats i kostnadsjämförelsen.

Tabell 9. Sammanställning av projekt som inkluderas i kostnadsjämförelsen, samt källor för respektive kostnadsunderlag. (Viktor Birgersson).

Projekt	Underlag eDNA	Underlag Konventionella metoder
Nordiska kustöversiktsnät och eDNA-flerartsanalys av fisk i Karlskrona skärgård	Näslund m.fl. 2019	Näslund m.fl. 2019, Ljunghaar & Karlsson 2015; 2020
Groddjursinventeringar – kostnadsjämförelse mellan visuella nattinventeringar och eDNA	Wijkmark m. fl. 2019	Wijkmark m. fl. 2019 och Calluna AB
Inventeringar av groddjurs- och fiskförekomst i 52 dammar i Uppsala och Stockholms län	Kačergyté m.fl. 2021	Ida Ahlbeck Bergendahl, SLU, personlig kommunikation
eDNA-flerartsanalyser av stormusslor i Vanda Å, Finland	Leinikki m.fl. 2021	Alleco OY

11.3 Resultat

En överskådlig illustration och jämförelse över åtgången av persondagar mellan traditionella metoder och eDNA visas i Figur 34. Nedbrytning av kostnaderna redovisas i Tabell 10–13.



Figur 34. Antal persondagar som spenderas i fält (inklusive fältförberedelser) för traditionella metoder och eDNA för respektive projekt A-E. (Micaela Hellström & Viktor Birgersson).

Tidsåtgång i fält räknat som persondagar á 8 timmar var 2,4–6,3 gånger högre för traditionella metoder jämfört med eDNA.

11.3.1 Nätfiske och eDNA – Karlskrona skärgård

I augusti 2019 genomfördes parallellt nätprovfiske och en eDNA-undersökning på 16 lokaler i Karlskrona skärgård. För provfisket användes nordiska kustöversiktsnät (tre per lokal) och för eDNA samlades vatten in för flerartsanalyser av fisk (Näslund m.fl. 2019).

För provfisket i Karlskrona användes nordiska kustöversiktsnät och för eDNA gjordes flerartsanalyser av fisk (se bilaga 1). För kustöversiktsnät gjordes två uträkningar, en uträkning där alla nät antas vara nya (nypris 2 170 SEK ex moms) (Tabell 10a) och en uträkning där 20 % av näten byts ut varje år på grund av slitage med en kostnad på 435 SEK per nät (Tabell 10b). Vidare räknas en kostnad på ca 200 SEK per lokal för övrigt material.

Tabell 10. Sammanställning av kostnader för inventering av fisksamhället i Karlskrona skärgård.
Tabell 10a anger pris för nya nät och 10b då 80 % av näten kan återanvändas mellan olika år.
(Viktor Birgersson).

A Fiskarter Karlskrona Skärgård	SEK Fältmaterial	SEK Flerartsanalyse	Fält	Persondagar Efterarbete	Totalt	SEK Pris totalt
Trad. per lokal	6 620		0,6	0,4	1	12 220
eDNA per lokal	350	3 200	0,25	0,05	0,3	5 230
16 lokaler traditionellt	105 920		9,6	6,4	16	195 520
16 lokaler eDNA	5 600	51 200	4	0,8	4,8	83 680

B Fiskarter Karlskrona Skärgård	SEK Fältmaterial	SEK Flerartsanalyse	Fält	Persondagar Efterarbete	Totalt	SEK Pris totalt
Trad. per lokal	1 503*		0,6	0,4	1	7 103
eDNA per lokal	350	3 200	0,2	0,05	0,25	5 230
16 lokaler traditionellt	24 048*		9,6	6,4	16	113 648
16 lokaler eDNA	5 600	51 200	4	0,8	4,8	83 680

* räknat på återanvändning av nät.

Tidsåtgången för nätprovfisket i fält var 2,4 gånger högre jämfört med eDNA-provtagningen. Nätprovfisket var vidare 1,35–2,3 gånger dyrare än eDNA beroende på om näten återanvändes eller inte.

Nätprovfiske och eDNA kompletterar varandra som metoder eftersom de bidrar med olika typer av information och detaljgrad. Nätprovfiske genererade data på fiskarnas storlek, vikt samt ålder. eDNA-undersökningen detekterade 24 arter medan nätfisket registrerade 16 arter. Detta visar att eDNA är en lämplig metod för att analysera fisksamhället eller närvaro av svårfångade och sällsynta arter.

11.3.2 Groddjursinventeringar – Lövsta

Under 2019 samlades vatten in från tre dammar i närheten av Lövsta bruk för analys av eDNA (Wijkmark m.fl. 2019). Vattenproverna analyserades med flerartsanalyser av groddjur. Traditionella undersökningar med ljus, fällor och nät utfördes av Calluna AB och resultaten jämförs i undersökningen. Sammanställning av kostnader för respektive metod presenteras i Tabell 11.

Tabell 11. Sammanställning av kostnader för inventering av groddjur i Lövsta. (Viktor Birgersson).

Groddjur Lövsta	SEK Fältmaterial	SEK Flerartsanalyse	Fält	Persondagar Efterarbete	Totalt	SEK Pris totalt
Traditionellt per lokal x5	300		1,9	-	1,9	10 940
eDNA per lokal	350	3 200	0,3	-	0,3	5 230
3 lokaler traditionellt x5	900		5,7	-	5,7	32 820
3 lokaler eDNA	1 050	9 600	0,9	-	0,9	15 690

Lokalerna besöktes fem gånger för traditionella metoder och en gång för eDNA-undersökningar. Antalet persondagar var 6,3 gånger högre för de traditionella inventeringarna jämfört med eDNA. Kostnaden för de traditionella metoderna var vidare 2,1 gånger högre än kostnaderna för eDNA-flerartsanalyser.

I undersökningen detekterades padda med båda metoderna i samtliga dammar medan mindre vattensalamander hittades i två av tre dammar vid traditionell inventering och i samtliga tre dammar genom eDNA-inventering.

11.3.3 Groddjur – Stockholm och Uppsala län

Sommaren 2018 samlades vattenprover in från 52 våtmarker i Upplands och Stockholms län. Proverna för de 52 dammarna i Stockholm och Uppsala län analyserades för närväro av fisk och groddjur med hjälp av eDNA-flerartsanalyser (Kačergyté m.fl. 2021). I denna undersökning jämför vi enbart tidsåtgång och kostnader för groddjursinventeringar. De traditionella metoderna inventerar i detta fall närväro av groddjursarter, antal och eventuell reproduktion. Avstånden mellan lokalerna var avsevärda eftersom de undersökta våtmarkerna var jämnt fördelade på 100×100 kilometer. För båda inventeringsmetoderna räknas att två personer arbetar tillsammans i fält på grund av säkerhetsskäl eftersom lokalerna är belägna i avlägsna områden. Tidsåtgången och kostnadsuppskattning för de traditionella metoderna baseras på uppgifter från rutinerade groddjursinventerare samt litteratur (Dr Ida Ahlbeck-Bergendal, personlig kommunikation; Malmgren 2005; Ahlbeck 2007; Wijkmark m.fl. 2019). Tidsåtgången per lokal är tre timmar per inventerare och inventeringstillfälle. Lokalerna kräver minst fyra besök för placering och vittjning av fällor. eDNA-proverna samlades in som delprover jämnt fördelade runt dammarna och filtrerades samt fixerades direkt efter insamling. Sammanställning av kostnader för respektive metod presenteras i Tabell 12.

Tabell 12. Sammanställning av kostnader för inventering groddjur och fisk i Stockholm och Uppsala län. (Viktor Birgersson).

Groddjur Uppsala – Stockholm	SEK Fältmaterial	SEK Flerartsanalys	Fält	Persondagar Efterarbete	Totalt	SEK Pris totalt
Traditionellt per lokal x4	300		3	0,1	3,1	17 660
eDNA per lokal	350	3 200	0,5	0,05	0,55	6 630
52 lokaler traditionellt x4	15 600		156	5,2	161,2	918 320
52 lokaler eDNA	18 200	166 400	26	2,6	28,6	344 760

Persondagskostnaderna för denna undersökning innehållade kostnader för utsättning och vittjande av fällor vid fyra inventeringstillfällen per lokal. Tidsåtgången i fält för traditionella metoder räknas vara sex gånger högre än för eDNA-provtagnings. Kostnaderna för de traditionella metoderna räknades bli 2,6 gånger högre än för eDNA-flerartsanalyser.

eDNA-undersökningen detekterade fem groddjursarter; vanlig padda, vanlig groda, åkergröda, mindre vattensalamander och större vattensalamander. Den större vattensalamandern var närvärande i 27 av 52 dammar och är troligtvis allmänt förekommande då lämpliga habitat finns tillgängliga.

11.3.4 Stormusslor – Vanda å

Förekomst av stormusslor i Vanda å undersöktes år 2020 på 12 lokaler med eDNA-flerartsanalyser (Leinikki m.fl. 2021). Projektets budget och kostnader jämförs med kostnadsunderlaget för dykinventeringar på dessa lokaler. Kostnadsunderlaget för dykinventeringar erhölls av Alleco OY som är erfaren utövare av dessa inventeringar.

Sammanställning av kostnader för respektive metod presenteras i Tabell 13. I dykinventeringen ingick även kostnader för tillstånd å 3 000 SEK per lokal vilket innehåller både ansökningstid och avgifter. Denna kostnad räknades in i fälttid.

Tabell 13. Sammanställning av tidsåtgång och kostnader för inventering av stormusslor på 12 lokaler i Vanda å, Finland. (Viktor Birgersson).

Stormusslor, Vanda å, Finland	SEK Fältmaterial	SEK Flerartsanalys	Persondagar			SEK Pris totalt
			Fält	Efterarbete	Totalt	
Dyk per lokal	200		2,4	0,1	2,5	14 200
eDNA per lokal	350	3 200	0,45	0,05	0,5	6 350
Dyk 12 lokaler	2 400		28,8	1,2	30,0	170 400
eDNA 12 lokaler	4 200	38 400	5,4	0,6	6,0	76 200

Antalet persondagar i fält var 5,3 gånger högre för dykinventering jämfört med eDNA-flerartsanalyser för stormusslor. Dykinventering var 2,2 gånger dyrare än eDNA-flerartsanalyser för musslor.

Arterna som detekterades var vanlig dammussla, spetsig målarmussla, den nära hotade flata dammusslan, äkta målarmussla och den hotade tjockskaliga målarmusslan. eDNA-undersökningen visade att den tjockskaliga målarmusslan har en nordligare utbredning i Vanda å än vad som tidigare rapporterats. Eftersom arten är hotad är fynden av stor vikt för miljöövervakningen.

11.4 Slutsatser

Kostnadsjämförelserna i denna rapportdel visar att eDNA är kostnadseffektivt i relation till övriga metoder. Den främsta förklaringen till skillnaden kan härledas till tidsåtgången i fält, där samtliga traditionella inventeringsmetoder i regel kräver fler persondagar än eDNA. Tidsåtgången räknat i antal persondagar i fält var 2,4–6,3 gånger högre för traditionella metoder jämfört med eDNA och kostnaderna för traditionella metoder 1,35–2,6 gånger högre.

Resultatet i denna analys bekräftar vad ett stort antal studier redan har visat, att eDNA är ett kostnadseffektivt alternativ i relation till traditionella inventeringsmetoder (Biggs m.fl. 2015; Davy m.fl. 2015; Huver m.fl. 2015; Sigsgaard m.fl. 2015; Afzali m.fl. 2021; Golpour m.fl. 2022). Som ett exempel kan nämnas att eDNA utgjorde en 67 % lägre kostnad jämfört med elfiske vid undersökning av förekomst av amerikansk bäckröding i norra Wisconsin (Evans m.fl. 2017). Vidare påvisade Smart m.fl. (2016) ett likande mönster vid jämförelser mellan eDNA och traditionella provfisken. En annan undersökning i Danmark visade att kostnaden för eDNA var nära hälften av kostnader för traditionella metoder vid inventering av arten slampiskare (Sigsgaard m.fl. 2015). Davy m.fl. (2015) kom fram till liknande resultat vid inventeringar av nio sköldpaddsarter i sötvatten där traditionella metoder var 2–10 gånger dyrare jämfört med eDNA-analyser.

Sammanfattningsvis visar denna rapportdel att analys av eDNA utgör ett kostnadseffektivt alternativ till traditionella metoder vid undersökning av biologisk mångfald, artsamhällen och kartläggning av invasiva eller sällsynta arter.

12 Osäkerheter och felkällor

Både beställare och utövare bör vara medvetna om att majoriteten av arter innehar unika sekvenser, men ibland har två eller flera arter identiska sekvenser på den DNA-region som analyseras. Dessa rapporteras då som så kallade artkomplex vilket i sammanhanget innebär att två arter rapporteras som en. Exempel på vanliga artkomplex är id/stäm och vimma/björkna. För vissa artkomplex kan arterna differentieras genom att använda andra markörer som analyserar en annan DNA-region där dessa arter skiljer sig åt.

Naturlig kontamination är vanligt förekommande och utgörs vanligtvis av boskap, tamdjur, matrester och människa (ej provtagaren). Ibland förekommer detektion av arter där det kan vara svårt att avgöra om källan härrör från naturlig kontamination eller en faktisk förekomst, till exempel vid detektion av vanliga matfiskar. I dessa fall är lokalkändedom samt goda kunskaper inom ekologi av yttersta vikt för att tolka data rätt och inte dra felaktiga slutsatser. En noggrann och genomsiktig provtagningsplan där man tar hänsyn till potentiella kontamineringsskällor minimerar riskerna för problematisk kontamination. Exempel på sådana kontamineringsskällor kan vara utlopp av avlopps- eller dagvatten, livsmedelsindustri, jordbruk och restaurangverksamhet.

Under hela underökningen från fält till slutsekvensering bör negativa kontroller införas i varje steg av analyserna. De DNA-fria proverna analyseras så att kontaminering kan uteslutas och falska positiva provsvar inte uppkommer. Om DNA-signaler av målartsgrupperna hittas i en negativ kontroll innebär det att undersökningen måste göras om ifall källan inte kan identifieras och konsekvenserna av kontamineringen fastställas. Konsekvenserna av en kontaminerad negativ kontroll kan i praktiken innebära att arter som inte finns i en miljö detekteras (falsk positiv). En positiv kontroll innebär att ett prov som innehåller ett känt DNA testas för att verifiera att den använda metodiken fungerar som den skall. Om DNA-signaler inte hittas i en positiv kontroll innebär det att metodiken måste justeras och analysen eller undersökningen måste göras om. En positiv kontroll utan DNA-signal kan i praktiken visa att arter som finns i en miljö inte detekteras (falsk negativ).

En annan osäkerhet är att det kan vara svårt att redogöra för spridning och rörelse av eDNA i vattenmassan (Evans m.fl. 2017; Evans & Lamberti 2018). Det senare kan dock hanteras genom en noggrann och genomsiktig provtagningsplan. Flera studier understryker vikten av provtagning vid rätt tidpunkt, samt vikten av att använda optimala insamlingsmetoder, eftersom detektionsgraden annars sjunker (Takahara m.fl. 2012; Doi m.fl. 2019 b; Lawson Handley m.fl. 2019; Golopour m.fl. 2022).

För att eDNA skall vara en tillförlitlig inventringsmetod är det viktigt med införandet av standarder. eDNA som inventeringsverktyg förväntas få ett uppsving inom miljöövervakningen då standarder för insamling, laboratoriekrav och analyser är på plats. CEN- och SIS-standarder för insamling av prover godkändes i januari 2023 (CEN/TC 230/WG 28 "DNA and eDNA methods") vilket försäkrar att olika utövare visar jämförbara resultat. Antalet replikat i laboratoriet, sekvenseringsdjup samt analysmetod kan uppvisa stora skillnader i resultat. En studie av Doi m.fl. (2019a) visade att antal PCR-replikat hade en stor påverkan på detektionsgraden av målarter och att minst

4,6 replikat behövs för att ge en riktig bild av arternas förekomst. Vidare krävs förståelse för hur data analyseras och tolkas. Kvalitetskontroll av referensdatabaser är viktig så att inte fel art annoteras. Dessa möjliga felkällor och hur de undersöks samt redovisas beskrivs i Bruce m.fl. (2021).

Analyser samt artbestämning är beroende av referensdatabaser och trots att de flesta arterna i Sverige är sekvenserade finns det ännu luckor. Dessa luckor kompletteras långsamt och referensdatabaserna på NCBI är inte alltid tillförlitliga. En viktig aspekt för en bred användning av eDNA är att referenssekvenserna är öppna. För att försäkra att sekvenserna är verifierade är det ytterst önskvärt å men en nationell satsning på sekvensering av mitokondrisk genomet i samarbete med museer, taxonomer och genetiker för att olika användare kan verifiera data.

13 Sammanfattande konklusioner

Utvecklingen av eDNA-analyser som forskningsfält till att användas som ett praktiskt verktyg inom miljöövervakningen har gått fort, och vetenskaplig rigiditet behöver kombineras med praktisk användning för miljöövervakande organ. Viktiga faktorer att tänka på innan ett eDNA-projekt går av stapeln är fältplanering, insamling, konservering av prover, laboratoriekrafter och möjligheterna att kontrollera hur pålitliga metoderna är. Även felkällor är viktiga att ta i beaktande. eDNA som verktyg inom miljöövervakningen som ett komplement eller ersättning till traditionella metoder kan öppna nya möjligheter att utföra inventeringar av arter och biologisk mångfald under kort tid på en större geografisk skala. Med tanke på mindre resurser för miljöövervakning är eDNA en metod som används över stora geografiska skalar och därför är en inventeringsmetod som kan användas utan andra metoder. Detta gäller fiskinventeringar, inventeringar av sällsynta och invasiva arter, inventering av musslor och groddjur. eDNA som verktyg där prov tags regelbundet ger information om fiskpopulationer, reproduktion och förändringar i artsammansättning även i förhållande till miljöförändringar.

Resultaten från projektets olika arbetspaket visar att:

- Artanalyserna från olika laboratorier påvisar liknande resultat. Detta innebär att resultat från olika eDNA-utövare (under rätt förutsättningar) är jämförbara och att metoden är tillförlitlig.
- Ringtester mellan olika laboratorier för att verifiera resultat är en av förutsättningarna för att eDNA skall kunna lanseras på större skala.
- Prover som fixeras med etanol detekterar fler arter än prover fixerade med LM.
- Effekt av porstorlek på olika filter är viktig, eftersom för stor porstorlek påverkar resultaten negativt.
- För konservering av prover under en längre tid bör etanol användas då detektionsgraden är stabil även över tid.
- En genomtänkt provtagningsdesign och val av lokaler kan spara både tid och resurser då eDNA används som metod.
- En månatlig provtagning under ett år är ett kraftfullt verktyg för att utröna säsongsvariationer i fisksamhället. Genom denna strategi kan även reproduktionsperioder för ett stort antal arter identifieras.
- eDNA är mycket precist och detekterar fler arter än traditionella metoder.
- eDNA utgör ett kostnadseffektivt alternativ till traditionella metoder vid undersökning av biologisk mångfald, artsamhällen och kartläggning av invasiva eller sällsynta arter.

Sammanfattningsvis visar resultatet att eDNA kan utgöra ett bättre alternativ än traditionella inventeringsmetoder vid undersökning av biologisk mångfald och kartläggning av invasiva eller sällsynta arter. Vidare är eDNA kostnadseffektivt och kan ske i svårtillgängliga områden vilket möjliggör undersökningar på en större geografisk skala än vad som tidigare varit möjligt. På detta sätt kan metoden generera stora dataset som kan bidra till eventuella åtgärdsbeslut eller inducera uppföljande, mer detaljerade inventeringar. I regel bör metoderna dock inte betraktas som alternativ i motsats till varandra då de erbjuder olika och ofta kompletterande information. Provtagning av eDNA detekterar som visat fler arter än traditionella metoder som nätfiske men data som individers kön, hälsa och storlek erhålls inte.

Kombinerade inventeringsmetoder med eDNA och traditionella metoder blir ett kraftfullt verktyg för att erhålla goda underlag för åtgärder samt beslut inom förvaltning och miljöövervakning. Forskning pågår för att särskilja populationer inom arter och användningen av dessa analyser i framtiden stärker eDNA som inventeringsverktyg och komplement till andra inventeringsmetoder. För att fullt ut implementera eDNA som ett verktyg för nationella övervakningsprogram är det viktigt att standardisera en metodik som är både känslig och kostnadseffektiv.

14 Tack

Ett varmt tack till Henrik Appelgren från Naturvårdsverket som varit följare i projektet, deltagit i fältarbetet och som gett många goda råd till deltagarna under projektets gång. Tack till Kari Stange på Naturvårdsverket för kommunikation och stöd i koordinering i forskarprojektet. Tack till Peter AU Stæhr som var sakkunnig motståndare under slut-presentationen av projektet, samt övriga deltagare från HaV och Naturvårdsverket som deltog i mötet och kom med många nya infallsvinklar då det gäller eDNA som verktyg i miljöövervakningen. Tack till Antonia Nyström Sandman för kommentarer och redigering av denna rapportdel, samt för koordinering och ett fantastiskt ledarskap.

Vi riktar även ett varmt tack till markägare, länsstyrelser och intresseorganisationer som på olika sätt har intresserat sig för projektet och som beviljat tillstånd att beträda marker. Representanter för Anundsjö FVO lånade ut båtar, tog del i fältarbetet och delade med sig om lokal fiskekännedom. Ronnenabbs fiskevårdsförening deltog i ett demonstrationstillfälle på Sturkö i Blekinge tillsammans med Erland Lettermann från Havs- och vattenmyndigheten. Jerry Persson vid Nyköpingsåarnas vattenvårdsförbund gav tillstånd att analysera proverna för etanolbevaring över tid samt visade stort intresse för projektet.

Vi riktar ett stort tack till alla ni som deltagit i fältarbetet: Henrik Appelgren, Wilhelm Dietrichson, Tomas Didrikas, Pär Hellström, Patrick Hernvall, Izabell Fontaeus, Ylva Jondelius, Hannah Phillips, Liselott Rasmussen, Tom Staveley och Nicklas Wijkmark.

Vi vill rikta ett varmt tack till Jouni Leinikki vid Alleco AB i Finland och Nicklas Wijkmark, WSP, för information om tidsåtgång och kostnader vid dykundersökningar. Tack till Ida Ahlbeck Bergendahl som delade med sig av erfarenheter för groddjurs-inventering och gav uppgifter om tidsåtgång och beräkningsunderlag för inventering av groddjur vid de 52 dammarna i Uppsala och Stockholms län.

Detta projekt finansierades genom Naturvårdsverkets och Havs och Vatten-myndighetens satsning ”forskningsmedel för DNA-metoder inom miljöövervakning”. Författarna svarar själv för innehållet och anger vid referens till forskningen 2019–2021. Projektet LifeDNAquatic (Dnr 802-0183-18) uttrycker nödvändigtvis inte Naturvårdsverkets ställningstagande.

15 Källhänvisning

- Ahlbeck, I. (2007). Inventering av groddjur i Södertälje kommun 2007. Södertälje kommun. Funna arter är: större vattensalamander, mindre vattensalamander, vanlig groda, åkergröda och vanlig padda. *Herpetologerna 2007, Södertälje Kommun 2007*.
- Afzali, S. F., Bourdages, H., Laporte, M., Mérot, C., Normandeau, E., Audet, C., et al. (2021). Comparing environmental metabarcoding and trawling survey of Demersal fish communities in the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Environmental DNA* 3, 22–42.
- Andruszkiewicz, E. A., Starks, H. A., Chavez, F. P., Sassoubre, L. M., Block, B. A., & Boehm, A. B. (2017). Biomonitoring of marine vertebrates in Monterey Bay using eDNA metabarcoding. *PLoS One*, 12(4), e0176343.
- Beentjes, K. K., Speksnijder, A. G., Schilthuizen, M., Hoogeveen, M., & van der Hoorn, B. B. (2019). The effects of spatial and temporal replicate sampling on eDNA metabarcoding. *PeerJ*, 7, e7335.
- Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R.A., Foster, J., Wilkinson, J.W., Arnell, A., Brotherton, P., Williams, P., Dunn, F. (2015) Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183: 19–28.
- Bista, I., Carvalho, G.R., Walsh, K., Seymour, M., Hajibabaei, M., Lallias, D., Christmas, M., Creer, S. (2017). Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. *Nature Communications* 8: 14087.
- Board, D.A. (2000). Quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories. *Forensic Sci. Commun.* 2.
- Brandhagen, M.D., Just, R.S., Irwin, J.A. (2020). Validation of NGS for mitochondrial DNA casework at the FBI Laboratory. *Forensic Science International: Genetics* 44: 102151.
- Bruce, K., Blackman, R. C., Bourlat, S. J., Hellström, M., Bakker, J., Bista, I., Bohmann, K., Bouchez, A., Brys, R., Clark, K., Elbrecht, V., Fazi, S., Fonseca, V. G., Häfling, B., Leese, F., Mächler, E., Mahon, A. R., Meissner, K., Panksep, K., ... Deiner, K. (2021). A practical guide to DNA based methods for biodiversity assessment. *Pensoft*.
- Brys, R., Haegeman, A., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Staelens, A., Auwerx, J., & Ruttink, T. (2021). Monitoring of spatiotemporal occupancy patterns of fish and amphibian species in a lentic aquatic system using environmental DNA. *Molecular ecology*, 30(13), 3097–3110.
- Bylemans, J., Gleeson, D.M., Hardy, C.M., Furlan, E. (2018). Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray-Darling Basin (Australia). *Ecology and Evolution* 8: 8697–8712.
- CEN/TC 230/WG 28. Water quality — Sampling, capture and preservation of environmental DNA from water. Final draft January 2023.
- Civade, R., Dejean, T., Valentini, A., Roset, N., Raymond, J. C., Bonin, A., ... & Pont, D. (2016). Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. *Plos one*, 11(6), e0157366.

- Davy, C. M., Kidd, A. G., Wilson, C. C. (2015). Development and validation of environmental DNA (eDNA) markers for detection of freshwater turtles. *PLoS one*, 10(7), e0130965
- Deiner, K., Altermatt, F. (2014). Transport Distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS ONE* 9: e88786.
- Deiner, K., Walser, J.C., Mächler, E., Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*. <https://doi10.1016/j.biocon.2014.11.018>.
- Deiner, K., Fronhofer, E.A., Mächler, E., Walser, J.C., Altermatt, F. (2016). Environmental DNA reveals that rivers are conveyer belts of biodiversity information. *Nature Communications* 7: 12544.
- Deiner, K., Lopez, J., Bourne, S., Holman, L., Seymour, M., Grey, E.K., Lacoursière, A., m.fl. (2018). Optimising the detection of marine taxonomic richness using environmental dna metabarcoding: The effects of filter material, pore size and extraction method. *Metabarcoding and Metagenomics*. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.28963>.
- Di Muri, C., Lawson Handley, L., Bean, C. W., Benucci, M., Harper, L. R., James, B., ... & Häneling, B. (2022). Spatio-temporal monitoring of lake fish spawning activity using environmental DNA metabarcoding. *Environmental DNA*. In press
- Di Muri, C., Lawson Handley, L., Bean, C.W., Li, J., Peirson, G., Sellers, G.S., Walsh, K., Watson, H.V., Winfield, I.J., Häneling, B. (2020). Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. *Metabarcoding and Metagenomics*, 4: e56959.
- Doi, H., Fukaya, K., Oka, S. I., Sato, K., Kondoh, M., & Miya, M. (2019 a). Evaluation of detection probabilities at the water-filtering and initial PCR steps in environmental DNA metabarcoding using a multispecies site occupancy model. *Scientific Reports*, 9(1), 3581.
- Doi, H., Inui, R., Matsuoka, S., Akamatsu, Y., Goto, M., Kono, T. (2019 b). Evaluation of biodiversity metrics through environmental DNA metabarcoding outperforms visual and capturing surveys. *BioRxiv*, 617670
- Evans, N. T., Shirey, P. D., Wieringa, J. G., Mahon, A. R., Lamberti, G. A. (2017). Comparative cost and effort of fish distribution detection via environmental DNA analysis and electrofishing. *Fisheries* 42, 90–99.
- Evans, N. T., & Lamberti, G. A. (2018). Freshwater fisheries assessment using environmental DNA: A primer on the method, its potential, and shortcomings as a conservation tool. *Fisheries Research*, 197, 60–66.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental dna from water samples. *Biology Letters*. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>.
- Goldberg, C. S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., & Waits, L. P. (2013). Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32(3), 792–800.

Goldberg, C.S., Turner, C.R., Deiner, K., Klymus, K.E., Thomsen, P.F., Murphy, M.A., Spear, S.F., m.fl. (2016). Critical considerations for the application of environmental dna methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12595>.

Golpour Dehsari, A., Šmejkal, M., Čech, M., Acácio dos Santos, R., Souza, A. T., Martinez, C., ... & Blabolil, P (2022). Similarities and differences in fish community composition accessed by electrofishing, gill netting, seining, trawling, and water eDNA metabarcoding in temperate reservoirs. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 600.

Griffiths, J.F., Griffiths, A.J., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M., Suzuki, D.T., Miller, J.H. (2005). An introduction to genetic analysis. *Macmillan*.

Harper, L.R., Lawson Handley, L., Hahn, C., Boonham, N., Rees, H.C., Gough, K.C., ... & Häneling, B. (2018). Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Ecology and evolution*, 8(12), 6330–6341.

Hellström, M., Andersson-Li, M., Brys, R., Halfmarten, D., Häneling, B., Näslund, J., Sjöstedt, J., Spens, J., Tang, C., Öhman, M.C. & Bruce, K. (2021a). Riktlinjer för hantering av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöanalys – Del I: Insamling i fält, filtrering och konservering. *AquaBiota Report 2021:09*.

Hellström, M., Andersson-Li, M., Brys, R., Halfmarten, D., Häneling, B., Näslund, J., Sjöstedt, J., Spens, J., Tang, C., Öhman, M.C. & Bruce K. (2021b). Riktlinjer för hantering av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöanalys – Del II: Laboratoriekrafter och eDNA-extraktioner. *AquaBiota Report 2021:10*.

Hellström, M & Spens J. 2021. Inventering av fiskarter med eDNA i Moälven. Fiskförekomst och indikatorarter för förorening. *MIX Research 2021:07*

Huver, J. R., Koprivnikar, J., Johnson, P. T. J., and Whyard, S. (2015). Development and application of an eDNA method to detect and quantify a pathogenic parasite in aquatic ecosystems. *Ecol. Appl.* 25, 991–1002

Häneling, B., Lawson Handley, L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., et al. (2016). Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology* 25: 3101–19.

Häneling, B., & Lawson-Handley, L. (2021). Environmental DNA-based approaches for the monitoring of fish populations have come of age. *Journal of Fish Biology*, 98(2), 339–340.

Jerde, C.L., Chadderton, W.L., Mahon, A.R., Renshaw, M.A., Corush, J., Budny, M.L., Mysorekar, S., Lodge, D.M. (2013). Detection of Asian Carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2012-0478>.

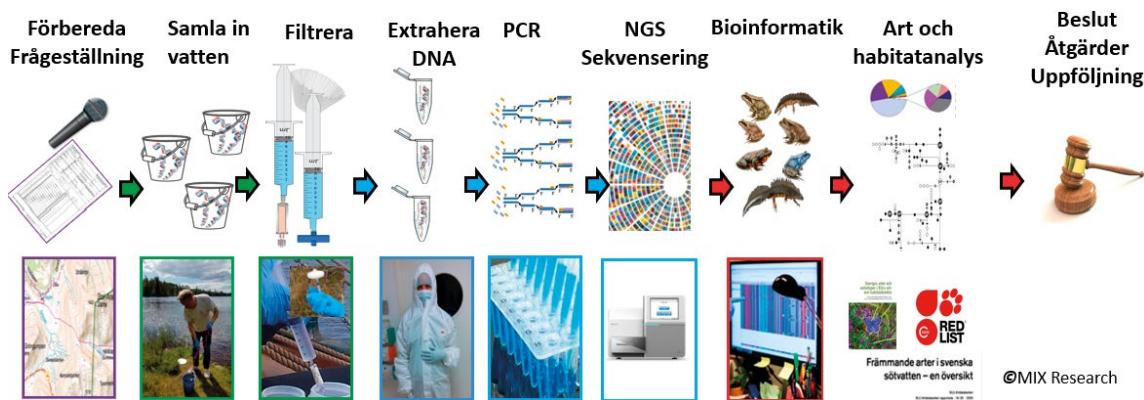
Jerde, C.L., Olds, B.P., Shogren, A.J., Andruszkiewicz, E.A., Mahon, A.R., Bolster, D., Tank, J.L. (2016). Influence of stream bottom substrate on retention and transport of vertebrate environmental DNA. *Environmental Science & Technology* 50: 8770–79.

- Karlsson, E., Ogonowski, M., Sundblad, G., Sundin, J., Svensson, O., Nousiainen, I., & Vasemägi, A. (2022). Strong positive relationships between eDNA concentrations and biomass in juvenile and adult pike (*Esox lucius*) under controlled conditions: Implications for monitoring. *Environmental DNA*, 4(4), 881–893.
- Karlsson M. 2015. Provfiske i Östersjöns kustområden – Djupstratifierat provfiske med Nordiska kustöversiksnät Havs och Vattenmyndigheten. Version 1:3 2015-07-07
- Kačergyté, I., Petersson, E., Arlt, D., Hellström, M., Knape, J., Spens, J., ... & Pärt, T. (2021). Environmental DNA metabarcoding elucidates patterns of fish colonisation and co-occurrences with amphibians in temperate wetlands created for biodiversity. *Freshwater Biology*, 66(10), 1915–1929.
- Keck, F., Blackman, R. C., Bossart, R., Brantschen, J., Couton, M., Hürlemann, S., ... & Altermatt, F. (2022). Meta-analysis shows both congruence and complementarity of DNA and eDNA metabarcoding to traditional methods for biological community assessment. *Molecular Ecology*, 31(6), 1820–1835.
- Lawson Handley, L., Read, D.S., Winfield, I.J., Kimbell, H., Johnson, H., Li, J., Hahn, C., Blackman, R., Wilcox, R., Donnelly, R., Szitenberg, A. (2019). Temporal and spatial variation in distribution of fish 553 environmental DNA in England's largest lake. *Environmental DNA*, 1(1), 26–39.
- Leese, F., Bouchez, A., Abarenkov, K., Altermatt, F., Borja, Á., Bruce, K., Ekrem, T. m.fl. (2018). Why We need sustainable networks bridging countries, disciplines, cultures and generations for aquatic biomonitoring 2.0: A Perspective Derived From the DNAqua-Net COST Action. *Next Generation Biomonitoring: Part 1*. <https://doi.org/10.1016/bs.aecr.2018.01.001>.
- Leinikki, J., Hellström, M., Oulasvirta, P., Leinikki, E., Syväraanta, J. & Saarman, M. 2021. Vantaanjoen simpukkakartoitus eDNA-menetelmällä (Översatt från finska: Kartering av stormusslor med eDNA analys i Vanda Å). *Alleco Oy* 30/2021.
- Ljung, P E & C Bornestaf. Användning av försöksdjur i Sverige under 2016. Jordbruksverket 2018-03-07, Dnr: 5.2.17-12670/17
- Ljunghaar, L., Karlsson M. (2015,). Provfiske i Östersjöns kustområden – Djupstratifierat provfiske med Nordiska kustöversiksnät. Version 1:3 2015-07-07. *Havs och Vattenmyndigheten*
- Ljunghaar, L., Karlsson M. (2020,). Provfiske i Östersjöns kustområden – Djupstratifierat provfiske med Nordiska kustöversiksnät. Version 1:4 2020-02-03. *Havs och Vattenmyndigheten*
- Longmire, J.L., Baker, R.J., Maltbie, M., Texas Tech University. (1997). Use of 'Lysis Buffer' in DNA isolation and its implication for museum collections /. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.143318>.
- Malmgren, J. 2005. Inventering och övervakning av större vattensalamander (*Triturus cristatus*). *Naturvårdsverket Version 1:0:2005-04-21*
- Mauvisseau, Q., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Burian, A., & Brys, R. (2021). Effects of preservation strategies on environmental DNA detection and quantification using ddPCR. *Environmental DNA*, 3(4), 815–822.

- Näslund, J., Didrikas, T., Hellström, P., Hellström, M. (2019). Inventering av fiskfaunan i Gåsefjärden, Karlskrona Skärgård, med nätprovfiske och eDNA. *Länsstyrelsen Blekinge Rapport 2019:21*.
- Preston, F.W. (1962). The canonical distribution of commonness and rarity: Part I. *Ecology* 43:185–215 and 410–432.
- Pont, D., Rocle, M., Valentini, A., Civade, R., Jean, P., Maire, A., Roset, N., Schabuss, M., Zornig, H., Dejean, T. (2018). Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports* 8: 10361.
- Pont, D., Valentini, A., Rocle, M., Maire, A., Delaigue, O., Jean, P., Dejean, T. (2019). The future of fish-based ecological assessment of European rivers: From traditional EU Water Framework Directive compliant methods to eDNA metabarcoding-based approaches. *Journal of Fish Biology*. <https://doi.org/10.1111/jfb.14176>.
- Renshaw, M.A., Olds, B.P., Jerde, C.L., McVeigh, M.M., Lodge, D.M. (2015). The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol–chloroform–isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular Ecology Resources*, 15: 168–176.
- Sellers, G.S., Di Muri, C., Gómez, A., & Hänfling, B. (2018). Mu-DNA: a modular universal DNA extraction method adaptable for a wide range of sample types. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2, e24556.
- Seymour, M. (2019). Rapid progression and future of environmental DNA research. *Communications Biology* 2: 80.
- Shogren, A.J., Tank, J.L., Andruszkiewicz, E., Olds, B., Mahobn, A.R., Jerde, C.L., Bolster, D. (2017). Controls on eDNA Movement in streams: Transport, retention, and resuspension. *Scientific Reports* 7: 5065.
- Shogren, A.J., Arial, J., Tank, J.L., Egan, S.P., August, O., Rosi, E.J., Hanrahan, B.R., Renshaw, M.A., Gantz, C.A., Bolster, D. (2018). Water flow and biofilm cover influence environmental dna detection in recirculating streams. *Environmental Science & Technology* 52: 8530–37.
- Sigsgaard, E. E., Carl, H., Mörller, P. R., and Thomsen, P. F. (2015). Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biol. Conserv.* 183, 46–52.
- Smart, A. S., Weeks, A. R., van Rooyen, A. R., Moore, A., McCarthy, M. A., and Tingley, R. (2016). Assessing the cost-efficiency of environmental DNA sampling. *Methods in Ecology and Evolution* 7, 1291–1298
- Spens, J., Alanärä, A., & Eriksson, L. O. (2007 a). Nonnative brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the demise of native brown trout (*Salmo trutta*) in northern boreal lakes: stealthy, long-term patterns?. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64(4), 654–664.
- Spens, J., Englund, G., & Lundqvist, H. (2007 b). Network connectivity and dispersal barriers: using geographical information system (GIS) tools to predict landscape scale distribution of a key predator (*Esox lucius*) among lakes. *Journal of Applied Ecology*, 44(6), 1127–1137.

- Spens, J., & Ball, J. P. (2008). Salmonid or nonsalmonid lakes: predicting the fate of northern boreal fish communities with hierarchical filters relating to a keystone piscivore. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65(9), 1945–1955.
- Spens, J., Evans, A.R., Halfmaerten, D., Knudsen, S.W., Sengupta, M.E., Mak, S.S.T., Sigsgaard, E.E., Hellström, M. (2017). Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: Advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12683>.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L.H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789–1793
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., and Kawabata, Z. I. (2012). Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PloS one*, 7(4), e35868.
- Tsuji, S., & Shibata, N. (2021). Identifying spawning events in fish by observing a spike in environmental DNA concentration after spawning. *Environmental DNA*, 3(1), 190–199.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., et al. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25, 929–942.
- Wacker, S., Fossøy, F., Larsen, B. M., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., & Karlsson, S. (2019). Downstream transport and seasonal variation in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) eDNA concentration. *Environmental DNA*, 1(1), 64–73.
- Wegleitner, B.J., Jerde, C.L., Tucker, A., Chadderton, W.L., Mahon, A.R. (2015). Long duration, room temperature preservation of filtered eDNA samples. *Conservation Genetics Resources*
- Wijkmark, N., Edbom Blomstrand, C. Ohlin, V., Hellström, M. 2019. Inventering av groddjur i tre dammar i Lövsta med eDNA samt traditionell metodik. *AquaBiota* 2019:06. 13 sid.
- Wu, L., Yamamoto, Y., Yamaguchi, S., & Minamoto, T. (2022). Spatiotemporal changes in environmental DNA concentrations caused by fish spawning activity. *Ecological Indicators*, 142, 109213

Bilaga 1 Fält- och laboratorieprotokoll



Figur B1-1. Flödesdiagram som visar de olika stegen för flerartsanalyser från fältplanering till beslut och åtgärder. (Micaela Hellström)

B1 Fältarbete

Innan eDNA-provtagningen genomfördes i fält, steriliseras all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila enheter som lades ihop till DNA-fria kit. För varje filter samlades fem liter vatten in i form av delprover som sammanfördes till ett samlingsprov för säkrare resultat (Harper m.fl. 2018). Undantag för delprover redovisas i avsnittet för spatial provtagning där del två undersöker skillnader mellan att samla in delprov (tre filter) och genom att samla in fem liter vatten utan delprov (1 filter). Detta upprepades 12 månader för rinnande vatten och utlopp i sjö. De marina proverna samt proverna i våtmarker samlades in i tre replikat genom att sammanslå delprover för varje replikat.

Provtagarna bar sterila handskar och munskydd för att förhindra att proverna kontamineras. Vattnet filtrerades för hand med en 100 ml steril spruta, eller genom en peristaltisk pump (Vampire Sampler, Berkele, Tyskland) genom 5 µm GF/0,8 µm PES inkapslade filterenheter (NatureMetrics Ltd UK). Provpunkterna registrerades med GPS och vattentemperaturen mättes. Vidare registrerades volym filtrerat vatten. Fixering med 96 % etanol (molekylär grad 200 proof) följde protokoll enligt Spens m.fl. (2017).

För arbetspaketet WP1 som undersökte skillnader mellan konserveringsmetoder fixerades hälften av filtren med etanol och andra hälften med Longmire (LM) solution. Efter avslutat fältarbete transporterades de fixerade proven till MoRe Research AB (numera RISE AB) extraktionslaboratorier, enbart avsedda för eDNA-analyser. Metabarkoding och bioinformatik utfördes vid NatureMetrics Ltd, ddPCR-tester utfördes vid INBO:s laboratorier i Belgien.

B2 Laboratoriearbete

B2.1 Extraktioner

eDNA från filter fixerade i etanol utvanns (extraherades) enligt protokoll för av Spens m.fl. (2017) i MoRe Research-laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Ett tillägg i protokollet var att pelleten från alkoholextraktionen, samt det slutna filtret lyserades separat och lysaten sammanslogs efter inkubation i 56 °C till ett prov. Detta gjordes för att ta tillvara så mycket DNA som möjligt.

eDNA-filtren bevarade i Longmires lösning extraherades i NatureMetrics Lts laboratorier i London och följe Spens m.fl. (2017). Enzymet Proteinase K tillsattes direkt in i filterkapsylerna, som sedan lyserades i 56 °C över natten.

Elueringen utfördes enligt den tekniska rapporten del 2.

B2.2 Metabarkodning PCR

För alla analyser gäller följande; varje PCR-prov utförs i 12 replikat som samman-slås under bioinformatiken. Som positiv laboratoriekontroll används ett prov med känd artsammansättning av tropiska fiskar som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyseras för att säkerhetsställa kvaliteten och tillförlitlighet av resultat. Från ett och samma eDNA-prov kan flera analyser på olika taxa analyseras parallellt. Observera att proverna inte kan sekvenseras samtidigt eftersom PCR-produkterna varierar i längd mellan markörer. Sekvenseringsprotokoll och bioinformatik anges i Kačergyté m.fl. (2021).

B2.2.1 Fisk

Flerartsanalyserna för fisk genomfördes med en markör som läser en hypervariabel 175 bp region på 12S-rRNA genen enligt protokoll av Miya, m.fl. (2015). Ett undantag i protokollet var att det andra basparet på framåt-primern byttes ut för att matcha europeiska fiskar och vidare anpassades 5' delen av primern med ett överhäng för att matcha Illumina Nextera Index markörer (för full beskrivning se Kačergyté m.fl. 2021, överhäng förklaras på NGI websidan (National Genomics Infrastructure, Illumina 16S)). Strålfeniga fiskar, Actinopterygii, skiljer sig genetiskt från nejonöga som hör till Hyperoartia (Kraniedjur). För att detektera artkomplextet innebär degenererade primers ett problem och alternativet är att följa principerna för modifierade primers enligt Miya m.fl. (2020).

B2.2.2 Vertebrater (inkl. groddjur och fisk)

Flerartsanalyserna för groddjur använde en vertebratmarkör (Riaz m.fl. 2011 och Kelly m.fl. 2014) som täcker groddjursdiversiteten men även detekterar däggdjur samt fiskar och delvis fåglar (inte fullständigt). Markören läser en 195 bp region på 12S genen. Protokollet följde Hänfling m.fl. (2016) och bioinformatiken anpassades för markören. Protokollet och källor finns nämnda ovan.

B2.2.3 Stormusslor (Unionidae)

Stormusslor inom Unionidae analyserades med ett markörpar för Unionidae i Prié m.fl. (2021) som läser en ca 125 bp hypervariabel region på 16S genen.

B2.3 Bioinformatik och verifiering

Varje enskild art har en unik streckkod eller DNA-sekvens. De unika sekvenserna jämfördes med en internationell databas (tillgänglig för allmänheten, som grundar sig på GenBank och upprätthålls av *National Center for Biotechnology Information*, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) där sekvenser på närmare 504 000 kända arter finns tillgängliga med 2,5 miljard sekvenser och 15,3 triljoner baspar enligt GenBank och NCBI hemsida (Sayers, m.fl. 2022). De olika sekvenserna matchades i första hand mot NCBI-databasen och fick på så sätt fram arternas identitet. Vidare används en kurierad (vilket betyder att arterna som används för referens-DNA är verifierade av en auktoriserad taxonom) intern databas. Tack vare nya framsteg inom metabarkodning för vertebrater och evertebrater är det möjligt att få träffar på artnivå istället för enbart familje- eller genusnivå. Antalet läsningar per art ger en relativ uppskattning (relativ biomassa) av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov.

Bioinformatiken för samtliga taxa finns även beskrivet i Kačergytė m.fl. 2021 där flödesschemat är anpassat för markörerna.

B3 Källhänvisning

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

Kačergytė, I., Petersson, E., Arlt, D., Hellström, M., Knape, J., Spens, J., Žmihorski, M. & Pärt, T. (2021). Environmental DNA metabarcoding elucidates patterns of fish colonisation and co-occurrences with amphibians in temperate wetlands created for biodiversity. *Freshwater Biol.* 66, 1915–1929.

Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Crowder LB (2014) Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm. *PLoS ONE* 9(1): e86175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086175>

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ... & Kondoh, M. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088.

Miya, M., Gotoh, R.O. & Sado, T. (2020). MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fish Sci* 86, 939–970 (2020).

NCBI websida <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Prié, V., Valentini, A., Lopes-Lima, M., Froufe, E., Rocle, M., Poulet, N., ... & Dejean, T. (2021). Environmental DNA metabarcoding for freshwater bivalves biodiversity assessment: methods and results for the Western Palearctic (European sub-region). *Hydrobiologia*, 848(12), 2931–2950.

Riaz T, Shehzad W, Viari A, Pompanon F, Taberlet P, et al. (2011) ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 39: e145.

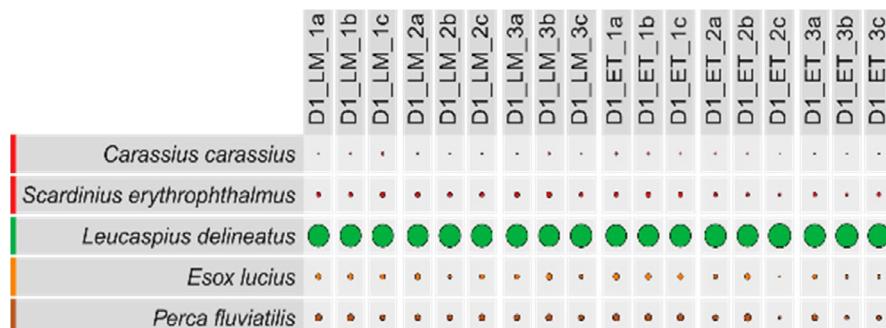
Sayers, E.W., ..., Karsch-Mizrachi, I. (2020). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 48: D84-D86.

Spens, J., A. R. Evans, ... M. Hellström. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635–645.

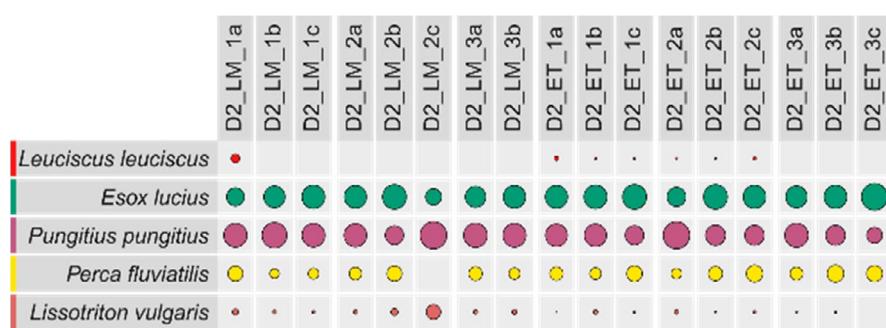
National Genomics Infrastructure, Illumina 16S. <https://ngisweden.scilifelab.se/methods/illumina-16s-sequencing/>

Bilaga 2 Artdetektion över tid för olika konserveringsmetoder

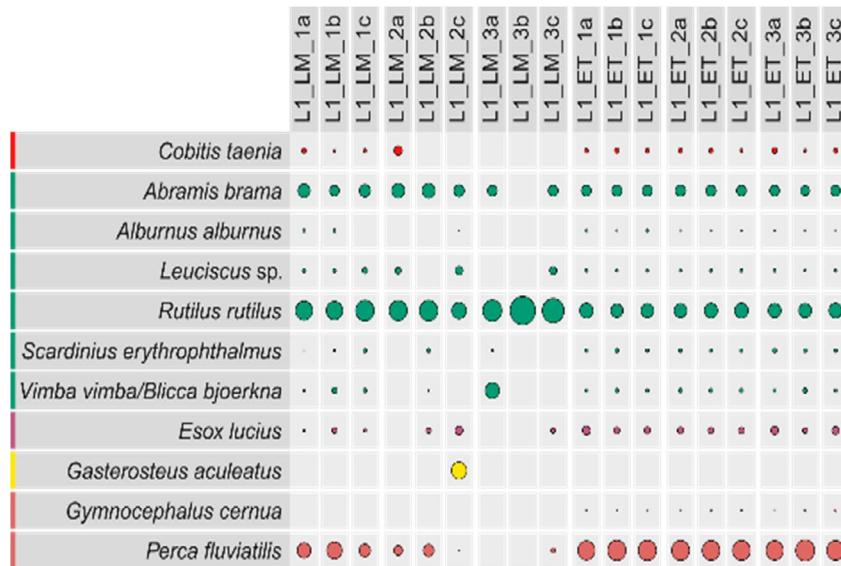
Kapitel 6 jämförde detektionskänslighet i eDNA prover beroende på konservering och uppbevaring av prover över tid. Rådatat är presenterat som bubbeldiagram i denna bilaga. Den relativa biomassan anger hur många gånger en sekvens av en art blivit läst (kolumner). Ju fler gånger en art registrerats under sekvenseringen desto större närvaro har arten i provet. Detta kallas relativ biomassa och kan anges i bubbeldiagram. Varje kolumn visar hur många procent en art är läst av totalt 100 %. A-C representerar varje replikat. LM anger Longmire's lösning och ET etanol. Siffrorna efter provnamnen anger tid mellan insamling och extraktion av prov – 1a–1c: 3 veckor, 2a–2c: 3 månader; 3a–3c mer än 6 månader.



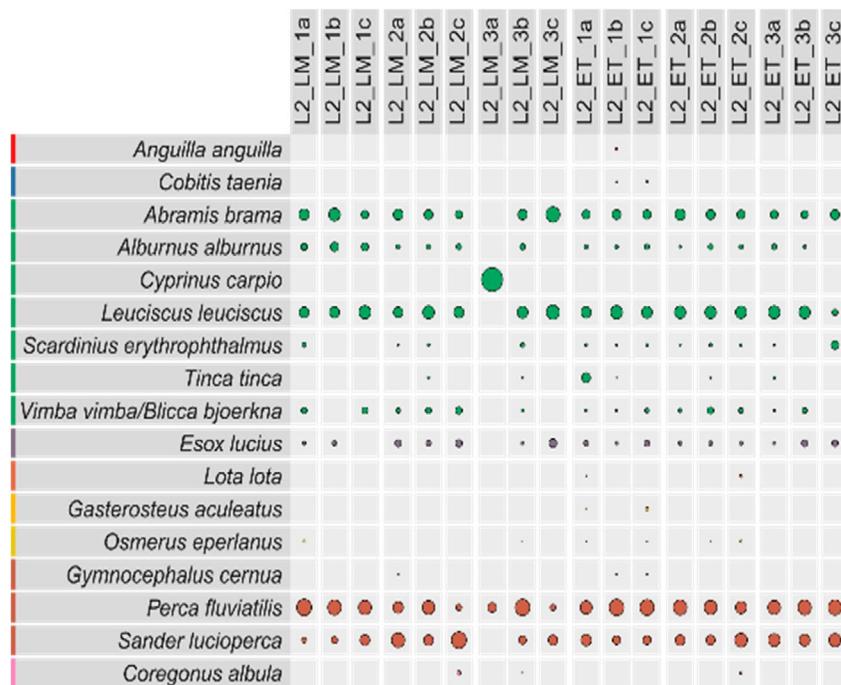
Figur B2-1. Bubbeldiagram. Artdetektion i våtmark D1 (Malmö). Notera att alla prover som bevarades i LM extraherades samtidigt vilket betyder att proverna i LM representerar en enda tidpunkt. (Cuong Tang).



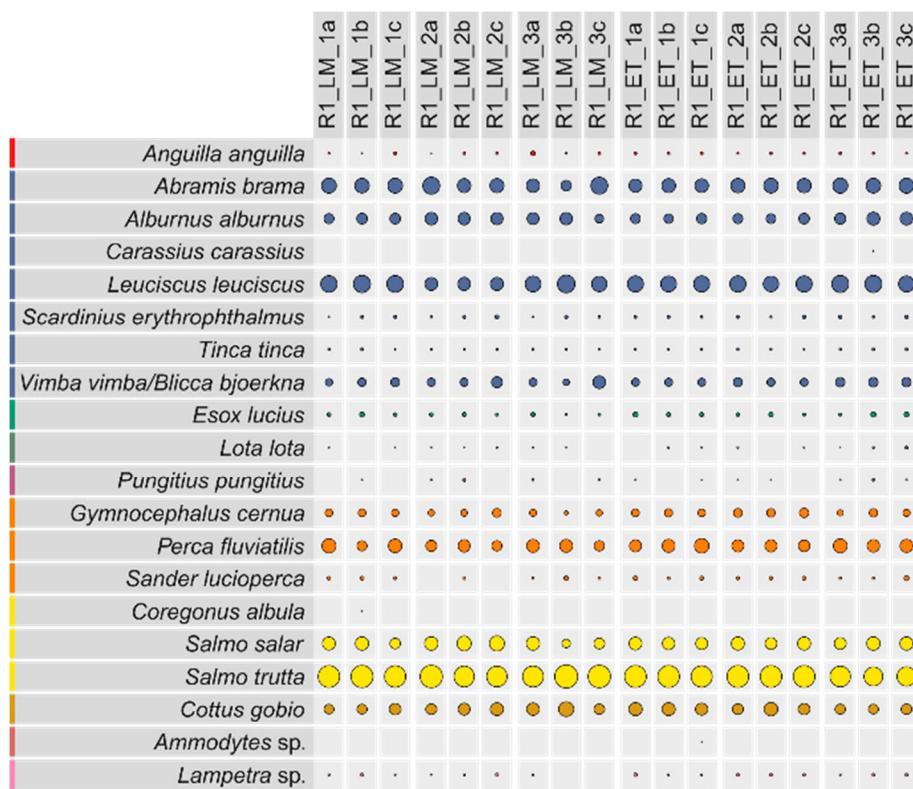
Figur B2-2. Bubbeldiagram. Artdetektion i våtmark D2 (Harg). (Cuong Tang).



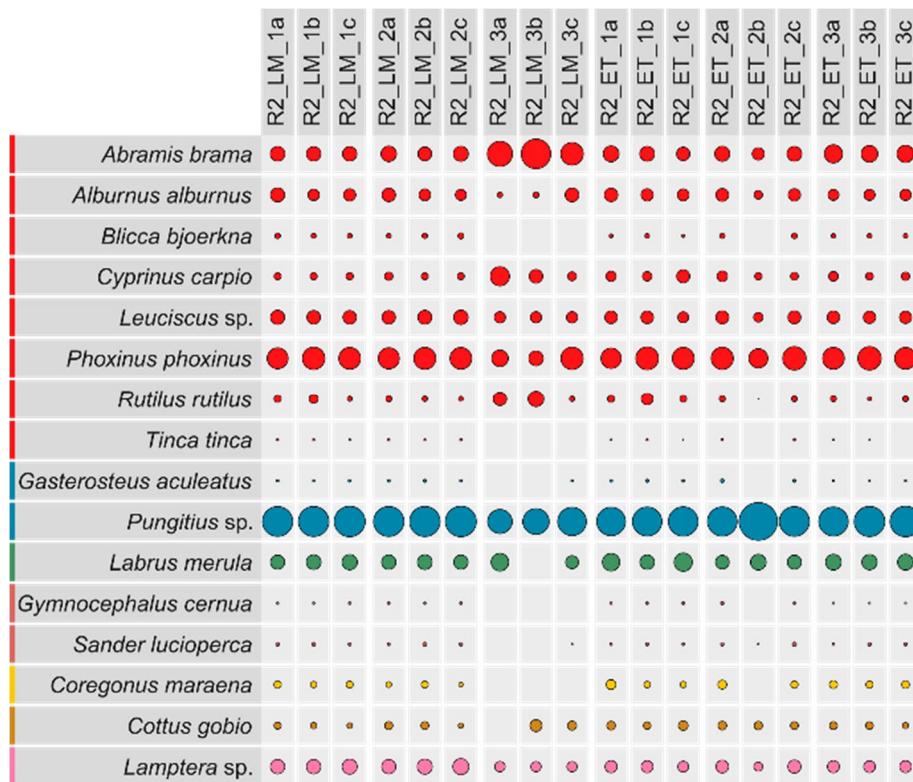
Figur B2-3. Bubbeldiagram. Artdetektion i Sjön Dunkern (L1). (Cuong Tang).



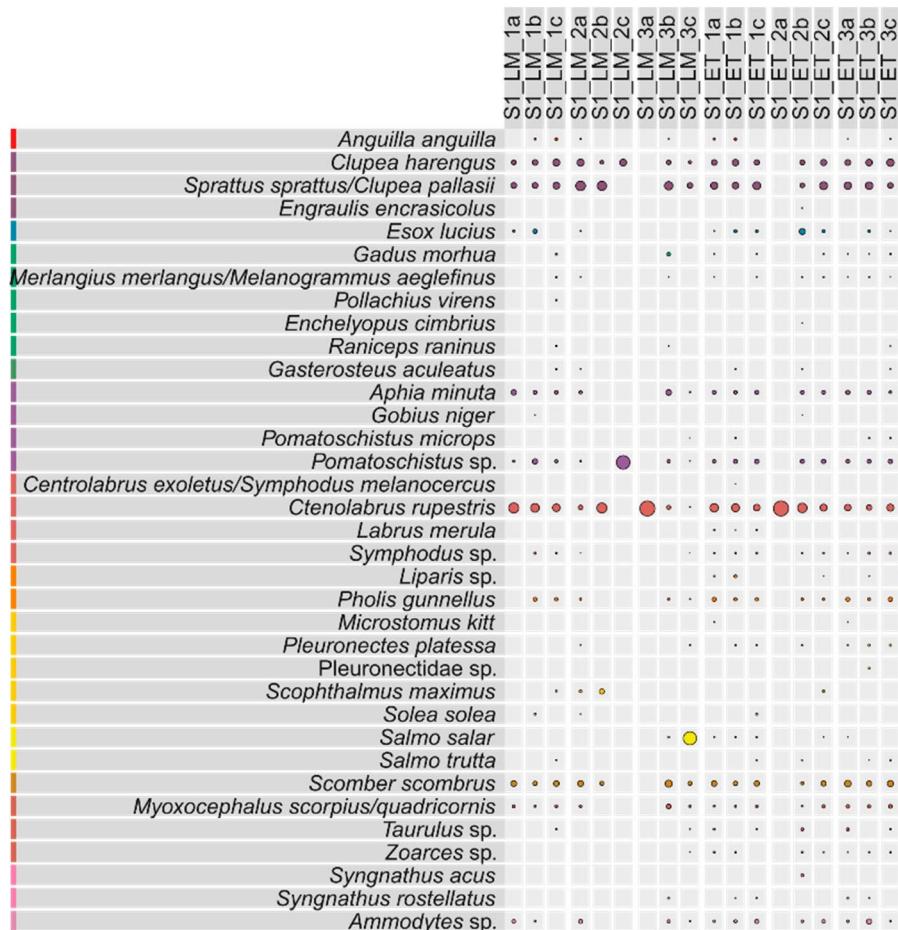
Figur B2-4. Bubbeldiagram. Artdetektion i Ekoln i sjön Mälaren (L2). (Cuong Tang).



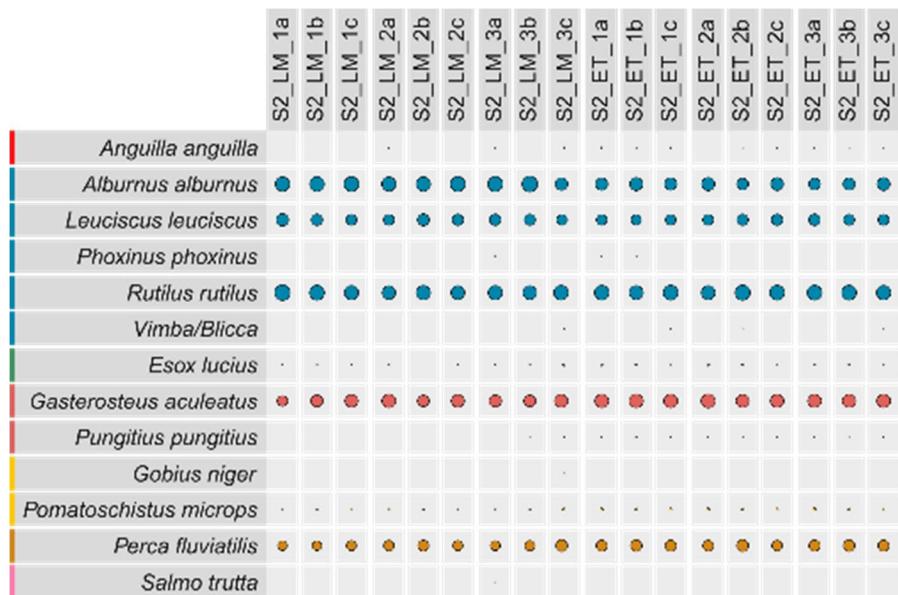
Figur B2-5. Bubbeldiagram. Artdetektion i Dalälven (R1). (Cuong Tang).



Figur B2-6. Bubbeldiagram. Artdetektions i älven Ätran på svensk västkusten. (Cuong Tang).



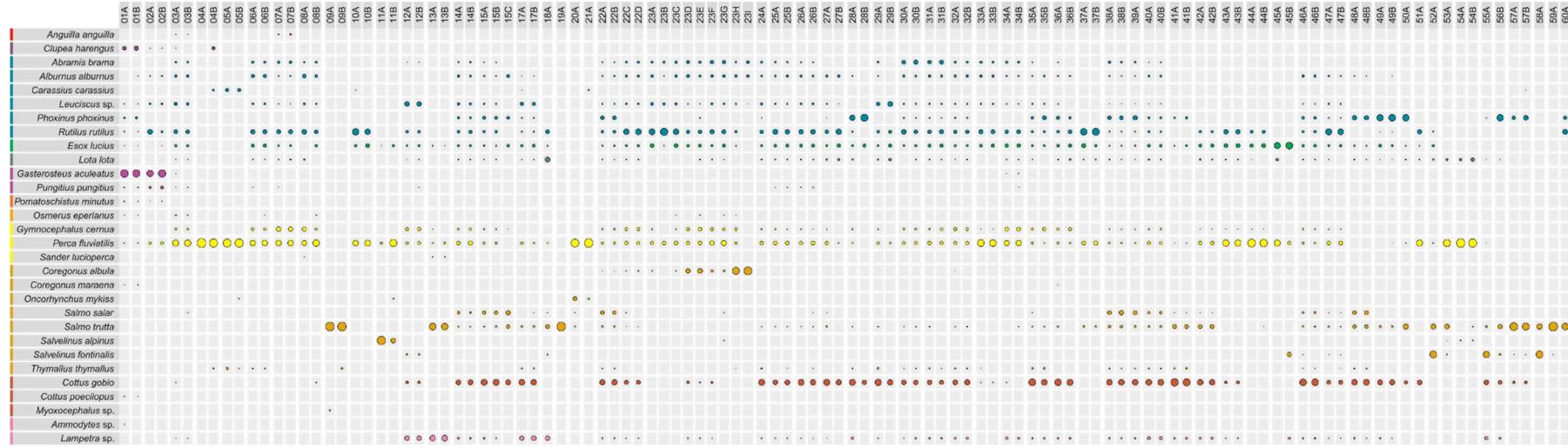
Figur B2-7. Bubbeldiagram. Marin miljö. Lokal S2 (Karlskrona innerskärgård). (Cuong Tang).



Figur B2-8. Bubbeldiagram. Artedetektion i marin miljö S1 vid Tjärnö på västkusten. (Cuong Tang).

Bilaga 3 Arternas förekomst i Moälvens avrinningsområde

Figur B3-1 baserat på kapitel 8 visar fiskarternas förekomst och dominans inom Moälvens avrinningsområde.



Figur B3-1. Arternas dominans inom de olika provtagningslokalerna. Den relativt biomassan anger hur många gånger en sekvens av en art blivit läst (kolumner). Varje kolumn visar hur många procent en art är läst av totalt 100 %. (Cuong Tang).

Rapporten uttrycker närväntigtvis inte
Naturvårdsverkets ställningstagande.
Författaren svarar själv för innehållet
och anges vid referens till rapporten.

LifeDNAquatic:

Riktlinjer för optimal hantering och analys av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöövervakning

Projektet LifeDNAquatic har undersökt hur eDNA kan användas som verktyg inom den svenska miljöövervakningen.

DNA-baserade metoder för att detektera och identifiera arter har under det senaste decenniet öppnat upp för nya möjligheter att inventera biologisk mångfald, där fokus har legat på akvatiska ekosystem.

Undersökningsmetoden baserar sig på att alla levande organismer, både växter och djur, kontinuerligt avger genetiska fotavtryck i miljön. Akvatiskt eDNA är genetiska spår som organismer avger till vattenmiljön. Detta genetiska material kan utvinnas ur ett vattenprov och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig i ett givet område utan att man vare sig ser eller fångar organismen.

Projektgruppen inom LifeDNAquatics byggde vidare på existerande kunskap för att utveckla metoder för fältinventering, behandling och lagring av prover från olika akvatiska miljöer. Vidare utfördes fältundersökningar som jämförde hur olika konserveringsmetoder och årstider påverkar resultaten, vilka även jämfördes med konventionella provtagningsmetoder. Projektet fokuserade på fisk som taxonomisk grupp.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag som finansierar forskning till stöd för Naturvårdsverkets och Havs- och vattenmyndighetens kunskapsbehov.