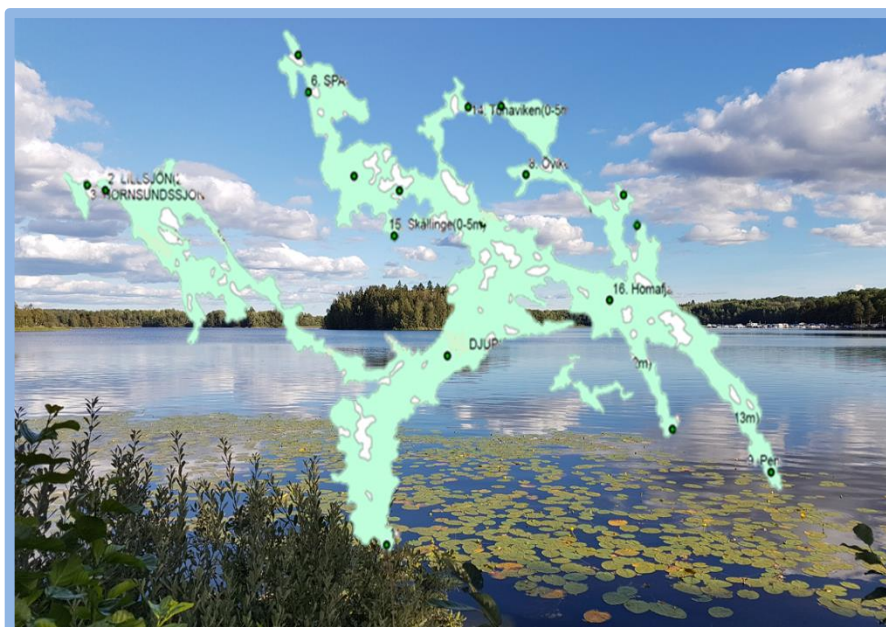


Inventering av fiskförekomst med eDNA, i sjön Båven, Sörmlands län.

AquaBiota Rapport 2018:14

Författare: Micaela Hellström, Johan Spens



AquaBiota

AquaBiota Report 2018:14

STOCKHOLM, NOEMBER 2018

Beställare:

Undersökningen är utförd av AquaBiota Solutions för Nyköpingsåarnas Vattenvårdssförbund

Författare:

Micaela Hellström (micaela.hellstrom@aquabiota.se), Johan Spens (johan.spens@aquabiota.se)

Figurer:

Omslagsfigur; Vy över Båven från Sparreholm, karta över Båven (Micaela Hellström)

Kontaktinformation:

AquaBiota Solutions AB
Adress: Löjtnantsgatan 25, 115 50 Stockholm
Tel: +46 8 522 302 40
www.aquabiota.se

Kvalitetsgranskad av:

Nicklas Wijkmark (nicklas.wijkmark@aquabiota.se), Johan Näslund (johan.naslund@aquabiota.se)

Distribution:

Fri

Internetversion:

Nedladdningsbar hos www.aquabiota.se Inventering av fiskförekomst med eDNA, i sjön Båven, Sörmlands län

Citera som:

Hellström, M & Spens., J. eDNA Inventering av fiskförekomst med eDNA, i sjön Båven, Sörmlands län. AquaBiota Rapport 2018:14. 13 s. ISBN: 978-91-85975-83-9

Ämnesord: eDNA, Fiskfauna, Båven, Sörmlands län, mal

AquaBiota Rapport 2018:14

Projektnummer:

ISBN: 978-91-85975-83-9

ISSN: 1654-7225

© AquaBiota Solutions 2018



INNEHÅLL

Innehåll.....	3
Sammanfattning.....	5
1. Inledning	6
2. Material och Metoder	7
2.1. Fältarbete.....	7
2.2. Laboratoriearbete.....	9
2.2.1 Extraktion, PCR och sekvensering	9
2.2.2 Bioinformatik och verifiering	9
3. Resultat och diskussion.....	10
3.1 Sekvenseringsresultat.....	10
3.2 Fiskarternas förekomst – sammanlagd översikt.....	10
3.3 Fiskarternas förekomst – rumslig översikt	11
3.4 eDNA kvalitetskontroll.....	13
Tack	13
Referenser	14
Bilaga 1 Enarts och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar.....	15
Bilaga 2 Kvalitetssäkring av eDNA	16
Bilaga 3 Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser	17
Bilaga 4 Resultat – Kvalitetskontroller	18

SAMMANFATTNING

Akvatiskt miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) har under det senaste decenniet visat sig vara ett lovande verktyg för inventering av vattenorganismer för miljöövervakning. Undersökningsmetoden baserar sig på det faktum att alla levande organismer, både växter och djur, kontinuerligt avger genetiska avtryck i miljön i form av slem, avföring, svett och döda celler. Dessa genetiska spår kallas eDNA. Akvatiskt eDNA är spåren som organismer avger i vattenmiljön. eDNA kan utvinnas ur en halv liter vatten och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område utan att man varken ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat ger analyserna en figur av artförekomst i nutid.

I maj 2018 utförde AquaBiota på uppdrag av Nyköpingsåarnas Vattenvårdsförbund eDNA inventering av fiskarternas förekomst i sjön Båven i Sörmlands län. Tjugo vattenprover från olika lokaler samlades in för undersökningen.

I sjön påträffades 18 fiskarter, däribland mal som under provtagningstidpunkten tydligt hade sökt sig till grundare vatten för att föröka sig. Arter som är svårfångade i provfisken påträffades i sjön. Vidare detekterades 9 fågelarter samt 9 däggdjursarter som vistats vid sjön.



Lokal 13. (Foto: Micaela Hellström)

1. INLEDNING

Undersökningsmetoden miljö-DNA eller eDNA (environmental DNA) baserar sig på det faktum att alla levande organismer, -både växter och djur, -kontinuerligt avger genetiska fotavtryck i miljön i form av slem, avföring, respiration, svett och döda celler (Pedersen m.fl. 2015). Definitionen på eDNA anges som; "det DNA som kan studeras från dessa spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet" (Taberlet m.fl. 2012). I akvatiska miljöer kan detta material utvinnas ur små mängder vatten och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område, utan att man varken ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat (ca. 1-2 veckor) ger analyserna en bild av artförekomst i nutid. eDNA har visat sig ha en stor potential som verktyg för inventering av vattenorganismer (Bohmann m.fl. 2014, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017). Vidare har flera studier visat att eDNA i sjöar och rinnande vatten detekterar flera arter än vad provfisken gör (Hänfling m.fl 2016, Hellström & Spens 2017 a, b, c, Hellström m.fl 2018)

I maj 2018 utförde AquaBiota på uppdrag av Nyköpingsåarnas vattenvårdsförbund en eDNA inventering fiskars förekomst i sjön Båven, Sörmlands län med fokus på sjöns fiskfauna. Undersökningens syfte var att få en bild av vilka arter som finns i Båven, speciellt med tanke på den kommande förändringen i sjöns utlopp vid Sibro, där dämnet planeras att tas bort och fria fiskvägar upp och ner för både starksimmande och svagsimmande arter kommer att byggas inom en närstående framtid.



Lokal 1 och 6. (Foto: Micaela Hellström)



Lokal 13. (Foto: Micaela Hellström)

2. MATERIAL OCH METODER

2.1 Fältarbete

Fältarbetet utfördes 21-23 augusti 2018. Provtagningspunkter anges i figur 1 och i tabell 1. Koordinaterna anges som decimalgrader i WGS84. Lufttemperaturen mätte 18-25 °C. Provpunkternas position bestämdes i samråd med uppdragsgivaren. Djupet varierade mellan 0,5 och 40 meter.

Innan provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria engångsförpackningar. På de grunda lokalerna samlades 6 liter vatten in i form av 10 stycken underprover 50 ml i vardera riktningen från provpunkten. På djupare djupa lokaler hämtades 1 x 7 liter vatten med Ruttnerhämtare (Figur 2.). Vattnet blandades och filtrerades. För småvattnen samlades 5 underprover in. Negativa fältkontroller utgjordes av rent vatten som filtrerades på plats för att utesluta kontaminering av DNA mellan prover eller från provtagare. Insamling och fixering följde Spens m.fl. (2017).



Figur 1. Karta över provtagningslokalerna. Projektion WGS84.



Figur 2. Vänster till höger; Ruttnerhämtare, samt skeppare K-J Sköld & C Dernelid

Tabell 1. Provpunkter. Position, djup vid provtagningen, vattentemperatur och volym filtrerat vatten (mL). Proven samlades in 21–23, samt 26 augusti 2018.

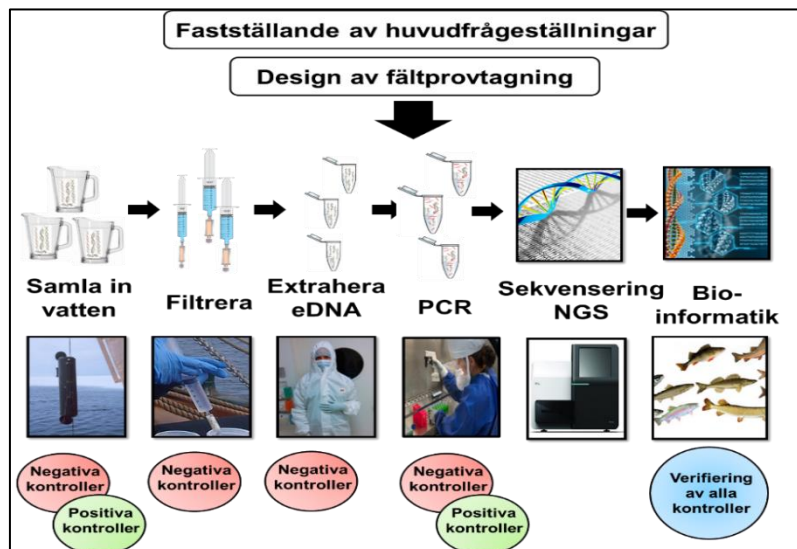
Provpunkt namn	Latitud (N)	Longitud (Ö)	Djup	H ₂ O °C	Volym (mL)
1. Kvarnsjön	59.058531	16.731029	0,5	22,0	3000
2. Lillsjön	59.047709	16.706986	0,5	19,9	3000
3. Hornsundssjön	59.052617	16.690559	0,5	22,1	1200
4. Torparviken	59.083126	16.831636	0,5	19,1	3000
5. Edebysjön	59.007194	17.011094	0,5	19,2	3000
6. Sparreholm marina	59,073576	16,837271	0,5	19,3	2400
7. Boxtorp	59.085903	16.829953	7,5	24,0	3000
8. Öviken	59.05318	16.97466	17,5	17,5	3000
9. Penningbyviken	58,972034	17,126085	0,5	20,5	3000
10. Tyviken	58,984019	17,063877	7,0	17,5	2730
11. Båven Utlopp, Sibro	58.951355	16.883378	0,5	18,5	3000
12. Vräksudden	59,046263	17,034927	5,4	19,5	3000
13. Ullabergsviken	59,04884	16,89816	8,3	16,0	3000
14. Tunaviken	59,070345	16,936786	0,5	20,5	3000
15. Skällinge	59.036995	16.890954	0,5	20,0	3000
16. Hornafjärden	59,018515	17,025111	17,0	16,5	4500
17. Rockelstafjärden	59.05421	16.86594	34,5	8,5	3000
18. Fiskarbol	59,034915	16,740022	40,5	7,5	360
19. Hassö, sund	59.04884	16.89816	0.5	20,0	3000



Figur 3. Filtrering i fält (t.v.). redo för eDNA extraktion (t.h.) (Foto Vivan Hellström, Jessica Sjöstedt)

2.2 Laboratoriearbete

2.2.1 Extraktion, PCR och sekvensering



Figur 3. Flödesschema som visar de olika stegen för eDNA undersökningar. (Figur: Micaela Hellström)

Flödesschemat i figur 3 beskriver eDNA-processen från insamling till analys. eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Detta kunde ske genom ett exklusivt samarbete med MoRe Research i Örnsköldsvik. Extraktionerna utfördes av molekylärbiologiska tekniker som är tränade i att extrahera eDNA. Proverna analyserades med flerartsanalyser för förekomst av fisk (bilaga 2) samt andra vertebrater. Varje PCR prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs under bioinformatiken. Två modifierade markörer som amplifierar 12S rDNA regionen användes (Kelly m.fl. 2014, Miya m.fl. 2015). Principerna för metabarkodning förklaras mer utförligt i bilaga 1. Vidare användes en positiv DNA kontroll med känd artsammansättning som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyserades för att säkerhetsställa kvalitetskrav (bilaga 2).

2.2.2. Bioinformatik och verifiering

Varje enskild art har en unik streckkod (Se bilaga 1) eller sekvens. Varje unik sekvens fick en molekylär identitet. De olika sekvenserna kördes mot 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 mer än 370 000 kända arter finns tillgängliga (Benson m.fl. 2017, bilaga 1) med 0,6 miljarder sekvenser och 2,6 biljoner baspar enligt NCBI:s hemsida. De olika sekvenserna matchades mot databasen och fick på så sätt fisk, däggdjurs och groddjurs identitet. Tack vare nya framsteg inom metabarkodning för fisk är det möjligt att få träffar på artnivå istället för enbart familje- eller genus- nivå. Antalet läsningar per art gav en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekom i ett prov.

3. RESULTAT OCH KONKLUSION

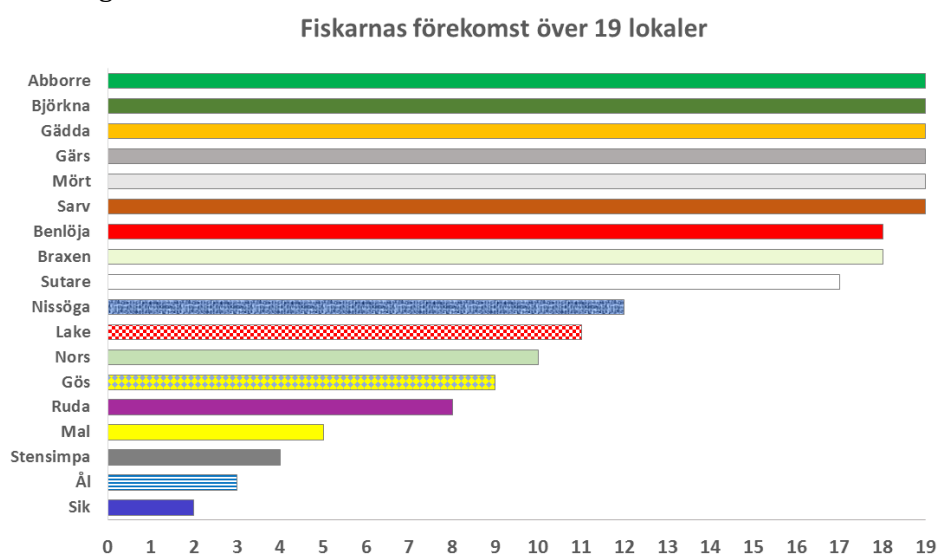
3.1. Sekvenseringsresultat

I denna studie matchade 96,3 % och 57 % av läsningarna målarterna fiskar, fåglar, groddjur och däggdjur med respektive Miya och Kelly markörer. Detta därför att den sistnämnda mera generellt detekterar ryggradsdjur och är mindre specifik. Resultaten anges i bilaga 4.

3.2. Arternas förekomst – sammanlagd översikt

Sammanlagt 18 fiskarter påträffades i eDNA analyserna. Figur 4 anger arternas förekomst över lokalerna. De vanligaste arterna var abborre, björkna, gädda, gärs, mört och sarv. Det bör även noteras att Båven är en mycket stor sjö och 20 stycken analyserade prov detekterade många arter, men flera prover kan behövas för att med precision ange var i sjön de olika arterna befinner sig.

Vidare detekterades 9 däggdjursarter; mink, bäver, vattensork, skogsmus, vanlig näbbmus, älg, dovhjort, rådjur och röd ekorre. Fåglar som befunnit sig vid provlokalerna var knölsvan, storskarv, gråhäger, nötskrika, storlom, trana, mås, rödhake, fasan och vattenrall. Notera att studien fokuserade på fisk och därför är listorna på de övriga arterna inte fullständig.



Figur 4. Antal lokaler där de enskilda fiskarterna påträffades.

3.3. Fiskarternas förekomst – rumslig översikt

Fiskarternas förekomst och dominansförhållanden i Båven anges i tabell 2 och 3 samt fynd av mal anges i figur 5. Antalet fiskarter per lokal varierade mellan 8 och 14 och totalt 18 arter som tillhör sjön Båven detekterades.

Tabell 2. Fiskarternas förekomst på de olika lokalerna. BV_01 – BV_19 anger lokalerna. De djupa provpunkterna anges i rött

ART; Svenska (latin)	Abborre (<i>Perca fluviatilis</i>)	Benlöja (<i>Alburnus alburnus</i>)	Björkna (<i>Blicca bjoerkna</i>)	Braxen (<i>Abramis brama</i>)	Gädda (<i>Esox lucius</i>)	Gärs (<i>Gymnocephalus cernua</i>)	Gös (<i>Sander lucioperca</i>)	Lake (<i>Lota lota</i>)	Mal (<i>Silurus glanis</i>)	Mört (<i>Rutilus rutilus</i>)	Nissöga (<i>Cobitis teania</i>)	Nors (<i>Osmerus eperlanus</i>)	Ruda (<i>Carassius carassius</i>)	Sarv (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	Sik (<i>Coregonus maraena</i>)	Stensimpa (<i>Cottus gobio</i>)	Sutare (<i>Tinca tinca</i>)	Ål (<i>Anguilla anguilla</i>)	Antal arter per lokal
LOKAL																			
BV_01	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x		x	x			x		13
BV_02	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x		x	x			x		13
BV_03	x	x	x	x	x	x			x	x				x			x		10
BV_04	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x			x			x		12
BV_05	x	x	x	x	x	x	x			x	x		x	x			x		12
BV_06	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x			x		14
BV_07	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x			x			x	x	13
BV_08	x		x		x	x	x			x		x		x				x	8
BV_09	x	x	x	x	x	x		x		x	x	x		x		x	x		13
BV_10	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x		x		x	x		14
BV_11	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x		x		x	x	x	12
BV_12	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x			x	x	13
BV_13	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x			x		13
BV_14	x	x	x	x	x	x		x		x	x		x	x			x		12
BV_15	x	x	x	x	x	x				x				x			x		9
BV_16	x	x	x	x	x	x	x	x		x		x		x	x		x		13
BV_17	x	x	x	x	x	x				x		x		x			x		10
BV_18	x	x	x	x	x	x		x		x		x		x	x				11
BV_19	x	x	x	x	x	x		x		x	x	x	x	x		x	x		14

Sik (*Coregonus maraena*) påträffades enbart på de djupa provlokalererna, vilket beror på att ytvattnet var varmt och flera arter som föredrar kallare vatten befinner sig på större djup under de varma månaderna.

Mal (*Silurus glanis*) påträffades på 5 grunda lokaler i närheten av Sparreholm och Skebokvarn (Figur 5). Malen är rödlistad i Sverige och finns i tre vattensystem i landet, av vilka Nyköpingsåarnas avrinningsområde som sjön Båven hör är ett av systemen. Malen är världens största sötvattensfisk och kan väga över hundra kilo. Uppföljning av malens förekomst är viktig, speciellt för underlag för förändringar i miljön samt för åtgärdsprogram. Malen söker sig till grundare vatten för att föröka sig och har rapporterats fortplanta sig då vattnet är 22-25°C.

Tabell 3. Antalet eDNA läsningar per art inom de olika provlokalerna. Siffrorna anger hur många gånger en sekvens blivit läst på artnivå och anger relativ biomassa. Resultaten av vertebrat markören redovisas. *) sekvenser som enbart detekterades med fiskspecifik markör

ART; Svenska (latin)	Abborre (<i>Perca fluviatilis</i>)	Benlöja (<i>Alburnus alburnus</i>)	Björkna (<i>Blicca bjoerkna</i>)	Braxen (<i>Abramis brama</i>)	Gädda (<i>Esox lucius</i>)	Gärs (<i>Gymnocephalus cernua</i>)	Gös (<i>Sander lucioperca</i>)	Lake (<i>Lota lota</i>)	Mal (<i>Silurus glanis</i>)	Mört (<i>Rutilus rutilus</i>)	Nissöga (<i>Cobitis taenia</i>)	Nors (<i>Osmerus eperlanus</i>)	Ruda (<i>Carassius carassius</i>)	Sarv (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	Sik (<i>Coregonus maraena</i>)	Stensimpa (<i>Cottus gobio</i>)	Sutare (<i>Tinca tinca</i>)	Ål (<i>Anguilla anguilla</i>)	Antal arter
LOKAL																			
01	40192	9335	33649	13194	3513	6650		72	468	3103	48		59	15444			10796		13
02	91743	3029	6680	57131	22812	12089		609	1890	14098	257		1322	9734			4696		13
03	80204	1487	37819	34610	4196	2416			416	23165				21086			19971		10
04	53453	4269	10047	4293	2784	3085		68	351	2255	85			51387			34380		12
05	21384	61742	5286	15091	9081	1026	606*			8742	51		272	26478			3863		12
06	49807	18233	5144	18088	1941	68748	728*	4405	35	14378	181		72	3037			1749		14
07	3641	711	1364	3277	406	920	414*	255*		7020	129*			591			581	350*	13
08	1441		66		822	551	517*		72	254		3141		51					8
09	43396	3713	443	12289	4138	865			72	12441	485*	74		21466		108	1440		13
10	34533	2342	344	5174	14075	4032	5435*	168		9457	298	57		981		330	360		14
11	4500	77342	191	977	6229	413	593*			2437		135		627		116	196	63*	12
12	12040	4503	3630	5215	796	344	681*			4743	92	175	77	1480			2475	652*	13
13	9487	2672	1533	5541	1817	2216	1268*			6601	176	127	76	2524			2005		13
14	63645	4690	4117	8865	2038	3426		433		31877	99		745	58684			9886		12
15	40596	1008	286	1367	416	5003				4106				4993			146		9
16	5656	774*	27	190	6771	5266	4084*	188*		812		7503		261	115		50		13
17	16995	1050	1270	8655	20995	848				1434		75		585			213		10
18	5253	1370*	61	5618	3563	1688		1241		2848		27007		59	6582				11
19	49134	29259	5453	12437	4054	3711		131		38848	66	235	140	3444		520	2991		14
Tot																			
alt	627100	227529	117410	212012	110447	123297	14326	7642	3160	188619	1967	38529	2763	222912	6697	1074	95798	1065	



Figur 5. Lokaler där mal (*Silurus glanis*) påträffades. (Foto Christer Dernelid)

Då denna studie utfördes hittades mal i grunt vatten mellan 19 och 22 °C. På två lokaler har malens närvaro antagits men inte verifierats. Vidare rapporterade lokala fiskeentusiaster fynd av mal i juli månad i flera delar av Båven under nattetid.

Den fridlysta Europiska ålen (*Anguilla anguilla*) detekterades på tre lokaler i nordöstra Båven, samt vid Båvens utlopp. Lokala fiskeförmågor samt länsstyrelsen i Sörmland verifierade att glasålar lagts ut i Båven.

Strömning påträffades vid några lokaler. Dessa fynd är ett resultat som verifierades som av rester från surströmmingsfester som försiggicks dagen före provtagningen. Detta visar att även människoföda kan påträffas i eDNA prover. Strömningen togs bort från analyserna.

För fortsatta undersökning är det relevant att inventera Båvens fiskfauna, speciellt före och efter åtgärder. Vidare är eDNA en lämplig metod för undersökningar av sötvattensmusslor av vilka flera är hotade och är goda indikatorer för Båvens ekologiska status.

Resultaten från eDNA studier har flera praktiska användningsområden så som detektion av sällsynta arter, jämförelse av flora och fauna före och efter åtgärdsprogram, samt intresse för sportfiskare som har nytta av att veta vilka arter som befinner sig i sjön.

3.4. eDNA kvalitet samt kvalitetskontroll

Kvalitetskontrollerna samt mängden följer direktiven i bilaga 3 och anges i bilaga 4.

TACK

Ett stort tack till Jerry Persson, vattenrådgivare vid Nyköpingsåarnas Vattenvårdsförbund, för diskussioner innan provtagningen, engagemang och samordnandet av två föredragskvällar om eDNA i Båven. Tack till alla er som bor runt Båven för vänligt bemötande, tillstånd att gå över era marker och många fiskediskussioner. Ett stort tack till Karl Johan Sköld och Christer Dernelid för att ni lånade både er tid och era båtar för provtagning på de djupa lokalerna. Tack till Anders Helander och Vivan Hellström för assistens med fältarbetet på lokal 3 och 4.

REFERENSER

- Bohmann, K., A. Evans, M. T. P. Gilbert, G. R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, D. W. Yu, och M. de Bruyn. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 29:358 – 367.
- Deiner, K., H. M. Bik, E. Mächler, M. Seymour, A. Lacoursière-Roussel, F. Altermatt, S. Creer, I. Bista, D. M. Lodge, N. de Vere, M. E. Pfrender, och L. Bernatchez. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26:5872-5895.
- Hellström, M & Spens, J.** 2017 a. eDNA - Fiskförekomst i 10 kustmynnande vattendrag, Norrbottens län AquaBiota Rapport 2017:10. 30 sid. ISBN: 978-91-85975-67-9
- Hellström, M & Spens J.** 2017 b. eDNA - Fiskinventering vid Spjutmo kraftverk. AquaBiota Rapport 2017:12. 29 sid. ISBN: 978-91-85975-69-3
- Hellström, M & Spens J.** 2017 c. eDNA - Fiskinventering vid Spjutmo kraftverk. AquaBiota Rapport 2017:12. 29 sid. ISBN: 978-91-85975-69-3
- Hellström, M., Wijkmark N & Spens, J.** 2018. Fisk inventering med hjälp eDNA i Ore Älv, Dalarnas län. AquaBiota Rapport 2018:11. 23 sid. ISBN: 978-91-85975-80-8
- Hänfling, B., L. Lawson Handley, D. S. Read, C. Hahn, J. Li, P. Nichols, R. C. Blackman, A. Oliver, och I. J. Winfield. 2016. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*
- Kelly, R.P., Port, J.A., Yamahara, K.M. och L.B. Crowder. 2014. Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PloS One* 9 (1): e86175
- Leese, F., Altermatt, F., **Hellström M.**,+ 103 authors & Stenke, D (2016). DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Research Ideas and Outcomes (Rio)*, 2, e11321.
- 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.
- Olds, B. P., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Li, Y., Evans, N. T., Turner, C. R., ... Shirey, P. D. (2016). Estimating species richness using environmental DNA. *Ecology and Evolution*, 6, 4214–4226.
- Pedersen, M. W., S. Overballe-Petersen, L. Ermini, C. D. Sarkissian, J. Haile, M. **Hellstrom, J. Spens**, m.fl. 2015. Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 370:20130383
- Spens, J.**, A. R. Evans, D. Halfmaerten, S. W. Knudsen, M. E. Sengupta, S. S. T. Mak, E. E. Sigsgaard, och **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
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793

Författarnamn i **fet stil** anger medarbetare på AquaBiota

Bilaga 1. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar

Varje levande art utsöndrar genetisk arvs massa eller DNA i sin omgivning genom respiration, rörelser, filtrering, avföring, döda hudceller osv. Detta DNA som lämnas kvar i miljön utan att individen i sig provtas kallas miljödDNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA).

Vissa delar av en arts DNA är helt unikt för just den arten, medan andra delar av DNA ser likadant ut hos alla organismer i en grupp. Med hjälp av jättelika databaser över DNA-sekvenser, som är öppet tillgängliga för alla (ex <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), kan man välja ut en liten bit DNA som man kan kopiera industriellt. Dessa små bitar kallas primers. Eftersom primern är artspecifik fastnar den enbart på DNA för den valda arten. Resultatet, dvs en liten bit av DNA som primern kopierar kallas barcode (streckkod), och kan liknas vid den streckkod som används för att betala för just den enskilda varan i affärer. Dessa primers, en droppe eDNA, ett enzym och salter blandas i ett provrör. Provröret placeras i en maskin som gör DNA kopior för just den arten. Detta kallas för PCR (Polymerase Chain Reaction) och bygger på hur levande celler kopierar sin arvs massa vid celledelning.

Enartsstudier qPCR eller ddPCR levereras ej i detta projekt

Inventering av förekomst av en enstaka art med eDNA görs med så kallad qPCR. Frågeställningen för dessa studier är: **Finns art X här?** Varje art analyseras med en markör som är specifik för precis den arten. Provs varen anger närvaro/frånvaro av just den arten och en relativ eDNA-abundans mellan olika provtagningslokaler. Minst 12 qPCR replikat skall analyseras för att ge tillförlitliga resultat.

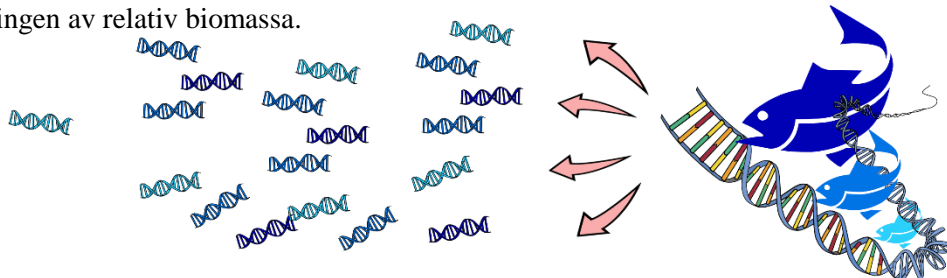
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundanser mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Som exempel kan nämnas att 1000 DNA kopior av gädda inte motsvarar 1000 kopior av abborre och analyserna kan inte tillförlitligt svara på vilken av arterna som är mest förekommande.

Flerartsstudier –Metastreckkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

Frågeställningen för flerartsstudier är; **Vilka arter finns här och vilka av dessa är vanliga eller sällsynta?** Med andra ord behöver man inte på förhand veta vad man letar efter.

Metastreckkodning eller metabarcoding innebär att man designar en primer som är gemensam för alla arter inom en grupp – indelade exempelvis med fokus på fisk, fokus på groddjur eller fokus på musslor. Eftersom man analyserar flera olika arter på en gång kallas metoden metastreckkodning. Anledningen till att man inte kan analysera alla djurgrupper samtidigt med en primer är det inte finns lämpliga målregioner i genomen som både är gemensamma för alla arter men samtidigt varierar så pass mycket att enskilda arter kan identifieras.

Invasiva eller skygga arter kan identifieras och antalet arter som kommer upp i en analys är obegränsat. Om man inventerar 3 eller fler arter är denna metod att föredra, och blir snabbt mer kostnadseffektiv än enartsanalyser. Flerartsanalyser visar även vilka arter man har fått och vilket dominansförhållande dessa har till varandra i ett vattendrag. Med andra ord kan den relativa biomassan räknas ut. Notera dock att under parningstiden förekommer DNA av de arter som förökar sig i större mängder då köns celler släpps ut i vattnet, vilket kan interferera med bestämningen av relativ biomassa.



Bilaga 2. Kvalitetssäkring av eDNA

Därför är kontrollprover nödvändiga vid eDNA-provtagning

En undersökning med hjälp av eDNA som saknar positiva och negativa kontroller kan inte ge tillförlitliga resultat. Detta gäller egentligen för alla DNA-undersökningar och innefattar alla utövare. **Om en utförare avviker från denna praxis är resultaten inte tillförlitliga och därmed oanvändbara.**

Utöver generella huvudprinciper för DNA-undersökningar (Griffiths m.fl. 2016) finns speciella regelverk för kriminaltekniska (Hedman m.fl. 2017) och medicinska (SFMG, 2011) undersökningar. Strikta riktlinjer för ett standardiserat utövande av eDNA-undersökningar tas just nu fram inom EU med utgångspunkt från Goldberg m.fl. (2016). Dessa regler kommer att kräva negativa och positiva kontroller som ett grundläggande krav.

Negativ kontroll; Ett prov med vatten som inte innehåller DNA filtreras vid inventerade lokaler med samma provtagningsmetodik. Detta prov kallas för negativ kontroll. Vidare analyseras DNA-fria prover i olika steg av undersökningen så att man kan försäkra sig om att kontaminering inte förekommer i fält eller laboratorium och orsakar falska positiva provsvar. Om DNA-signaler hittas i en negativ kontroll innebär det att undersökningen måste göras om.

Konsekvenserna av en kontaminerad negativ kontroll kan i praktiken innebära att:

- | | |
|---|--|
| a) en frisk person får en cancerdiagnos | b) fel person binds till ett brott |
| c) faderskapstest anger fel far till ett barn | d) arter som inte finns i ett område detekteras (falsk positiv) |

Positiv kontroll; 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.

Konsekvenserna av en positiv kontroll utan DNA-signal kan i praktiken innebära att:

- | | |
|---|--|
| a) en cancersjuk person blir inte diagnostiserad och dör | b) en skyldig person kan inte bindas till brottet |
| c) ett faderskapstest kan inte knyta rätt far till barnet | d) arter som finns i ett område detekteras inte (falsk negativ) |

Bilaga 3: Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser

1. Mängden insamlat/filtrerat vatten dokumenteras för att kunna avgöra hur mycket prov som samlats in totalt. *Alla eDNA-mätningar ställs i relation till hur mycket vatten som samlats in.*
2. Total eDNA koncentration för samtliga prov (inkl. negativa) anges. *Koncentrationen varierar avsevärt naturligt men ger ändå en första indikation om hur eDNA extraktionen lyckats.*
3. Inhibitionskontroll dokumenteras och redovisas. Inhibition betyder risk för att arter som finns i proverna inte detekteras därför att DNA inhiberas av humus etc. Detta går att åtgärda så länge inhibitionstest utförs. *Resultatet av antiinhibering före och efter utförandet redovisas så att resultatens tillförlitlighet kan bedömas.*
4. Band på gel efter målinriktad PCR dokumenteras (närvaro/frånvaro) inklusive negativa kontroller. *Detta visar att PCR har fungerat och kontroll av vilka prover som har spår av målarter, eller riskerar vara kontaminerade, kan utföras.*
5. Negativa kontroller indelade i a) fält-negativa (filter-negativa) b) extraktions-negativa samt c) PCR-negativa utförs och utfallet redovisas. *Detta möjliggör en kontroll av vilka prover som riskerar vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.*
6. Prov från ett artificiellt sammansatt samhälle ("mock community") används som positiv kontroll vid PCR och sekvensering. Falska positiva prover redovisas. *De positiva proverna försäkrar att PCR och bioinformatiken fungerar som avsett.*
7. Det totala antalet sekvenseringsläsningar, samt andel (%) av målarterna i läsningarna redovisas. *Detta ger en bild av hur väl sekvenseringen av målarterna lyckats.*
8. Andel sekvenser (%) av människa, ko, och gris (vildsvin) och bakterier som förekommer som bakgrundssekvenser redovisas. *Detta möjliggör en kontroll av att tillräckligt många läsningar täcker målarterna.*
9. Minst 12 PCR replikat per art/artgrupp och eDNA prov utförs. Maximalt 4 av dessa sammanslås i sekvenseringen. *Färre replikat minskar analyssäkerheten avsevärt.*
10. Antal prover för en specifik MiSeq-körning (sekvensering) överstiger inte 100 stycken exklusive sekvenseringskontroller. *Detta säkerställer att antalet läsningar per prov inte ska bli alltför lågt för att kunna detektera ovanligare arter.*



Referenser:

- Goldberg, Caren S., m.fl.. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7.11: 1299-1307.
- Griffiths Anthony et al. 2016. *An Introduction to Genetic Analysis*. 11th edition. WH Freeman. New York. ISBN-13: 978-1464109485.
- Hedman, Johannes m.fl.. 2017. Pre-PCR processing-projektet, P4 Stärkt beredskapskapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad provberedning. -*Nationellt Forensiskt Centrum, NFC 2017-05-07. NFC Rapport Avdelningskansliet 2017:04*
- SFMG, Svensk Förening för Medicinsk Genetik. 2011. Riktlinjer för kvalitetssäkring i klinisk genetisk verksamhet. http://sfgm.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf

Bilaga 4: Resultat av kvalitetskontroller

Bakgrunden till kvalitetskontrollerna anges i Bilaga 3. Värden för kontrollerna anges i tabell B4_1. DNA var rent och visade hög kvalitet. Alla negativa kontroller var negativa för målarter. De positiva kontrollerna var positiva. Kontaminant DNA tillhörande ko, gris och människa som är vanliga i reagenser och vattnet runtomkring oss togs automatiskt bort från analysen.

MiSeq parvis sekvensering för Miya markören (230) baspar gav 1 027 795 sekvenser av vilka 96,3 % godkändes genom alla kvalitetsfilter. Motsvarande siffra för Kelly markören (100 baspar) gav 2 021 213 sekvenser av vilka 57% passerade alla kvalitetsfilter. Detta är en indikation på hög kvalitet på eDNA och slutgiltigt data. Sekvenseringsdata för båda markörerna analyserades genom en pipeline som är specialdesignad av NatureMetrics Ltd. Datat testades mot både NCBI och NatureMetrics kurerade referensdatabaser.

Tabell B4-1. Kvalitetsgranskning av eDNA och kontroller. eDNA koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR. Band på gel av målarter efter PCR visar att provanalyserna har fungerat. PCR negativ innefattar 12 replikat. Procent ko och människa gäller enbart för flerartsanalyser och inte för enartsanalyser. Filtrerad volym sjövattnen anges i liter, eDNA koncentration ng/µl, inhibering samt anti-inhibering, gel Miya vs. gel Kelly anger om målarterna visade band på gel för närvaro före sekvenseringen. Kont% anger % av sekvenser från ko, gris och människa so togs bort som naturlig kontaminering. Notera att de negativa kontrollerna visade c 60 läsningar medan proverna visade ett medeltal på 70 000. Målartskontaminering för båda markörerna var noll, vilket betyder att proven inte har "kommunicerat" med varandra under sekvenseringen.

Provok al	H2O V (L)	eDNA (ng/uL)	Inhiberi ng	Anti- inhibitio n	Gel Kelly	Gel Miya	# PCR Kelly	# PCR Miya	kont % Kelly	kont% Miya	ma kont% Miya	ma kont% Miya
BV_01	3,0	11,4	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	29,5	0	0	0
BV_02	3,0	8,66	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	9,38	0	0	0
BV_03	1,3	>20	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	3,46	0	0	0
BV_04	3,0	>20	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	22,6	0	0	0
BV_05	3,0	>20	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	43,6	0	0	0
BV_06	2,4	>20	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	17,6	7,6	0	0
BV_07	3,0	>20	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	93,1	30,3	0	0
BV_08	3,0	>20	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	97	1,2	0	0
BV_09	3,0	7,66	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	62,6	1,1	0	0
BV_10	2,73	11,8	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	61,9	2	0	0
BV_11	3,0	>20	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	57,6	1,4	0	0
BV_12	3,0	>20	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	84,1	2	0	0
BV_13	3,0	>20	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	82,9	1,4	0	0
BV_14	3,0	>20	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	26,1	0	0	0
BV_15	3,0	>20	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	66,9	1	0	0
BV_16	4,5	10,2	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	85,3	6,2	0	0
BV_17	3,0	>20	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	63,2	1,2	0	0
BV_18 x2	0,36	11,6	Ja	Ja	Ja	Ja	12	12	76,1	8,2	0	0
BV_19	3,0	10,4	Nej	Nej	Ja	Ja	12	12	82,6	12,3	0	0
Lab neg	0,5	0,05	Nej	Nej	Nej	Nej	12	12	34	0	0	0
Fält neg 1	1,0	0,03	Nej	Nej	Nej	Nej	12	12	99	100	0	0
Fält neg 2	1,0	0,08	Nej	Nej	Nej	Nej	12	12	99	100	0	0

www.aquabiota.se