

Inventering av fisk med eDNA Gåsgruvan, Filipstads kommun

Micaela Hellström



Inventering av fisk med eDNA

Gåsgruvan, Filipstads kommun

Utgiven av:	MIX Research
Datum:	2021-11-24
Uppdragsgivare:	Naturcentrum AB
Författare:	Micaela Hellström
Granskare:	Författarna samt uppdragsgivarna
Omslagsbild	Gåsgruvan
Foton:	MIX Research; Liselott Rasmussen, Micaela Hellström.
Fältarbete	Liselott Rasmussen, Micaela Hellström
Uppdraget utfördes av:	MIX Research Postadress: Dekangatan 5, 752 57 Uppsala E-post: info@mixresearch.se Telefon: 070-782 03 10
Rapporten citeras som:	Hellström M. 2021. Inventering av fisk med eDNA. Gåsgruvan, Filipstads kommun. MIX Research 2021:08



SAMMANFATTNING

Miljö-DNA, eller eDNA (från engelskans environmental DNA), är samlingsnamnet på de genetiska avtryck som alla levande organismer lämnar efter sig i miljön i form av t.ex. fotspår, svett, slem och fingeravtryck. Eftersom genetiska analyser utvecklats mycket under de senaste decennierna är det fullt möjligt att fånga upp dessa avtryck för att identifiera arter som finns i en given miljö. eDNA kan utvinnas från en halv liter vatten och med hög precision ange vilka arter som är närvarande i t.ex. en sjö, damm eller flod. Detta verktyg är välutvecklat i vattenmiljöer och har visat sig vara användbart för miljöövervakningen. eDNA har visat sig vara kortlivat i vattenmassan (normalt maximalt ca. 2 veckor beroende på omständigheter) och ger därför en bild av arters förekomst i nutid.

Den nionde september 2021 utförde MIX Research, på uppdrag av Naturcentrum AB, eDNA fältarbete för att inventera förekomst av främst fisk i två små tjärnar, två vattenförande diken och en kontrollsjö i anslutning till Gåsgruvan i Filipstad, Värmlands län. Syftet med undersökningen var att generera dataunderlag för en miljökonsekvensbeskrivning. Sammanlagt fem vattenprover för eDNA analyser samlades in från fem lokaler. Fem fiskarter detekterade, gädda, abborre och mört återfanns på alla lokaler, lake konstaterades på tre lokaler och öring fanns i stora mängder (mätt i eDNA läsningar) i Rävbacken som testade positivt för alla 5 fiskarter. Vidare upptäcktes bäver och mindre vattensalamander vid Igeltjärn.

Alla arter kunde verifieras i område baserat på historiskt data. Resultaten visar att eDNA är en effektiv metod för att detektera artförekomster och biologisk mångfald.



Gåsgruvan fotograferad i närheten av Igeltjärn .

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	3
Innehållsförteckning	6
1 Inledning	7
2 Metoder	8
2.1 Fältarbete	8
2.2 Laboratoriearbete	9
2.3 Analyser DNA	9
3 Resultat Och Konklusion	10
3.1 Sekvenseringsresultat	10
3.2 Fiskarternas förekomst i området	10
4 Tack	11
5 Referenser	11
Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser?	12
Bilaga 2. Laboratoriearbete	13
Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA - kontroller	14
Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas	15
Bilaga 5: Resultat av kvalitetskontroller för flerartsanalyser	16
Bilaga 6: Fördelning av Artläsningar inom lokalerna	17



Tranbär förekom rikligt i området.

1 INLEDNING

Miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) är samlingsnamnet på de genetiska avtryck som alla levande organismer lämnar efter sig i miljön i form av t.ex. fotspår, svett, slem och fingeravtryck (Pedersen m.fl. 2015). Taberlet m.fl. (2012) definierar eDNA som "det DNA som kan studeras från efterlämnade spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet". Eftersom genetiska analyser har utvecklats mycket under de senaste decennierna är det fullt möjligt att genom vatten- eller jordprov fånga upp dessa avtryck och med precisa metoder identifiera de arter som finns i en given miljö. eDNA kan utvinnas från en halv liter vatten och med hög precision ange vilka arter som är närvarande. Detta verktyg är välutvecklat i vattenmiljöer och har visat sig vara användbart för miljöövervakningen (Harper m.fl. 2015, 2018, Lawson Handley 2015, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017, Bruce m. fl. 2021). eDNA har visat sig vara kortlivat i vattenmassan och ger därför en bild av arters förekomst i nutid (Brys m. fl. 2021).

Traditionella inventeringar är både tids- och resurskrävande vilket ofta gör storskaliga inventeringar ogenomförbara. Vidare är många provtagningsmetoder destruktiva vilket kan påverka sällsynta och hotade arter negativt. Eftersom eDNA-metoden är en icke-dödande metod är det idealiskt för undersökningar av biologisk mångfald.

I september 2021 utförde MIX Research, på uppdrag av Naturcentrum AB eDNA inventering på 5 lokaler vid Gåsgruvan, Filipstads Kommun i Värmlands Län.

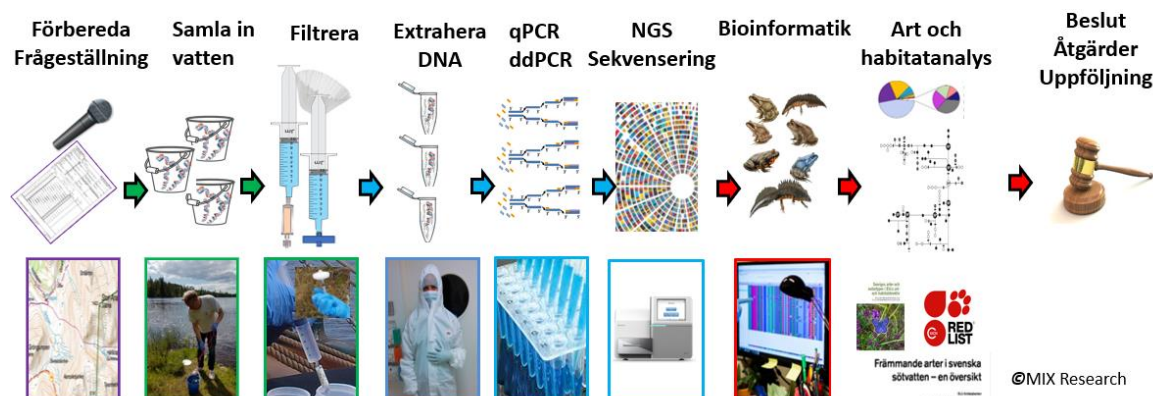
Syftet med undersökningen var att generera underlags data på huvudsakligen förekomst av fisk för en miljökonsekvensbeskrivning.



1. Rävbäcken

2 METODER

Flödesschema för fält- och laboratoriearbete visas i figur 1 och beskrivs i detalj i bilagorna 1 - 4.



Figur 1. Flödesdiagram som visar de olika stegen för flerartsanalyser från fältplanering till beslut och åtgärder (laboratoriearbeten och bioinformatik beskrivs i Bilaga 2).

2.1 FÄLTARBETE

Fältarbetet utfördes den 9 september 2021 i på fem lokaler vid Gåsgruvan (Figur 2, Tabell 1).

Innan eDNA-provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria kit (NatureMetrics Ltd UK). För varje lokal samlades 5 liter vatten in i form av delprover som slogs ihop till ett samlingsprov för säkrare resultat (Harper m.fl. 2018, Kačergytė m. fl. 2021, Bruce m.fl. 2021). Vattnet filtrerades för hand genom NatureMetrics 5 µm GF/0,8 µm PES inkapslade filterenheter. Fixering av filter med fixeringsbuffert i fält utfördes enligt tillverkarnas protokoll. Alla lokaler fotograferades (omslagsbild, figur 3, figur 4).



Figur 2. Karta över provtagningsområdet samt utsatta provpunkter. Se tabell 1 för detaljerad information.

Tabell 1. Provpunkter. Provnamn, lokal, typ av habitat, datum, tidpunkt vid eDNA provtagningen, total volym filtrerat vatten angivet i ml, vattentemperatur och koordinater (WGS 84).

Provnamn	Lokalnamn	Habitat	Datum	Tid	H ₂ O ml	T°C H ₂ O	Latitude	Longitude
GÅS_01	Rävbäcken	bäck	09/09/2021	09:58	3000	14	59.72805	14.22325
GÅS_02	Igeltjärn + utlopp	tjärn	09/09/2021	11:15	3500	16	59.72872	14.23009
GÅS_03	Utlopp Kotjärnen	bäck	09/09/2021	11:58	2500	16	59.72645	14.23516
GÅS_04	Kotjärnen	tjärn	09/09/2021	12:08	3000	17	59.7263	14.23622
GÅS_05	Gåstjärnen	sjö	09/09/2021	12:51	3000	16	59.73828	14.22715



Figur 3 Provtagningslokalerna. Bild på rävbäcken se introduktionen.

2.2 LABORATORIEARBETE

Laboratorieanalyserna beskrivs i bilaga 1. Se bilaga 2, 3 och 4 för kontroller och skullkrav.

2.3 ANALYSER DNA

Bioinformatiken beskrivs i bilaga 2 (anger relativ biomassa från mest till minst dominerande art). Antalet läsningar i ett prov ger en uppfattning om den relativa förekomsten av arten vid en punkt. Kvalitetskontroller anges i bilaga 4.

3 RESULTAT OCH KONKLUSION

3.1 SEKVENSERINGSRESULTAT

eDNA proverna visade hög kvalitet och kontrollerna fungerade som förväntat. Resultaten och kvalitetskontrollerna redovisas i bilaga 5. Antal läsningar per art och lokal redovisas i bilaga 6.

Målarter för denna undersökning var fisk och separata vertebratmarkörer detekterade mindre vattensalamander och bäver vid Igeltjärn.

3.2 FISKARTERNAS FÖREKOMST I OMRÅDET

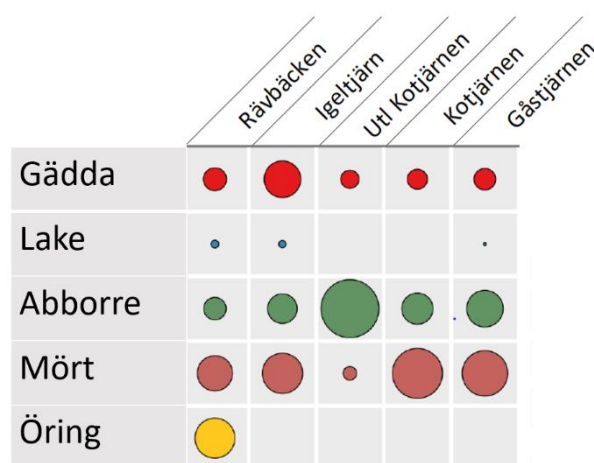
eDNA detekterade sammanlagt 5 matcher till fiskarter av vilka alla kunde identifieras som unika arter.

På alla 5 lokaler påträffades ruda, gädda, abborre och mört medan lake påträffades vid två lokaler som befann sig nära flodmynningen ut till Östersjön. Mört visade högst relativ biomassa följt av och öring förekom i rävbäcken som visade signaler för alla fem arter (tabell 2). Vidare upptäcktes *mindre vattensalamander* och *bäver* vid Igeltjärn.

	Rävbäcken	Igeltjärn + utlopp	Utl Kotjären	Kotjären	Gåstjärnen
Gädda	X	X	X	X	X
Lake	X	X			X
Abborre	X	X	X	X	X
Mört	X	X	X	X	X
Öring	X				
# arter	5	4	3	3	4

Tabell 2. Arternas förekomst inom de olika lokalerna. Närvaro anges med x

Relativ biomassa innebär att varje art har en unik DNA sekvens, varje gång sekvensen för en art blir läst registreras läsningen. En art som det finns mycket av ger upphov till fler läsningar än en art som det finns litet av. Arternas dominans inom lokalerna visas i figur 4. Jämförelser i experiment där fiskar av flera olika arter vägts och sedan släppt ut i en fisktom damm, för att efter några dagar ta eDNA prov för att jämföra proportionerna av biomassa visade en stark korrelation mellan fiskvikt och antal eDNA läsningar inom dammen (Li m.fl. 2019).



Figur 4. Bubbeldiagram som visar dominansförhållanden av arter inom de 5 olika lokalerna (kolumner). Varje kolumn summeras upp till 100% och ger en uppfattning om arter med högre och lägre biomassa. Totala antalet råläsningar finns i bilaga 6.

Resultaten i denna rapport visar att eDNA metabarkoding som artinventeringsmetod har stora fördelar eftersom artdetektionsgraden är hög. I denna rapport kunde även arternas förekomst verifieras. Fördelen med eDNA är att provtagning kan ske i svårtillgängliga områden och ske över stor geografisk skala för att generera "big data" vilket inte tidigare har varit möjligt för studier i biologisk mångfald. Elfisken detekterar vissa arter och kräver en större ansträngning i fält. Elfisken anger storlek samt nyrekrytering av fisk vilket eDNA inte gör. Tills vidare kan elfiske vs. eDNA komplettera varandra som metoder. Individ och åldersdata för eDNA finns på den framtida forskningshorisonten.

4 TACK

Ett stort tack Liselott Rasmussen för planering av fält och deltagande i fältarbete. Tack till Naturcentrum AB för hjälp med provpunkter och tillstånd i Gåsgruvan. Tack till MoRe Research för eDNA extraktioner enligt författarens protokoll och NatureMetrics Ltd för NGS laborationer.

5 REFERENSER

- Bruce, K. Bourlat, S. Blackmann, R., Hellström, M., m.fl. & Deiner, K. 2021. A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment". PenSoft Publishers Bulgaria 2021. ISBN 978-619-248-052-3 (paperback), ISBN 978-619-248-053-0 (e-book) DOI: 10.3897/ab.e68634 i press.
- 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.
- 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.
- Harper, L. R., Buxton, A. S., Rees, H. C., Bruce, K., Brys, R., Halfmaerten, D., ... & Priestley, V. 2018. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia*, 1-17.
- 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.
- Lawson-Handley, L., 2015. How will the "molecular revolution" contribute to biological recording? *Biological Journal of the Linnean Society* 115: 750–766.
- 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.
- Li, J., Lawson Handley, L. J., Harper, L. R., Brys, R., Watson, H. V., Di Muri, C., & Hänfling, B. (2019). Limited dispersion and quick degradation of environmental DNA in fish ponds inferred by metabarcoding. *Environmental DNA* 1 (3): 238–250.
- 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
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793

BILAGA 1. VAD MENAS MED ENARTS- OCH FLERARTSANALYSER?

Enartsstudier - qPCR eller ddPCR

Inventering av förekomst av en enstaka art med eDNA görs med så kallad qPCR eller ddPCR. Frågeställningen för dessa studier är: Finns art X här? Varje art analyseras med en markör som är specifik för precis den arten. Provsvaren anger närvaro/frånvaro av den specifika arten.

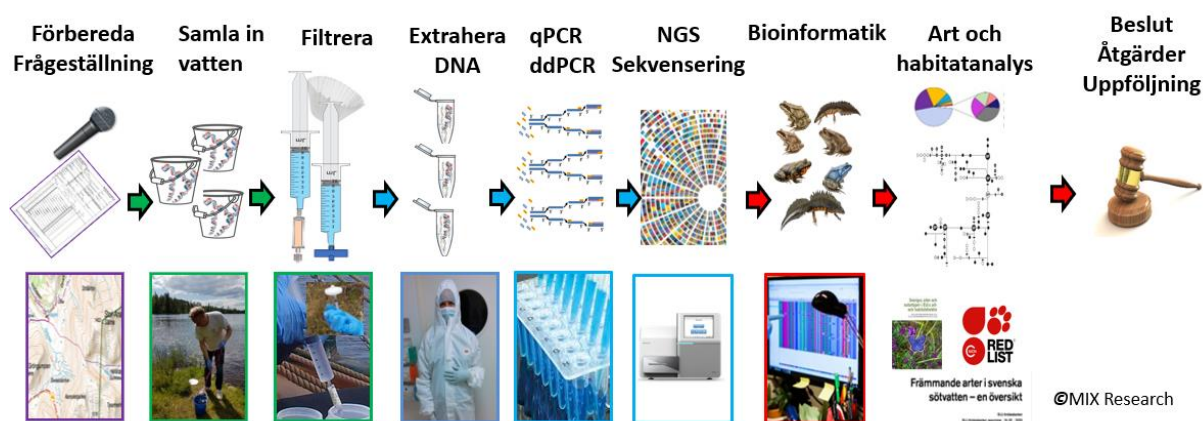
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundansen mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Analystiden för enartsanalyser är kortare än analystiden för flerartsanalyser.

Flerartsstudier - Metastreckkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

Frågeställningen för flerartsstudier är: Vilka arter finns här och hur hög är deras förekomst? Med andra ord behöver man inte på förhand veta vad man letar efter.

Invasiva och skygga arter kan identifieras och antalet arter som detekteras i en analys är obegränsat. Om man inventerar tre eller fler arter är denna metod att föredra och blir snabbt mer kostnadseffektiv än enartsanalyser. Analystiden för flerartsanalyser är längre än analystiden för enartsanalyser men mängden av data och information är så pass stor att inventeringarna kan producera "stort data" som inte har varit möjligt före eDNA- metastreckkodning (Figur B1-1)

Jämförelser mellan data som erhålls genom enarts- och flerartsanalyser visas i figur B1-2.



Figur B1-1. Flödesdiagram som visar de olika stegen för flerartsanalyser från fältplanering till beslut och åtgärder (laboratoriearbete och bioinformatik beskrivs i Bilaga 2).

Enartsanalys - Barkodning	CGCCGCGGTTATACGAGA	Ja/Nej
		
Flerartsanalys - Metabarkodning	CGCCGCGGTTATACGAGA	OTU 1 Match 
	CACCGCGGTTATACGAGA	OTU 2 Match 
	CGCCGCGGTTACACCACT	OTU 3 Match 
	CGCCGCGGCTACACCGTG	OTU 4 Match 
		Artlista
		Dominans
		10 %
		65 %
		5 %
		20 %

Figur B1-2. Typ av data som erhålls genom enartsanalyser och flerartsanalyser. Enartsanalyserna anger om en art är närvarande eller inte, medan flerartsanalyser resulterar i en artlista samt arternas dominans i förhållande till varandra inom ett prov.

BILAGA 2. LABORATORIEARBETE

Extraktion, PCR och sekvensering

eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA.

Flerartsanalyser

För flerartsanalyserna med fokus på fisk användes markörer i 12S mtDNA regionen och protokoll enligt Miya, m.fl. (2015). Flerartsanalyser för vertebrater analyserades med en markör i 12 S regionen som detekterar ett större urval av ryggradsdjur (Kelly m. fl. 2015) men ger mindre precision än Miya. . Varje PCR-prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs igen till ett prov under sekvenseringen. Som positiv laboratoriekontroll används ett prov med känd artsammansättning som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyseras för att säkerställa kvaliteten och tillförlitlighet av resultat.

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 450 000 kända arter finns tillgängliga med 1 miljard sekvenser och 6,25 triljoner baspar enligt GenBank och NCBI:s hemsida (Sayers, m.fl. 2020). De olika sekvenserna matchades i första hand mot databasen och fick på så sätt fram arternas identitet. Vidare används en verifierad (vilket betyder att arterna som används för referens-DNA är verifierade av en auktoriserad taxonom) intern databas från NatureMetrics Ltd. Tack vare nya framsteg inom metastreckkodning 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 av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov.

Referenser

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

BILAGA 3. KVALITETSSÄKRING AV DNA - KONTROLLER

Positiva och negativa kontrollprov

För tillförlitliga resultat vid eDNA-provtagning är positiva och negativa kontroller nödvändiga för att utesluta kontamineringar eller andra felkällor. Detta gäller 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 (Goldberg, m.fl. 2016, 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 under COST aktionen DNAquaNet.

Negativ kontroll: Ett prov med kommersiellt DNA fritt vatten (nukleas fritt vatten renat för molekylära undersökningar ex. Nuclease Free Water från Fishing Scientific) eller kolsyrat mineralvatten som ingår i fältmaterialet vid inventerade lokaler med samma provtagningsmetodik som vattenproverna. Detta prov kallas för negativ kontroll. Under hela undersökningen 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).

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.

En positiv kontroll utan DNA-signal kan i praktiken visa att arter som finns i en miljö inte detekteras (falsk negativ).

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://sfmg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf

BILAGA 4: KVALITETSKONTROLLER SOM REDOVISAS

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 filtrerats.
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 att 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 att vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.
6. Positiva kontroller (används inte alltid): a) Fält-positiva där ett område känt för artförekomst provtas för kontroll att arten detekteras i fält. b) PCR-positiva för enartsanalyser (gäller qPCR och ddPCR) där DNA från målartern testas. c) Positiv flerartskontroll, där 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. För enartsanalyser anges närvaro och frånvaro av arten, för flerartsanalyser anges andel (%) av målarterna i ett givet prov. 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 12st. PCR-replikat per art/artgrupp och eDNA-prov utförs. 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.

BILAGA 5: RESULTAT AV KVALITETSKONTROLLER FÖR FLERARTSANALYSER

Värden för kontrollerna anges i tabell B5-1. Alla negativa kontroller var negativa för målarter. De positiva kontrollerna var positiva. Kontaminations-DNA tillhörande människa, gris, ko, kyckling och får som är vanliga i reagenser och vattnet runtomkring oss, togs automatiskt bort från analysen.

Miya 12S markören för fisk resulterade i 774 419 läsningar av vilka 75 % d.v.s. 732 596 godkändes genom kvalitetsfiltren för godkända målartsidentiteter. Sekvenseringsdata analyserades genom en pipeline som är specialdesignad av NatureMetrics Ltd. Datat testades mot både NCBI och NatureMetrics kurerade referensdatabaser.

Tabell B5-1. Kvalitetsgranskning av eDNA och kontroller. eDNA-koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR. PCR-negativ innefattar 12 replikat. eDNA koncentration ng/μl. inhibering samt anti-inhibering anger om DNA är påverkat av humus och behöver genomgå antiinhibering. Inget av proverna visade inhibition. Markören som användes var Miya 12S för fisk. Kont% anger % av sekvenser från hund och människa som togs bort som naturlig kontaminering. Kontamineringsgraden var mycket låg.

Provnamn	eDNA (ng/ μl)	inhibering	#PCR Miya	% kontaminering mål-arter	# målart läsningar	% naturlig kontaminering
GÅS_01_Rävbäcken	17.0	Ja	11	0	120793	0.00
GÅS_02 Igeltjärn + Utl	12.2	Ja	12	0	90973	0.14
GÅS_03 Utl Kotjärnen	19.7	Ja	12	0	79772	0.00
GÅS_04 Kotjärnen	12.9	Ja	12	0	85270	0.28
GÅS_05 Gåstjärnen	14.1	Ja	12	0	83842	0.05
Fält Neg	< 0.01	Ja	10	0	178557	100
Neg Extraktion	< 0.01	Nej	2	0	96089	100

BILAGA 6: FÖREDELNING AV ARTLÄSNINGAR INOM LOKALERNA

Tabell B_6.2. Antalet eDNA läsningar per art inom de olika provlokalerna. Siffrorna anger hur många gånger en sekvens blivit läst på artnivå och anger relativ biomassa. Flera läsningar anger högre biomassa. Totala antalet arter per lokal anges i varje kolumn.

	Rävbäcken	Igeltjärn + utlo	Utl Kotjären	Kotjärnen	Gåstjärnen	Fält Neg	Lab Neg
Gädda	16099	31449	6521	8457	9768	0	0
Lake	1599	1032	0	0	133	0	0
Abbprre	15099	20069	69783	21093	28745	0	0
Mört	38388	38294	3468	55483	45029	0	0
Öring	49608	0	0	0	0	0	0
Kyckling	0	0	0	0	0	0	5834
Människa	0	51	0	182	43	28602	161396
Vildsvin	0	78	0	55	0	0	11327
Sej	0	0	0	0	124	0	0