

# FISK- OCH GRODDJURSINVENTERING MED eDNA I ANLAGDA VÅTMARKER HARG, UPPSALA 2020

Micaela Hellström & Liselott Rasmussen



## **MIX Research**

Postadress: Dekangatan 5, 75257 Uppsala

E-post: [info@mixresearch.se](mailto:info@mixresearch.se)

Telefon: 070-782 03 10

Fisk- och groddjursinventering med eDNA i anlagda våtmarker. Harg, Uppsala 2020

Författare: Micaela Hellström och Liselott Rasmussen

Foto i rapport: Liselott Rasmussen

Omslagsbild: Micaela Hellström

Fältarbete: Micaela Hellström, Liselott Rasmussen och Wilhelm Dietrichson

Dokumentdatum: 6 december 2020



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

---

Innehållsförteckning.....	3
1. Sammanfattning.....	4
2. Inledning.....	5
3. Metoder.....	6
3.1 Fältarbete .....	6
3.2 Laboratoriearbete .....	6
4. Resultat Och Konklusion.....	7
5. Tack.....	8
6. Referenser .....	8
Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser? .....	9
Bilaga 2. Laboratoriearbete .....	10
Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA - kontroller .....	11
Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas .....	12
Bilaga 5: Resultat av kvalitetskontroller för flerartsanalyser .....	13
bilaga 6: antal läsningar för de olika markörerna .....	14

## 1. 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 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 i t.ex. en sjö, damm eller flod. Detta verktyg är välutvecklat i vattenmiljöer och har visat sig vara användbart för miljöövervakningen. Fördelen med eDNA är att metoden är icke-destruktiv (varken dödar eller skadar undersökningsarterna). 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 28 september 2020 utförde MIX Research en fisk- och groddjursinventering med hjälp av eDNA på sex lokaler i fem dammar i Harg Uppsala län. eDNA detekterade sammanlagt åtta fiskarter. Den hotade arten Grönling detekterades nära inloppet i en av dammarna. Inga groddjur detekterades på grund av att proverna var tagna så sent på hösten att de hade lämnat dammarna ifråga. Under provtagningarna 2018 och 2019 (utförda under sommaren) detekterades både större och mindre vattensalamander.

Vidare detekterades 12 olika fågelsekvenser av vilka 10 var på artnivå och två var en av två arter.



*Figur 1. Wilhelm Dietrichson visar vägen vid Nyländadammarna.*

## 2. 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 (Bohmann m.fl. 2014, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017, Harper m.fl. 2018). Vidare har flera studier visat att flerartsanalyser av eDNA (metastreckkodning eller NGS sekvensering) i sjöar och rinnande vatten detekterar betydligt flera arter än vad provfisken gör (Hänfling m.fl. 2016). eDNA har visat sig vara kortlivat i vattenmassan och ger därför en bild av arters förekomst i nutid.

Traditionella inventeringar (elfiske, nätfiske) är både tids- och resurskrävande vilket ofta gör storskaliga inventeringar ogenomförbara. Vidare är många provtagningsmetoder destruktiva eftersom arterna som skall undersökas stressas, skadas eller dödas (Snyder 2003) vilket kan påverka sällsynta och hotade arter negativt. eDNA-analys är en icke-destruktiv metod som är idealiskt för undersökningar av biologisk mångfald.

Våtmarker är hotade habitat med hög och ofta unik artsammansättning (Wood mfl., 2003; Hill mfl., 2018). Anlagda våtmarker fyller en stor funktion för att bevara främst groddjur och fåglar och dessa våtmarker balanserar ut alla de dammar som förstörs i snabb takt på grund av byggnader och utökad infrastruktur. För att inventera biologisk mångfald i form av exempelvis groddjur och fiskar i dammar har nya molekylära metoder visat sig väldigt värdefulla.

Den 28 september 2020 utförde MIX Research en fiskinventering med hjälp av eDNA flerartsanalyser (metastreckkodning) på sex lokaler i fem olika dammar i Harg, Uppsala län. Resultaten kommer att jämföras med eDNA inventeringar från juli 2018 och augusti 2019.

## 3. METODER

### 3.1 FÄLTARBETE

Fältarbetet utfördes den 28 september 2020 i Harg, Uppsala län (Tabell 1).

Innan eDNA-provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria kit (NatureMetrics Ltd UK). För alla lokalerna samlades 5 liter vatten in i form av delprover. Delproven slogs ihop till ett samlingsprov för säkrare resultat (Harper m.fl. 2018). Vattnet filtrerades för hand med en 100 ml spruta genom NatureMetrics 5 µm GF/0,8 µm PES inkapslade filterenheter. Fixering av filtren i fält med LM solution (figur 2) följde tillverkarnas protokoll.

**Tabell 1.** Provpunkter. Namn, position (WGS 84), tidpunkt vid provtagningen, vattentemperatur och total volym filtrerat vatten (ml). Samtliga prover samlades in 28 september 2020

Provpunkt namn	Latitud (N)	Longitud (Ö)	Tid	H <sub>2</sub> O °C	V H <sub>2</sub> O ml
Nyländardammen 1 (Ny1)	60.096525	18.414414	11:40	15	2100
Nyländardammen 2 (Ny2)	60.098683	18.414831	13:36	15.3	1700
Västerjön – Kotjärn (Vä-K)	60.187703	18.436693	16:05	15.2	2000
Häsängsdammarna 1,2(Häs 1)	60.204033	18.292984	17:05	14.5	1700
Häsängsdammarna 3 (Häs 3)	60.204517	18.291652	17:30	14.5	2100
Jontedammen (Jonte)	60.211995	18.261725	18:33	14.8	3000



**Figur 2.** Fixering av filter med konserveringsvätska i fält.

### 3.2 LABORATORIEARBETE

Se bilaga 2.

## 4. RESULTAT OCH KONKLUSION

Proven i våtmarkerna var kraftigt inhiberade och renades flera gånger, flera markörer användes därför (se bilaga 1 och 5). Proverna innehöll mycket bakterier på två av lokalerna. Antalet läsningar i ett prov ger en uppfattning om den relativa förekomsten av arten vid en punkt. Resultaten och kvalitetskontrollerna samt skallkraven beskrivs i bilaga 3 och 4. Rådata läsningar finns i bilaga 6.

eDNA detekterade sammanlagt åtta fiskarter (tabell 2).

Den hotade arten grönlung (*Barbatula barbatula*) detekterades nära inloppet i en av dammarna. Inga groddjur detekterades på grund av att proverna var tagna så sent på hösten att de hade lämnat dammarna ifråga. Under provtagningarna 2018 och 2019 (utförda under sommaren) detekterades både större och mindre vattensalamander. **Tabell 2.** *Arternas förekomst på de olika lokalerna. Närvaro anges med x. Grönlung vid Häs3 gav många läsningar.*

Art latinskt namn	Art	Ny1	Ny2	Vä-K	Häs1	Häs3	Jonte
<i>Perca fluviatilis</i>	Abborre					X	
<i>Esox lucius</i>	Gädda						X
<i>Gymnocephalus cernia</i>	Gärs				X		
<i>Barbatula barbatula</i>	Grönlung					X	
<i>Rutilus rutilus</i>	Mört		X			X	
<i>Carassius carssius</i>	Ruda			X			
<i>Pungitus pungitus</i>	Småspigg			X			
<i>Cottus gobio</i>	Stensimpa						X

Trots att markörerna inte var anpassade för fågelarter, detekterades tolv olika arter (Tabell 3). Vidare detekterades get, hund, ko, människa och höna, vilka togs bort från analyserna. Några läsningar av torsk vid Jontedammen uppdagades, vilket är en kontaminering som kan komma från människoföda eller katt och hund-mat.

**Tabell 3.** *Arternas förekomst på de olika lokalerna. Närvaro anges med x. Grönlung vid Häs3 gav många läsningar.*

Art latin	Art svenska	Ny1	Ny2	Vä-K	Häs1	Häs3	Jonte
<i>Anas platyrhynchos/Tadorna tadorna</i>	Gräsand/Gravand			x	x	x	x
<i>Anatidae sp.</i>	Svan						x
<i>Turdus philomelos</i>	Taltrast			x			x
<i>Parus major/caeruleus</i>	Talgoxe/Blåmes			x			
<i>Dendrocopos major</i>	Större hackspett			x			
<i>Anas crecca</i>	Kricka	x					
<i>Anas penelope</i>	Bläsand				x		
<i>Cygnus cygnus</i>	Sångsvan			x		x	
<i>Fulica atra</i>	Sothöna				x		
<i>Poecile palustris</i>	Entita	x				x	
<i>Ardea cinerea</i>	Gråhäger					x	
<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Ssmådopping	x					

## 5. TACK

---

Ännu en gång: stort tack till Wilhelm Dietrichson för ett spännande uppdrag, stort engagemang, hjälp i fält och intressanta våtmarks och fågeldiskussioner. Tack till NatureMetrics för eDNA extraktioner respektive NGS analyser

## 6. REFERENSER

---

- Bohmann KA, Evans MTP, Gilbert GR, Carvalho S, Creer M, Knapp DW, Yu DW, de Bruyn M. 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.
- 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.
- Hill, M. J., C. Hassall, B. Oertli, L. Fahrig, B. J. Robson, J. Biggs, M. J. Samways, N. Usio, N. Takamura, J. Krishnaswamy & P. J. Wood, 2018. New policy directions for global pond conservation. *Conservation Letters* 142: e12447
- Hänfling B, Handley LL, Read DS, Hahn C, Li J, Nichols P, Blackman RC, Oliver A, Winfield IJ. 2016. Environmental DNA Metabarcoding of Lake Fish Communities Reflects Long-Term Data from Established Survey Methods. *Molecular Ecology* 25: 3101–19.
- 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.
- 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
- Wood, P. J., M. T. Greenwood & M. D. Agnew, 2003. Pond biodiversity and habitat loss in the UK. *Area* 35: 206–216



## 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 eller 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.

## BILAGA 2. LABORATORIEARBETE

---

### *Extraktion, PCR och sekvensering*

eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) för LM i inkapslade filter i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Proverna analyserades med flerartsanalyser för förekomst av fiskar och groddjur (bilaga 1).

### *Flerartsanalyser*

För flerartsanalyserna användes markörer och protokoll enligt Miya, m.fl. (2015) och Kelly m.fl. (2014) samt Misuite (Vertebrat markör på 12S genen). Varje PCR-prov utfördes i flera replikat vilka anges i tabell B5-1. Replikaten sammanslogs under MiSeq sekvenseringen. Som positiv laboratoriekontroll användes ett prov med känd artsammansättning som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyserades för att säkerhetsställa 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 mot databasen och fick på så sätt groddjurens identitet. Vidare användes 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 groddjur 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*

- Biggs J, Ewald N, Valentini ... Dunn F 2014. Analytical and methodological development for improved surveillance of the Great Crested Newt. Appendix 5. Technical advice note for field and laboratory sampling of great crested newt (*Triturus cristatus*) environmental DNA. Freshwater Habitats Trust, Oxford.
- Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., & Crowder, L. B. (2014). Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PloS one*, 9(1), e86175.
- 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 vatten som inte innehåller DNA filtreras 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 målarartsgrupperna 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.

Konsekvenserna av en positiv kontroll utan DNA-signal kan i praktiken innebära 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](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 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 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 målarten 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 9 stycken PCR-replikater per art/artgrupp och eDNA-prov utförs. Dessa sammanslås i sekvenseringen. Färre replikater minskar analys säkerheten 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. DNA i samtliga prover var inhiberat och för två prover svåra att analysera även efter rengöring. Alla negativa kontroller var negativa för målarter. De positiva kontrollerna var positiva. Kontaminations-DNA tillhörande människa, som är vanliga i reagenser och vattnet runtomkring oss, togs automatiskt bort från analysen.

MiSeq parvis sekvensering för Miya 12S, Kelly 12S och MiSuite markören gav 764 768 läsningar av vilka 62% godkändes genom kvalitetsfiltren för godkända fiskidentiteter. Eftersom DNA var inhiberat användes även Kelly 12S och 12S MiSuite marköre. 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. Samtliga prover var inhiberade. Lokal NY2 och Häs 3 var för inhiberade för att fungera för Miya markörer och därför användes Kelly markörer istället. Gel Miya anger om målarterna visade band på gel före sekvenseringen. MiSuite användes för detektion av amfibier. Kont% anger % av sekvenser från hund och människa som togs bort som naturlig kontaminering. Status NA anger att markören inte är körd, Ja att markören är använd och har gett resultat samt F att markören är körd men gav inte resultat.*

Provlokal/ Namn	eDNA (ng/ul)	inh	Anti-inh	# PCR Miya	Status Miya	# PCR Kelly	Status Kelly	#PCR Misuite	Status Misuite
Ny1	7,54	Ja	Ja	10	F	NA	NA	9	Ja
Ny2	12,8	Ja	Ja	NA	NA	14	Ja	NA	NA
Vä-K	4	Ja	Ja	10	Ja	NA	NA	12	Ja
Häs1	3,3	Ja	Ja	12	Ja	NA	NA	12	Ja
Häs3	8	Ja	Ja	NA	NA	10	Ja	12	Ja
Jonte	7,84	Ja	Ja	9	Ja	NA	Ja	12	Ja
Filter Neg	<0,001	Nej	Nej	12	Ja	12	Ja	12	Ja
Lab Neg 1	<0,001	Nej	Nej	12	Ja	12	Ja	12	Ja
Lab Neg 1	<0,001	Nej	Nej	12	Ja	12	Ja	12	Ja
Lab Neg 2	<0,001	Nej	Nej	12	Ja	12	Ja	12	Ja

## BILAGA 6: ANTAL LÄSNINGAR FÖR DE OLIKA MARKÖRERNA

Antal läsningar per markör anges i Tablee. Notera att antalet läsningar från tidigare år inte är direkt jämförbara och i detta fall bor närvaro/frånvaro rapporteras.

*Tabell B6-1. Antal MiSeq läsningar per art på de enskilda lokalerna. Notera att vissa av läsningarna är sammanlagda från två markörer som visas var för sig i tabell B6-2.*

Markör	Fiskart	Ny1	Ny2	Vä-K	Häs1	Häs3	Jonte
MiFish/suite	Ruda		NA	31047		NA	
MiSuite	Stensimpa						3239
MiFish/Suite	Småspigg		NA	30432		NA	
MiFish/Suite	Gädda		NA			NA	43718
MiSuite	Abborre					8610	
MiSuite	Mört		3629			7152	
MiSuite	Gärs				7714		
MiSuite	Grönling					9472	

*Tabell B6-1. Antal MiSeq läsningar per art på de enskilda lokalerna. Notera att vissa av läsningarna är från två markörer vilket gör att vissa arter listas flera gånger. NA betyder att markören byttes ut mot en annan för det givna provet.*

Markör	Fiskart	Ny1	Ny2	Vä-K	Häs1	Häs3	Jonte
MiFish	Ruda		NA	23568		NA	
MiSuite	Ruda			7479			
MiSuite	Stensimpa						3239
MiFish	Småspigg		NA	26820		NA	
MiSuite	Småspigg			3612			
MiFish	Gädda		NA			NA	41409
MiSuite	Gädda						2309
MiSuite	Abborre					8610	
MiSuite	Mört		3629			7152	
MiSuite	Gärs				7714		
MiSuite	Grönling					9472	