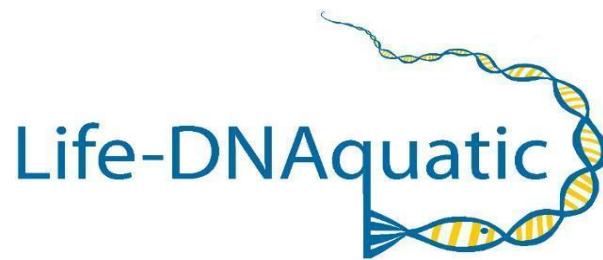


# Riktlinjer för hantering av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöanalys

Del I: Insamling i fält, filtrering och konservering



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

AquaBiota Report 2021:09

STOCKHOLM, JULI, 2021

**Beställare:**

Rapporten är utförd av samarbetspartners inom LifeDNAquatic-projektet för Naturvårdsverket.

**Kontaktinformation:**

AquaBiota Water Research  
Adress: Sveavägen 159, 11346 Stockholm  
Tel: +46 8 522 302 40  
Mail: [info@aquabiota.se](mailto:info@aquabiota.se)  
Web: [www.aquabiota.se](http://www.aquabiota.se)

**Kvalitetsgranskad av:**

Henrik Appelgren, Gunilla Ejdung

**Internetversion:**

Nedladdningsbar hos [www.aquabiota.se](http://www.aquabiota.se)

**Citera som:**

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

AquaBiota Report 2021:09  
Projektnummer: 2020001  
ISBN: 978-91-89085-33-6  
ISSN: 1654-7225

© AquaBiota Water Research 2021



## Innehåll

1. Bakgrund .....	4
2. Fältplanering .....	5
2.1 Fysiska och ekologiska aspekter att ta i beaktande inför fältplanering.....	5
2.2 Förberedelser och utrustning .....	5
3. Insamling av vatten i fält.....	6
4. eDNA-beskrivning .....	7
4.1 Filtertyper.....	8
4.1.1 Öppna filter .....	8
4.1.2 Inrymda filter .....	8
4.1.3 Slutna filter.....	8
4.2 Val av filter .....	9
5. eDNA-konservering och transport av prover .....	9
5.1 Frysning.....	10
5.2 Torkning .....	10
5.3 DNA-fixering.....	10
5.3.1 Konserveringsvätskor.....	10
5.3.2 Lyseringsbuffertar .....	10
6. Rapportering av fältdata .....	11
7. Referenser .....	13
8. Projektöversikt och författaraffiliering .....	16
8.1 Om projektet.....	16
9. Tack .....	16

# 1. Bakgrund

Vid inventeringar av växter och djur i naturen finns det ett antal olika undersökningsmetoder att tillgå. Konventionella metoder för att inventera vattenlevande organismer har sina begränsningar. Det kan dels handla om hur representativa data är, dvs hur väl de fångar biologiska data, dels hur metoden i sig påverkar studieobjektet. eDNA (environmental DNA) som verktyg i miljöövervakningen ger en möjlighet att identifiera akvatiska arter över stora geografiska områden på kort tid med stor precision utan att orsaka skador på de organismer som studeras.

När det gäller inventeringar av fiskarter, groddjur, sötvattensmusslor och andra akvatiska organismer ligger utmaningen oftast i att detektera, snarare än i att identifiera, arter. Konventionella fiskinventeringsmetoder (t.ex. elfiske och nätfiske) är tidskrävande, arbetsintensiva och ineffektiva för artsammansättningsstudier och kan både skada, stressa och döda arterna som inventeras (Snyder 2003). Vidare är arter som är sällsynta, lever ett undanskymt liv, eller främmande arter som är i ett tidigt skede av invasionsprocessen, svåra eller omöjliga att upptäcka. För främmande arter är det särskilt angeläget att upptäcka deras närvaro i ett tidigt invasionsskede för att öka sannolikheten att elimineringsåtgärder lyckas.

Tillämpligheten av eDNA baserar sig på det faktum att alla levande organismer kontinuerligt avger genetiska fotavtryck i miljön i form av slem, avföring, respiration, svett och döda celler vilka kan fångas upp ur vattenkolumnen som cellulärt eller subcellulärt material (Turner m.fl. 2014; Wilcox m.fl. 2015; Moushomi m.fl. 2019). Intresset för eDNA har under de senaste åren ökat rejält inte minst givet metodens stora potential som ett effektivt verktyg inom miljöövervakningen.

eDNA har visat sig ha särskilt stor potential som verktyg för inventering av vattenorganismer (Bohmann m.fl. 2014; Leese m.fl. 2016; 2018; Olds m.fl. 2016; Deiner m.fl. 2017). Som jämförelse har flera studier visat att eDNA i sjöar och rinnande vatten detekterar flera fiskarter än vad provfisken gör (Hänfling m.fl. 2016; Hellström & Spens 2017 a, b, c; Hellström m.fl. 2018), vilket även har konstaterats för musslor och groddjur (Näslund m.fl. 2019). Denna tekniska rapport sammanfattar riktlinjer inom EU-konsortiet DNAquaNet samt pågående CEN- och SIS-standardiseringar av eDNA provtagning inom EU och Sverige. Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag vilket syftar till att

finansiera forskning till stöd för Naturvårdsverkets och Havs- och vattenmyndighetens kunskapsbehov.

## 2. Fältplanering

### 2.1 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 uppnå optimala resultat. Fysiska aspekter såsom djup, flödes hastigheter, cirkulation, höjdskillnader, termokliner, halokliner, vattenvolymer samt naturliga och antropogena barriärer i miljön är viktiga faktorer som ska beaktas vid eDNA-provtagning (Tabell 1) (Deiner och Altermatt 2014; Jerde m.fl. 2016; Deiner m.fl. 2016; Hänfling m.fl. 2016; Shogren m. fl. 2017; Pont m.fl. 2019). 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). I stora skiktade sjöar där hela taxa (arter eller grupper av arter, t.ex. släkte, familj etc.) 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 t.ex. i öppet hav kan DNA bli mer utspädd vilket gör att större mängder vatten från olika djup behöver filtreras. I rinnande vatten är DNA ofta bättre blandat och mer homogent, dock kan stora rinnande vatten med bakåtgående strömmar, virvlar i vattnet och varierande flödesriktning påverka provtagningen (Jerde m.fl. 2016; Pont m.fl. 2018; Shogren m.fl. 2018).

Sannolikheten för att detektera en art med hjälp av eDNA-metabarcoding som verktyg styrs 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 t.ex. marina däggdjur och vandrande fiskar. Arter kan även röra sig i djupled beroende på årstid. Arter som trivs bättre i kalla vatten kan söka sig till djupare områden vid ökade temperaturen. Även reproduktionstiden bör uppmärksammas när prover ska tas eftersom ägg och spermier kan öka mängden DNA i vattnet (Bylemans m.fl. 2017).

### 2.2 Förberedelser och utrustning

Förberedelser för fältutrustning ska göras i DNA-fria miljöer. Insamlingskärl som exempelvis burkar, hinkar eller vattenprovtagare bör tvättas i 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 spridning av DNA eller patogener mellan provtagningslokaler ska engångsprodukter nyttjas eller att utrustningen noggrant rengörs mellan lokaler.

### 3. Insamling av vatten i fält

Under fältprovtagning oberoende av provtagningsstrategi (se nedan) ska följande observeras:

- Undvik återanvändning av utrustning på olika provtagningslokaler om inte utrustningen renas mellan lokaler genom att exempelvis använda hypoklorit eller kommersiella DNA-förstörande produkter.
- Undvik att stiga ner i 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.
- Använd sterila engångshandskar för att förhindra överföring av provtagarens DNA till proverna samt överföring av målarternas DNA mellan provtagningslokaler. Byt handskar mellan provtagningspunkter. DNA från människor i prover ska undvikas så mycket som möjligt eftersom människo-DNA tar upp läsningkapacitet i sekvenseringsanalyserna. DNA från människa registreras och amplifieras av de flesta eDNA-markörer, även då målartsgrupperna är fiskar, musslor eller grodor.
- För riktigt känsliga prover använd munskydd, andas inte över filter eller insamlat vatten.
- Samla in regelbundna filterkontroller i fält för att försäkra att proven inte har kontaminerats i fält.
- Tänk på eventuell överföring av patogener mellan lokaler vid temperatur- och pH mätningar.

Olika typer av 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 insamling av 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 vilken insamlingsstrategi man använder är det av värde att ta flera delprover vid varje insamlingspunkt som sedan slås ihop till ett så kallat punktsamlingsprov.

En genomgång av den vetenskapliga litteraturen visar att volymen av insamlat vatten för filtrering varierar mellan 50 ml och 100 l. De vanligaste insamlingsvolymerna är mellan 500 ml och 5 l. Minsta möjliga insamlingsvolym för goda resultat är beroende av följande faktorer:

1. Insamlingsstrategi som även inkluderar hur många tekniska replikat som tas per provpunkt. Om proverna samlas in optimalt rekommenderas minst två tekniska replikat eftersom eDNA-metoden upptäcker många arter men detektionsprecisionen ökar med flera provtagningar. Detektioner beror även på hur många tekniska replikat som görs under PCR-analyserna längre fram i analyskedjan. Det har visat sig att ett färre antal tekniska replikat i fält, men ett stort antal (uppåt 12) tekniska replikat i laboratorium, ger bättre resultat än flera replikat i fält och färre tekniska replikat i laboratorium (Doi m.fl. 2019).
2. Storleken på vattendraget som ska undersökas eftersom eDNA är mer koncentrerat i ett mindre vattendrag och är mer utspädd i ett större vattendrag vilket påverkar detektionssannolikheten.
3. Typ av vattenmiljö (våtmark, sjö, rinnande vatten eller marina miljöer) vilket påverkar hur DNA är fördelat i vattenmassan.
4. Målet med inventeringen. Om en sällsynt art eller en invasiv art i början av invasionsstadiet (som förekommer i litet antal i ett ekosystem) ska inventeras kan det krävas flera tekniska fältprov än om ett helt samhälle av olika arter ska undersökas.
5. Effektiviteten och insamlingsstrategin kan påverkas av senare laboratorieanalyser.

Det har visat sig att större vattenvolymer som filtreras i princip ger högre koncentrationer av eDNA men beroende på hur vattnet hanteras och fixeras efter insamling kan ett helt samhälle av arter upptäckas på ett säkert sätt från små vattenvolymer (Mächler m.fl. 2016, Hellström och Spens 2017).

## 4. eDNA-beskrivning

Flera olika filtersystem och utrustning används idag för att samla in och fixera eDNA från vatten. Insamling av eDNA är 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.

Preliminära undersökningar utförda inom LifeDNAquatic-projektet tyder på att olika filtrerings- och fixeringsmetoder ger nästan identiska slutresultat. En förutsättning är att fältpersonalen följer föreslagna insamlingsstrategier, att renligheten är hög och att laboratorier och analyser används som är anpassade för eDNA även längre fram i analyskedjan. Valet av filtreringsmetod och fixering påverkas av tid, budget, tillgänglighet och avstånd till provlokaler.

De allra första eDNA-undersökningarna använde etanol för att fälla ut (precipitera) eDNA ur 15 ml vatten i etanol (Ficetola m.fl. 2008). Idag är flertalet överens bland de som arbetar med eDNA att filtrering av vatten är en metod att föredra (bl.a. Deiner m.fl. 2015; Spens m.fl. 2017), och det internationella nätverket DNAquaNet har fasat ut etanolprecipitation som

metod för att utvinna eDNA. Den främsta orsaken till detta är att mycket små mängder insamlat vatten bearbetas i analysen vilket lätt leder till att arter som är närvarande undgår detektion.

## 4.1 Filtertyper

### 4.1.1 Öppna filter

Öppna filter är runda membran som är exponerade för luft under filtrering. Vattnet filtreras vanligen i laboratoriet med en vakuumpump och i fält med en peristaltisk pump. Vattnet hålls i en steril behållare och rinner igenom filtret. Öppna filter är billigare än de övriga filtersystemen. Öppna filtersystem löper dock en större risk för kontaminering (från DNA som finns i den omgivande luften och eller kan komma från provtagaren, t.ex. från kläder eller utandning) från omgivningen eftersom de inte skyddas av ett hölje.

Själva filtreringsprocessen utgör inte en kontamineringsrisk. Däremot när filtren avlägsnas från systemet, med pincett efter filtreringen, och överförs till sterila provrör eller påsar, ökar risken för kontaminering. För att kvalitetssäkra resultaten efter laboratoriearbetet är det mycket viktigt att negativa filterkontroller tas med jämna mellanrum (Goldberg m.fl. 2016). Rent vatten filtreras genom de negativa filterkontrollerna för att försäkra sig om att de inte har kontaminerats.

### 4.1.2 Inrymda filter

Inrymda filter (från engelskans "housed filters") är 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 filtererat rent vatten är nödvändiga för att utesluta kontaminering.

### 4.1.3 Slutna filter

Slutna filter är system där filtermembranet är slutet innanför en kapsyl och filtret exponeras inte för den yttre miljön vilket gör att kontamineringsrisken är liten. Konserveringsvätskan (se sektion 5.4) sprutas direkt in i filtrets membran innanför kapsylen som inte öppnas. Exempel på slutna filter är filter från Millipores Sterivex samt olika sorters diskfilter. Slutna filter är mest robusta för att hindra kontaminering och är enkla att transportera. Dessa filter rekommenderas för storskaliga undersökningar och är mycket användbara, inte minst då användare med mindre erfarenhet samlar in prover. De mest rekommenderade filtermaterialen (se sektion 4.2) finns tillgängliga för slutna filter, trots det är utbudet av filtermaterial och porstorlekar större för öppna filter. Nya produkter som erbjuder bättre material till lägre kostnad kommer att lanseras på marknaden de kommande åren. Analyser som kräver mekanisk lysering (sönderdelning och upplösning av cellulärt material) så som t.ex. kiselalger kräver öppna filter eller inrymda filter.



## 4.2 Val av filter

För att avgöra vilka filtermaterial och porstorlekar som är optimala bör faktorer som taxa och vattnets grumlighet vägas in. Vanliga membranmaterial är cellulosanitrat (CN), polyetersulfan (PES), polyvinyliden difluorid (PVDF), glasfiber (GF) och polykarbonat "track edged" (PCTE). Ett membran bör vara tillverkat av hydrofila (vattentilldragande) material. Det är viktigt att vara medveten om att vissa membranmaterial kan inköpas som hydrofila eller hydrofoba (vattenavstötande) material. Några membranmaterial, t.ex. GF, kan inte produceras med konstant porstorlek på grund av materialets matrixliknande konsistens. PCTE-membran är inte lämpade för slutna filter eftersom materialet inte är starkt nog och materialet behöver stöd för att inte gå sönder under filtrering under höga tryck.

Filtermembranens porstorlekar för eDNA-filtrering har varierat mellan 0,1  $\mu\text{m}$  och 10  $\mu\text{m}$ . Rekommendationen är porstorlekar som är under 1,2  $\mu\text{m}$  (Turner m.fl. 2014; Wilcox m.fl. 2015). Membran med större porstorlek klarar av att filtrera större mängder vatten eftersom stora porer inte täpps till lika lätt av organiskt material jämfört med mindre porer. Val av porstorlek beror på vilka taxa som skall undersökas och en avvägning mellan hur stora partiklar som släpps igenom filtren samt även hur stor vattenvolym som ska filtreras. Experiment med olika porstorlekar för att detektera fisk-DNA visade att skillnaden mellan arter var minimal för små porstorlekar upp till 1,2  $\mu\text{m}$  (Turner m.fl. 2014). Anledningen till detta är att partiklar med fisk-DNA är mellan 1–10  $\mu\text{m}$  (Wilcox m.fl. 2015). Deiner m.fl. (2018) rapporterade liknande resultat för eukaryota evertebrater. De porstorlekarna som används av majoriteten av de som arbetar med eDNA är 0,22  $\mu\text{m}$  eller 0,45  $\mu\text{m}$ . Om målet för en undersökning är att detektera biodiversitet som inkluderar mikrobiell diversitet samt större arter rekommenderas mindre porstorlekar i storleksordningen 0,2  $\mu\text{m}$  (Lee m.fl. 2010).

I miljöer med grumliga vatten eller då detektionen av målarterna kräver små porstorlekar rekommenderas förfiltrering av vattnet genom filtermembran med stora porstorlekar för att maximera filtrerad vattenvolym. Eftersom eDNA även fastnar på förfiltret är det fördelaktigt att utvinna DNA från båda filtren för några av proverna för att avgöra om DNA går förlorat i förfiltret.

## 5. eDNA-konservering och transport av prover

För att undvika att eDNA sönderfaller under transport väljer många av de som jobbar med eDNA 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 ska frysas eller skickas i vätskeform för att filtreras i laboratorium bör filtreras så snart som möjligt inom 24 timmar.

## 5.1 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 laboratorier sänder fruset vatten till laboratoriet och filtrerar det upptinade vattnet precis före eDNA-utvinningen (extraktion).

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

## 5.2 Torkning

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

## 5.3 DNA-fixering

### 5.3.1 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 extraktionskedet 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 sammanförs vid det första extraktionssteget.

### 5.3.2 Lyseringsbuffertar

Lyseringsbuffertar används i första steget under eDNA-extraktion och löser upp cellväggar så att DNA faller ut i lyseringsvätskan. Lyseringsvätskor såsom Longmires buffert 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. För utvinning av akvatiskt eDNA för att analysera närvaro av ryggradsdjur 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. 2016).

Prover bevarade i etanol i kylskåp under 15 månader visade ingen försämring av DNA-kvaliteten då de jämfördes med prover som extraherades genast efter att de inkommit till laboratoriet (Hellström m.fl. opublicerade data). Filter som fixeras i etanol kan skickas från fält till laboratoriet utan tillstånd eftersom volymerna är så små. Däremot kan etanol av

molekylär grad vara svårt att få tag på i ett flertal länder. Nackdelen med etanol är att vätskan evaporerar snabbt och kan förlora sin koncentration om flaskor eller filter inte tillsluts ordentligt efter användning. Longmires lösning är saltbaserad och är lämpad för eDNA-analyser (Wegleitner m.fl. 2015; Longmire m.fl. 1997) men är inte tillgängligt kommersiellt och behöver tillverkas i rena laboratorium. RNAlater bevarar mikrober och eRNA parallellt med makrobiotiskt eDNA. Spens m.fl. (2017) jämförde flera olika kombinationer av filtertyper och konserveringsmetoder för fisk där eDNA-etanol och Longmires lösning visade bäst resultat.

## 6. Rapportering av fältdata

För rapportering av fältdata ska följande data registreras

- Geografisk position med koordinater där provtagningen utfördes
- Typ av vattendrag (sjö, våtmark, rinnande vatten, marint)
- Vattendjup och provdjup
- Unikt provnamn
- Antal tekniska replikat per provpunkt
- Datum
- Tid på dygnet
- Vattentemperatur
- Lufttemperatur
- Volym insamlat vatten
- Insamlingsstrategi a) flera underprover på en punkt, b) samlade underprover över en yta, eller c) ett prov utan underprover
- Filtertyp och filtermaterial
- Porstorlek på filtret
- Konserveringsmetod
- Insamlarens namn

**Tabell 1. Faktorer att tänka på vid eDNA provtagning i akvatiska miljöer**

Att ta i beaktande	Gäller alla typer av akvatiska ekosystem	Sjöar och dammar	Rinnande vatten	Marina miljöer
<b>När? Tid, årstid, månad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Säsong. Tex ta prover för större vattensalamander under och precis efter reproduktionstiden innan de vuxna lämnar vattendraget. Tänk på säsong och parningstid för fiskar. Bakterier har en högre koncentration under de varma månaderna vilket kan påverka proverna. Vinterprovtagning går därför bra för att eDNA bibehålls längre vid låg temperatur.</li> <li>Provtagning parallellt med myndigheters årliga inventeringar rekommenderas för jämförbarhet av data.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Är vattnet skiktat?</li> <li>Nej – ta vanliga delprover som slås ihop i ett insamlingskärl längs strandlinjen av sjön.</li> <li>Ja- inkludera en djupprofil med separata grund- och djupprover om nödvändigt.</li> <li>Vår- och höstcirkulation.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tag prover under naturliga flödesförhållanden.</li> <li>Om möjligt undvik torra perioder eller översvåmningsperioder om detta icke är målet med provtagningen.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nära strandlinjen, grunda vatten – ta säsong i beaktande. Många fiskarter rör sig mot grundare vatten under förökningsperioden och till djupare vatten under vintern.</li> <li>Vissa arter föredrar djupare vatten under den varma sommarsäsongen.</li> <li>För marina däggdjur – ta reda på migrationsmönster (Kelly et al. 2014).</li> <li>Provtagning parallellt med myndigheters årliga inventeringar rekommenderas för jämförbarhet av data.</li> </ul>
<b>Var? Välja provtagnings-lokal</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Undvik att vistas i vattnet före provtagning för att inte riskera kontaminering från skor. Om nödvändigt ta proverna uppströms från provtagaren.</li> <li>Samla in förhandsinformation om positioner av avloppsrör, restauranger, bebyggelse etc, eftersom eDNA signaler från dessa når vattnet.</li> <li>Notera även närvaro av fåglar eftersom avföring kan innehålla DNA som immundigats på andra ställen.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Samla prover längs litoralen. Ta topografiska variationer i beaktande som vid traditionell provtagning.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Samla in delprover över vattendraget,</li> <li>Tänk på positioner av huvud- och biflöden, notera omedelbar närhet till sjöar, samt höjdskillnader som vid traditionell provtagning.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Notera djupprofiler, tidvatten, strömmar och avstånd från land.</li> <li>Undvik närheten av utlopp från rinnande vattendrag.</li> <li>Flera djup kan behövas som vid traditionell provtagning.</li> </ul>
<b>Hur många prover behövs?</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Antal prover skall reflektera rumsliga variationer (olika habitat så som vegetation, sandstrand eller klippor)</li> <li>Systemets storlek och även begränsningar gällande möjligheter att nå provtagnings- lokalerna.</li> <li>För sammanslagna prover, notera rumsliga variationer-</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Antalet prover beror på vattnets storlek. Provtagningstrategi så som sammanslagna underprover kräver färre antal prover för detektera arterna. Om rumslig utbredning är av intresse behövs fler provpunkter och filter. Varierande strandtopografi kräver flera prover för att täcka de olika habitaterna</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Då det gäller rinnande vatten beror antalet prover på älvens/flodens längd och prover tas med jämna mellanrum.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Antalet prover beror på om tidvatten och strömmar skall tas i beaktande.</li> <li>Djupprofiler med djupt vatten och ytvatten kan behövas och ökar då antalet prover.</li> <li>Antal replikat per lokal beror på hur proverna har samlats in.</li> <li>Två till tre replikat förbättrar definitivt resolutionen av antalet arter.</li> </ul>
<b>Hur mycket? Vattenvolym</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Provvolymer beror på flera faktorer (inkluderande grumlighet som anges nedan)</li> <li>Majoriteten av eDNA analyser idag fokuserar på filtrerade vattenvolymer mellan en halv och 5 liter.</li> <li>Provvolymer reflekteras även av provtagningstrategi, och om sammanslagna underprover används.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mindre våtmarker kräver mindre provvolym än stora sjöar och volymer av filtrerat vatten begränsas lätt av filter som täpps till av organiskt material.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>eDNA från större floder är stokastisk fördelat och kan vara mycket utspädd jämfört med mindre rinnande vatten eller sjöar.</li> <li>Delprover som sammanslås är viktiga för goda resultat.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>DNA 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.</li> </ul>
<b>Sikt och grumlighet</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Notera grumlighet och humusrika vatten.</li> <li>- Grumliga vatten kan försaka tilltäppta filter, förlänga filtreringstid och orsaka PCR inhibition av DNA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Grumlighet och hög humushalt är vanliga. Undvik att röra upp bottenstrukturer vid provtagning.</li> <li>Förfiltrering med filter av större porstorlek rekommenderas vid problem.</li> <li>Notera regnigt väder eller algbloomningar.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Notera sikt, halokliner och termokliner.</li> </ul>

## 7. Referenser

- Bista I, Carvalho GR, 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.
- 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.
- Bylemans J, Gleeson DM, Hardy CM, 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.
- Deiner K, Bik HM, Machler E, Seymour M, Lacoursiere-Roussel A, Altermatt F, S. Creer, m.fl. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities." *Molecular Ecology* 26: 5872–95.
- Deiner K, Altermatt F. 2014. Transport Distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS ONE* 9: e88786.
- Deiner K, Fronhofer EA, Mächler E, Walser JC, Altermatt F. 2016. Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nature Communications* 7: 12544.
- Deiner K, Lopez J, Bourne S, Holman L, Seymour M, Grey EK, 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>.
- Deiner K, Walser JC, 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>.
- Doi H, Fukaya K, Oka SI, Sato K, Kondoh M, Miya M. 2019. 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: 3581.
- Ficetola GF, 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 CS, Turner CR, Deiner K, Klymus KE, Thomsen PF, Murphy MA, Spear SF, 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>.
- Hellström M, Spens J. 2017 a. eDNA - Fiskförekomst i 10 kustmynnande vattendrag, Norrbottens län. *AquaBiota Report* 2017:10. 30 sid. ISBN: 978-91-85975-67-9
- Hellström M, Spens J. 2017b. eDNA - Fiskinventering vid Spjutmo kraftverk. *AquaBiota Report* 2017:12. 29 sid. ISBN: 978-91-85975-69-3
- Hellström M, Wijkmark N, Spens J. 2018. Fiskinventering med hjälp eDNA i Ore Älv, Dalarnas län. *AquaBiota Report* 2018:11. 23 sid. ISBN: 978-91-85975-80-8
- Hellström M, Andersson-Li M, Brys R, Halfmarten D, Hänfling B, Näslund J, Sjöstedt J, Spens J, Tang C, Öhman MC, Bruce K. 2021. Riktlinjer för hantering av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöanalys. Del II: LaboratoriekraV och eDNA-extraktioner. *AquaBiota Report* 2021:10
- 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.
- Jerde CL, Chadderton WL, Mahon AR, Renshaw MA, Corush J, Budny ML, Mysorekar S, Lodge DM. 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 CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM. 2011. Sight-Unseen' detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263x.2010.00158.x>.

- Jerde CL, Olds BP, Shogren AJ, Andruszkiewicz EA, Mahon AR, Bolster D, Tank JL. 2016. Influence of stream bottom substrate on retention and transport of vertebrate environmental DNA. *Environmental Science & Technology* 50: 8770–79.
- Lee A, McVey J, Faustino P, Lute S, Sweeney N, Pawar V, Khan M, Brorson K, Hussong D. 2010. Use of hydrogenophaga pseudoflava penetration to quantitatively assess the impact of filtration parameters for 0.2-micrometer-pore-size filters. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 695–700.
- Leese F, Altermatt F, Hellström M + 103 författare och 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
- 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.aacr.2018.01.001). <https://doi.org/10.1016/bs.aacr.2018.01.001>.
- Li J, Lawson Handley LJ, Harper LR, Brys R, Watson HV, Muri CD, Zhang X, Hänfling B. 2019. Limited dispersion and quick degradation of environmental dna in fish ponds inferred by metabarcoding. *Environmental DNA*. <https://doi.org/10.1002/edn3.24>.
- Longmire JL, Baker RJ, 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>.
- Macher JN, Leese F. 2018. "eDNA Metabarcoding of Rivers: Is all eDNA everywhere, all the time?" *Proceedings of the 5th European Congress of Conservation Biology*
- Mächler E, Deiner K, Spahn F, Altermatt F. 2016. Fishing in the water: Effect of sampled water volume on environmental DNA-based detection of macroinvertebrates. *Environmental Science & Technology* 50: 305–12.
- Moushomi R, Wilgar G, Carvalho G, Creer S, Mathew Seymour M. 2019. Environmental DNA size sorting and degradation experiment indicates the state of daphnia magna mitochondrial and nuclear eDNA is subcellular. *Scientific Reports* 9: 12500.
- Näslund J, Didrikas T, Hellström P, Hellström M. 2019. Inventering av fiskfaunan i Gåsefjärden, Karlskrona Skärgård, med nätprovfiske och eDNA. *AquaBiota Report* 2019:15. ISBN: 978-91-89085-02-2
- Olds BP, Jerde CL, Renshaw MA, Li Y, Evans NT, Turner CR, Deiner K, m.fl. 2016. Estimating species richness using environmental DNA. *Ecology and Evolution* 6: 4214–26.
- 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>.
- Shogren AJ, Tank JL, Andruszkiewicz E, Olds B, Mahon AR, Jerde CL, Bolster D. 2017. Controls on eDNA Movement in streams: Transport, retention, and resuspension. *Scientific Reports* 7: 5065.
- Shogren AJ, Arial J, Tank JL, Egan SP, August O, Rosi EJ, Hanrahan BR, Renshaw MA, Gantz CA, Bolster D. 2018. Water flow and biofilm cover influence environmental dna detection in recirculating streams. *Environmental Science & Technology* 52: 8530–37.
- Snyder DE. 2003. Invited overview: Conclusions from a review of electrofishing and its harmful effects on fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. <https://doi.org/10.1007/s11160-004-1095-9>.
- Spens J, Evans AR, Halfmaerten D, Knudsen SW, Sengupta ME, Mak SST, Sigsgaard EE, 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>.

- Turner CR, Barnes MA, Xu CCY, Jones SE, Jerde CL, Lodge DM. 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution* 2014 5: 676–84.
- Wegleitner BJ, Jerde CL, Tucker A, Chadderton WL, Mahon AR. 2015. Long duration, room temperature preservation of filtered eDNA samples. *Conservation Genetics Resources*. <https://doi.org/10.1007/s12686-015-0483-x>.
- Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, Lowe WH, Schwartz MK. 2015. Environmental DNA particle size distribution from brook Trout (*Salvelinus Fontinalis*). *Conservation Genetics Resources*. <https://doi.org/10.1007/s12686-015-0465-z>.
- Yinqiu J, Huotari T, Roslin T, Schmidt NM, Wang J, Yu DW, Ovaskainen O. 2019. SPIKEPIPE: A metagenomic pipeline for the accurate quantification of eukaryotic species occurrences and intraspecific abundance change using dna barcodes or mitogenomes. *Molecular Ecology Resources*, July. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13057>.

## 8. Projektöversikt och författaraffiliering

### 8.1 Om projektet

Naturvårdsverkets och Havs och Vattenmyndighetens satsning ”forskningsmedel för DNA-metoder inom miljöövervakning”. Projektet LifeDNAquatic (Dnr 802-0183-18). Författarna svarar själv för innehållet och anges vid referens till forskningen 2019 - 2022.

#### *Projektledare*

- Marcus C Öhman

#### *Vetenskaplig projektledare*

- Micaela Hellström

#### *Deltagande forskare i LifeDNAquatic*

- Marcus C Öhman, AquaBiota Water Research, Sverige
- Micaela Hellström, MIX Research, Sverige
- Martin Andersson-Li, AquaBiota Water Research, Sverige
- Jessica Sjöstedt, MoRe Research, Sverige
- Johan Näslund, Naturvårdsverket (initialt AquaBiota Water Research), Sverige
- Johan Spens, SLU/Limnordic, Sverige
- Rein Brys, Research Institute Nature and Forest (INBO), Belgien
- David Halfmarten, Research Institute Nature and Forest (INBO), Belgien
- Kat Bruce, NatureMetrics, Storbritannien
- Cuong Tang, NatureMetrics, Storbritannien
- Bernd Hänfling, University of Hull, Storbritannien

Innehållet i denna rapport baseras delvis på en rapport inom EU konsortiet COST DNAquaNet inom arbetsgrupp WG3 där Kat Bruce, Rosetta Blackmann, Sarah Bourlet, Micaela Hellström och Kristy Deiner är huvudförfattare.

## 9. Tack

Tack till Ylva Jondelius för kommentarer och konstruktiva eDNA-diskussioner. Tack till Henrik Appelgren och Gunilla Ejdung som granskade rapporten.