

# DNA-baserad övervakning av arter i akvatisk miljö

Verifiering och tillämpning

---

Per Sundberg, Matthias Obst,  
Marina Panova

RAPPORT 7157 | JULI 2024



# DNA-baserad övervakning av arter i akvatisk miljö

Verifiering och tillämpning

av Per Sundberg, Matthias Obst och Marina Panova

NATURVÅRDSVERKET

**Beställningar**

Ordertel: 08-505 933 40

E-post: natur@cm.se

Postadress: Arkitektkopia AB, Box 110 93, 161 11 Bromma

Internet: [www.naturvardsverket.se/publikationer](http://www.naturvardsverket.se/publikationer)

**Naturvårdsverket**

Tel: 010-698 10 00

E-post: [registrator@naturvardsverket.se](mailto:registrator@naturvardsverket.se)

Postadress: Naturvårdsverket, SE-106 48 Stockholm

Internet: [www.naturvardsverket.se](http://www.naturvardsverket.se)

ISBN 978-91-620-7157-8

ISSN 0282-7298

© Naturvårdsverket 2024

Tryck: Arkitektkopia AB, Bromma 2024

Omslagsfoto: Per Sundberg



# Förord

Här presenteras resultaten från forskningsprojektet ”eDNA i miljöövervakningen och analysen av biodiversitet – kvarstående frågor” med rapporten DNA-baserad övervakning av arter i akvatisk miljö – verifiering och tillämpning. Projektet är ett av åtta projekt som genomförts inom forskningsansatsningen DNA-metoder inom miljöövervakning. Med forskningsområdet ville Naturvårdsverket och Havs- och vattenmyndigheten stödja forskning som kan bidra till en bättre och effektivare miljöövervakning genom införande av DNA-baserad analysteknologi.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag.

Rapporten har skrivits av Per Sundberg, Matthias Obst och Marina Panova (Göteborgs universitet, Institutionen för marina vetenskaper).

Rapporten har granskats för vetenskaplig kvalitet av Frode Fossøy (NINA, Norge) och för praktisk relevans av Michael Haldin (Havs- och vattenmyndigheten).

Författarna svarar för rapportens innehåll.

Naturvårdsverket i juli 2024

Marie Uhrwing

Avdelningschef, Hållbarhetsavdelningen

# Innehåll

|   |    |
|---|----|
| <b>Förord</b>   | 3  |
| <b>Sammanfattning</b>   | 5  |
| <b>Summary</b>  | 6  |
| <b>1. Inledning</b>   | 7  |
| 1.1 Bakgrund och kontext  | 7  |
| 1.2 Projektets frågeställningar och genomförda tillämpningar                    | 7  |
| 1.3 Genomisk DNA <i>versus</i> eDNA   | 8  |
| <b>2. Metodik</b>   | 9  |
| 2.1 Sanger sekvensering   | 9  |
| 2.2 Målarts-analys med digital PCR  | 9  |
| 2.3 Flerartsanalys med metabarcoding  | 11 |
| 2.4 Verifiering av eDNA   | 11 |
| 2.5 Data publicering  | 12 |
| <b>3. Resultat</b>  | 14 |
| 3.1 Metodologiska studier   | 14 |
| 3.1.1 Nedbrytning av smörbult DNA och betydelse för tolkning av resultat        | 14 |
| 3.1.2 Verifiering av eDNA metoder   | 15 |
| 3.2 Övervakning främmande arter   | 20 |
| 3.2.1 Övervakning av främmande arter i hamnar                                   | 21 |
| 3.2.2 Jämförande studier av eRAS <i>versus</i> eDNA i Wallhamn                  | 24 |
| 3.2.3 Undersökning av sekundär spridning av främmande arter på fritidsbåt-skrov | 25 |
| 3.2.4 Utbredning och spridningsmönster av en invasiv foraminifer                | 27 |
| 3.3 Övervakning av rödlistade och fridlysta arter                               | 29 |
| 3.3.1 Övervakning av rödlistade stormusslor i Sollumsån                         | 29 |
| 3.3.2 Övervakning av rödlistade stormusslor i Alsterån och Virån                | 30 |
| 3.4 Övervakning av allmän biologisk mångfald                                    | 33 |
| 3.4.1 Skattning av marin biodiversitet med eDNA                                 | 33 |
| 3.4.2 Mot ett genetisk övervakningsprogram                                      | 35 |
| <b>4. Diskussion</b>  | 36 |
| <b>5. Slutsatser och rekommendationer</b>                                       | 39 |
| <b>6. Tack</b>  | 40 |
| <b>7. Källhänvisning</b>  | 41 |

# Sammanfattning

Det finns idag många exempel på hur miljö-DNA/eDNA används framgångsrikt i miljöövervakningen, inte bara som komplementär metod utan också situationer där tekniken kan ersätta befintliga metoder. De flesta tillämpningarna har berört fisk-samhällen i limniska miljöer där det också finns bra och täckande referensbibliotek för bioinformatisk analys av sekvensdata. Det finns dock flera områden och tillämpningar där tekniken inte är lika använd, eller testad. Det gäller till exempel frågan om huruvida alla taxa är lika lätta att detektera med eDNA? Fiskar är (generellt sett) stora och de rör på sig, släpper därför ifrån sig stora mängder DNA som kan fångas upp och analyseras. Men hur är det med andra taxa, och hur fungerar eDNA i mer utmanade miljöer som havet där både artantalet är mycket större, täcker många olika djurstammar, och miljön inte lika sluten? Det finns också andra frågor som behöver belysas och diskuteras när eDNA och DNA-baserad identifiering av arter ska användas inom miljöövervakningen. Det gäller risken för falska positiva svar och, kanske ännu viktigare, risken för falska negativa svar. Bägge felen kan få stor betydelse speciellt när det kommer till övervakningen av främmande invasiva arter. Hur många prov måste tas och hur ska provtagningen gå till – frågor som länge har diskuterats inom ekologi men inte lika framträdande i miljöövervakningen. Hur verifierade är övervakning baserad på eDNA jämfört med andra mer traditionella metoder, och hur ser resultaten ut?

Rapporten tar upp en del av dessa frågor genom jämförande studier, kontrollerade försök i fält, och mesokosm-experiment. Studierna har genomförts både i den limniska och marina miljön och berör flera olika arter och djurstammar. Vi kan visa att i vissa fall är eDNA bättre på att hitta arter och ger en mer heltäckande bild av djursamhällen, eller hittar arter bättre än traditionella metoder. Experiment visar också att vissa arter är svåra att upptäcka med eDNA vilket ger hög risk för falska negativa. Övervakning av främmande arter är ett fall där DNA-metoder är klart överlägsna de metoder/protokoll som nu används. Vi belyser också vikten av verifiering av eDNA med några exempel där andra metoder (provfiske, elfiske, visuella observationer) har använts parallellt med eDNA. Vi efterfrågar också en större förståelse för vikten av att rapportera undersökningar mer utförligt och standardiserat och att underliggande data görs tillgängliga för utvärdering och andra typer av analyser.

# Summary

There are many examples of how environmental DNA/eDNA is used successfully in environmental monitoring, not only as a complementary method but also in situations where the technology can replace existing methods. Most of the applications have concerned fish communities in limnic environments where there are also good and comprehensive reference libraries for bioinformatic analysis of sequence data. However, there are several areas and applications where the technology is not as used, tested, or confirmed. This applies, for example, to the question of whether all taxa are equally easy to detect with eDNA? Fish are (generally speaking) large and they move, therefore releasing large quantities of DNA that can be captured and analyzed. But what about other taxa, and how does eDNA work in more challenging environments such as the sea where both the number of species is much larger, covers many different animal phyla, and the environment is not as closed? There are also other issues that need to be elucidated and discussed when eDNA and DNA-based identification of species are to be used in environmental monitoring. This applies to the risk of false positive results and, perhaps more importantly, the risk of false negative results. Both errors can be of great importance, especially when it comes to the monitoring of alien invasive species. How many samples must be taken and how should the sampling be done – questions that have long been discussed in ecology but not as prominent in environmental monitoring. How verified is monitoring based on eDNA compared to other more traditional methods, and what do the results look like? This report addresses some of these questions through comparative studies, controlled field trials, and mesocosm experiments. The studies have been carried out in both limnic and marine environments and concern several different species and animal taxa. We can show that in some cases eDNA is better at finding species and provides a more comprehensive picture of animal communities or finds species better than traditional methods. Experiments also show that some species are difficult to detect with eDNA, which gives a high risk of false negatives. Alien species monitoring is a case where DNA methods are clearly superior to the methods/protocols currently used. We also highlight the importance of verification of eDNA with some examples where other methods (sample fishing, electrofishing, visual observations) have been used in parallel with eDNA. We also request a greater understanding of the importance of reporting surveys in more detail and in a standardized manner and that underlying data are made available for evaluation and other types of analysis.

# 1. Inledning

## 1.1 Bakgrund och kontext

Utvecklingen av tekniker för DNA-sekvensering i slutet av förra seklet innebar att genetisk information blev tillgängligt för en större grupp forskare och biologer. Därmed startade en stor förändring inom systematik, taxonomi, och ekologi. DNA-sekvenser inte bara gick att koppla ihop med identifierade arter och deras namn, utan nu började sekvensdata också användas för att skatta arters och grupper evolutionära historia, deras fylogener. Möjligheten att kunna frigöra taxonomer från artbestämning (dvs "taxonomic service") och i stället använda sekvenser för identifiering (det som senare myntades med begreppet "DNA-barcoding") möttes till att börja med av skepsis bland professionella taxonomer. Samtidigt förstod och insåg många ekologer omedelbart potentialen i möjligheterna, speciellt när antalet taxonomiska experter var en grupp på nedåtgående. Dessutom kunde DNA användas för att identifiera arter i alla livsstadier och inte, som ofta, krävde adulta individer av en art. Idag är DNA-barcoding en accepterad och etablerad metod för att säkerställa identifiering av arter och som ett redskap med många tillämpningar inom ekologi, miljöövervakning, och naturvård.

I början krävde teknikerna för sekvensering en relativ stor mängd DNA och var därför beroende av att det fanns tillgängligt vävnad av den art som skulle sekvenseras. Allteftersom teknikerna utvecklades blev det möjligt att utgå ifrån mindre mängder DNA och detta öppnade upp möjligheten att kunna använda de spår av DNA som organismer lämnar ifrån sig som bas för undersökningar. För detta har begreppet miljö-DNA, eller kanske mer vanligt nu eDNA (från engelskans "environmental DNA") myntats. eDNA öppnar för helt andra möjligheter inom miljöövervakningen att hitta arter i olika miljöer utan att de behöver visuellt observeras eller samlas in. Beroende på hur omfattande referensbibliotek är blir det också möjligt att identifiera många arter utan behov av taxonomiska experter och tidskrävande processer för artbestämning. Detta blir speciellt tydligt i den marina miljön där den biologiska mångfalden sträcker sig över runt 30 olika djurstammar – något som inte ens den mest erfarne och kompetenta taxonomiska experter har en möjlighet att täcka. Tekniken är också mindre invasiv i bemärkelsen att den inte till exempel kräver provfiske för att bestämma fiskförekomst i en sjö.

## 1.2 Projektets frågeställningar och genomförda tillämpningar

Projektet "*eDNA in environmental monitoring and biodiversity assessment – remaining issues*" har inte varit inriktad på någon speciell organismgrupp eller specifika arter, det enda gemensamma är att det uteslutande har handlat om akvatiska miljöer. Det har i stället handlat om mer generella frågeställningar som att se över områden där DNA-baserad övervakning fungerar bättre än, eller kompletterar, mer traditionella. Andra frågor har handlat om huruvida olika taxonomiska grupper släpper ifrån sig olika mycket DNA och hur detta påverkar möjligheten att



påvisa arter från olika grupper (taxa). Andra frågor som ingått i projektet handlar om direkta jämförelser med traditionella/etablerade metoder, hur länge finns DNA i vattnet efter källan försvunnit, och hur långt ifrån källan går det att påvisa en art. Vi har också lyft upp betydelsen av att verifiera DNA metoder inom miljöövervakningen. Det finns många exempel på framgångsrika tillämpningar av eDNA, speciellt när det gäller fisksamhällen och limnisk miljö, men teknikerna är inte alltid verifierade initialt med andra mer etablerade provtagningsmetoder och det kan påverka tolkningen av resultaten. Speciellt när det gäller risken för falska negativa svar, något vi ser som ett potentiellt problem med eDNA-baserad övervakning. I arbetet med projektet uppmärksammade vi också att dokumentationen när det kommer till eDNA-genomförda undersökningar inte alltid uppfyller de krav som bör ställas (Sundberg et al. 2020). Vi har därför i projektet utvecklat bättre rutiner, standarder, och analytiska arbetsflöden för dokumentation av genetiska data tillsammans med metadata i öppna databaser. Utan tillgängliga bakgrundsdata blir det inte bara svårt för andra att utvärdera resultat utan också hindrar framtida fördjupade analyser.

Det har varit angeläget att visa hur eDNA praktiskt kan användas i konkreta miljöövervakningar och skattningar av biodiversitet och inte bara bli en akademisk forskningsfråga. Under projektets gång har vi därför arbetat parallellt med tillämpningar, dels genom uppdrag till Göteborgs Universitet, men framför allt i uppdrag till företaget SeAnalytics AB där vi direkt har kunnat applicera ny kunskap på reella frågeställningar och testa olika tekniker för verifiering.

Fyra viktiga metodologiska tillvägagångssätt har testats under projektets gång. Här ingår Sanger sekvensering, målartsanalys med digital PCR, metabarcoding analys, och verifiering av eDNA. Dessa metoder har testats med specifika studier inom följande fyra tillämpningsområden: metodologiska studier, övervakning av främmande arter, övervakning av röd-listade och fridlysta arter, och övervakning av allmän biologisk mångfald. För varje test rapporterade vi de individuella slutsatserna, medan vi drar en övergripande konklusion i slutet av rapporten.

### 1.3 Genomisk DNA *versus* eDNA

Projektet fokus har varit på metodologiska och praktiska frågeställningar med syfte att påskynda implementering och tillämpning av DNA-baserade metoder i miljöövervakning. Av den anledning inkluderade vi inte bara eDNA studier utan också undersökningar med genomisk DNA, dvs analys av vävnad, bulk- och planktonprover.

## 2. Metodik

Provtagning av DNA samt den analytiska metodiken beror alltid på den frågeställningen som övervakningsprojektet ämnar svara på. I detta kapitel beskriver vi olika metoder som kan användas individuellt eller i samspel tillsammans med exempel på typiska frågor som dessa metoder kan svara på.

### 2.1 Sanger sekvensering

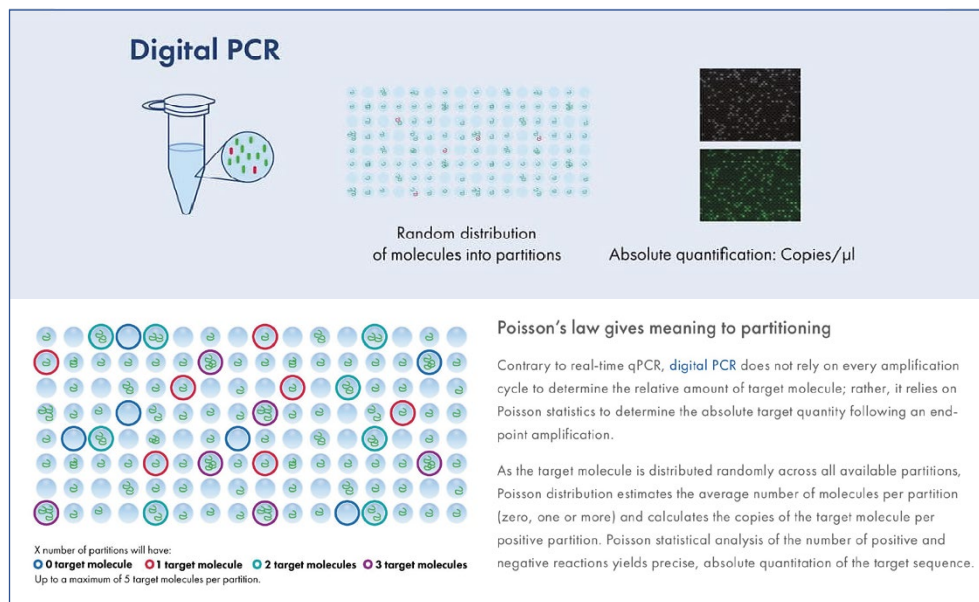
Sanger-sekvensering är en väl-etablerad DNA-sekvenseringsmetod som kan användas för riktad sekvensering av specifika genomiska regioner i enstaka arter eller individer. Ett typiskt exempel på tillämpning är att man hittar en okänd, förmodad främmande, eller rödlistad art men vill konfirmera dess identitet med genetiska metoder. I dessa fall kan man extrahera DNA från artens vävnad och sekvensera ett streckkodningsfragment, tex av genen cytochrome *c* oxidase I (COI). Sekvensen kan manuellt bearbetas och jämföras med streckkodningsdatabaser som tex BOLD. Det är viktigt att använda positiva kontroller för att testa att metoden fungerar, negativa kontroller för att testa för kontamination, dokumentera allt analytiskt arbete, och rapportera eventuella nya artobservationer till nationella databaser.

Inom ramen för detta projekt har vi tillämpat Sanger-sekvensering i en studie där vi undersökte förekomsten av främmande arter i påväxten på fritidsbåtar (se Resultat, kapitel 3.2). Rapporten visar att Sanger sekvensering är en lämplig metod för att identifiera vävnadsprover av okända arter, särskilt om det finns risk för förväxling med likande arter.

### 2.2 Målarts-analys med digital PCR

Målartsanalysen baseras på PCR (Polymerase Chain Reaction) och bygger på att en kort DNA-sekvens som är unik för arten som ska inventeras amplifieras (mångfaldigas) i PCR-reaktionen. Det är den processen som kan detekteras på olika sätt, beroende på vilken teknik som används. Det första steget i en målartsanalys baserad på den här tekniken är att designa och testa ett primer-par som är unikt för arten så att det med säkerhet går att säga att det bara är DNA från den eftersökta arten som amplifieras i PCR-reaktionen. Det här steget innefattar också test med närliggande arter, och att hitta just den molekylära markör som ger en unik sekvens för arten. Dessa steg motsvarar nivåerna 1–2 i Figur 2 nedan ("Verifiering av eDNA"). Vi har använt oss av dPCR ("digital PCR") i stället för det kanske mer vanligt förekommande qPCR till den här typen av analyser. Projektet har använt QIAcuity One plattform utvecklat av QIAGEN. Det är baserat på en form av mikrofluid teknik där varje enskild PCR-reaktion delas upp i ett stort antal (runt 26 000) partitioner. Detta gör dels att det blir lätt att kvantifiera i hur många partitioner det sker en PCR-reaktion (blir alltså ett direkt mått på mängden målarts-DNA). Uppdelningen innebär också att annat DNA inte stör amplifieringen som annars kan ske, och detta gör att känslig-

heten ökar. dPCR har en högre känslighet än qPCR (Doi et al. 2015; Hunter et al. 2017; Stelzer et al. 2023) och kan detektera även väldigt låga koncentrationer av DNA-molekyler i ett prov (Figur 1).



Figur 1. Schematisk och grafisk beskrivning av de olika stegen i en digital PCR analys.

Källa: <https://www.qiagen.com/us/applications/digital-pcr/beginners>

I första steget blandas det extraherade DNA med olika reagenser, gröna prickar DNA från målarten och rött bakgrunds-DNA. I det här steget läggs också till negativa (blanka) prov som test av kontamination, plus positiva prov med DNA från målarten. Nästa steg är att partitionera lösningen i flera tusen individuella reaktioner där en PCR-reaktion sker i varje partition. Partitioner med målarts-DNA är här markerade grönt, mängden positiva partitioner är kopplat till antalet ursprungsmolekyler. Positiva partitioner detekteras genom att ett fluorescerande ämne aktiveras i fungerande PCR och som kan avläsas i systemet. I nästa steg görs en beräkning av medeltalet positiva partitioner baserat på en Poisson-fördelning. Utifrån denna analys går det sedan att beräkna/skatta mängden målarts-DNA i provet. Metoden kan detektera väldigt låga koncentrationer av målartens DNA: ner till 0,1 kopior per  $\mu$ l PCR reaktion, vilket motsvarar 40 kopior i ett vattenprov (PCR reaktions volym är 40  $\mu$ l, DNA volym som testas i varje reaktion är 10  $\mu$ l, totalt DNA volym efter extraktion från filter är 100  $\mu$ l, och volym vatten som filtreras genom filter varierar).

Typiska exempel på målartsanalys är när förekomsten av en (eller ett fåtal) arter ska undersökas genom ett stort antal provtagningar. Inom ramen för detta projekt har vi tillämpat målartsanalys i flera studier av som rapporteras i kapitel 3.1, 3.2.4, och 3.3.

## 2.3 Flerartsanalys med metabarcoding

Metabarcoding är en molekylärbiologisk teknik som används för att identifiera och kvantifiera olika arter i ett prov genom att analysera DNA-markörer. Det involverar amplifiering och sekvensering av specifika genetiska regioner, såsom streckodsregionen, som är unik för varje art. De insamlade DNA-data jämförs sedan med referensdatabaser för att identifiera de organismer som finns i provet. Metabarcoding är särskilt användbar för att studera hela artsammansättningen i ett ekosystem i kontrast till Sanger-sekvensering och målartsanalys som är riktat mot en art så få man med metabarcoding information om de flesta arter i ett prov. Man får dock oftast inte detaljerad information om arters abundans och analysen kräver NGS sekvensering och bioinformatisk tolkning. Detta medför högre kostnader och tidsåtgång för analyser men samtidigt får det vägas mot syftet med undersökningen.

Några av studierna som ingår i projektet har inneburit analys av artssammansättning och då har metabarcoding använts. Detaljerade beskrivningar återfinns i de citerade rapporterna i kapitel 3.2.1, 3.2.2, 3.4. Flera olika markörer har använts i de olika undersökningarna, en del specifika för fisk och andra mer generella för evertebrater. I fallet med skattning av marin biodiversitet (Staehr et al. 2022) gjordes eDNA insamlingen parallellt med artbestämning av dykare och blev därigenom också ett test av vilka organismer/taxa som inte hittades med eDNA, och *vice versa*.

## 2.4 Verifiering av eDNA

Det finns många exempel på framgångsrika undersökningar baserade på eDNA (speciellt när det gäller fisksamhällen i den limniska miljön) men det finns fortfarande faktorer som behöver klargöras innan tekniken till fullo kan användas inom miljöövervakningen. Även om det finns en risk för falska positiva svar så är de förmodligen lättare att hantera. I studier av fisksamhällen med metabarcoding kan en detaljerad analys av suspekta arter visa på risken för sammanblandning med andra (mer troliga) arter. Falska positiva svar kan också uppkomma när DNA har transporterats från andra områden, eller kontaminering från till exempel fiskrens i en sjö. Här kan det vara till hjälp med att veta hur länge DNA finns kvar i miljön efter källan försvunnit. I kapitel 3.2 redovisar vi ett försök som undersöker just den frågan.

Vi anser att frågan om falska negativa svar är mer komplex och innefattar flera faktorer som inte är utredda. Var ligger gränsen när det gäller mängd DNA i miljön för upptäckt av en art? Hur många prov behöver tas, och var i undersökningsområdet? Hur är målarten/-arterna spridda, hur påverkar vädret och tid på året. Wacker et al. (2019) till exempel visar att mängden DNA från flodpärlmussla varierar beroende på när under året proverna togs. Vi har också sett samma variation i egna studier av musslor och strömming.

Det finns ett stort behov av att eDNA-tekniker verifieras och också att resultaten sätts i relation till olika abiotiska faktorer. Thalinger et al. (2021) föreslår en femgradig skala som kan användas för att bedöma hur mogen eDNA tekniken är för att användas rutinmässigt i miljöövervakningen (Figur 2).

| Nivå 1  | Nivå 2   | Nivå 3   | Nivå 4   | Nivå 5   |
|---|--|--|--|--|
| Assay-design klar (PCR – primers, reaktioner, etc). | Assay optimerad och testad på närliggande arter. | Assay testad på eDNA prover från fält med positiv respons. | Gräns för detekterbarhet ("Limit of detection" (LOD)). | Statistisk analys av sannolikheter för att påvisa DNA och risken för falska negativa.. |
| <i>Testat på vävnad från mållart.</i>               | <i>Vävnad från taxonomiskt närliggande arter</i> | <i>Verifierad med andra observationer</i>                  | <i>Kräver omfattande test i fält</i>                   | <i>Statistisk modellering och tester i fält.</i>                                       |

Figur 2. Fem nivåer i verifieringen av hur färdig en eDNA teknik är för att användas fullt ut i miljöövervakningen. Modifierad efter Thalinger et al. (2021).

Från rapporter och artiklar framgår att i de flesta fall har utförare bara nått nivå 2. I projektet har vi nått nivå 3 för studier av solaborre, lädersjöpfung, svartmunnad smörbult, filtsjöpfung och flodpärlmussla men många frågor kvarstår. Det blir också mer komplicerat i metabarcoding-studier som ska täcka flera djurgrupper. I Staehr et al. (2022) belyser vi det här problemet, och visar också på hur detekterbarheten varierar med olika taxonomiska grupper och vilka primer-sekvenser som används.

En stor risk med olika övervakningsmetoder är risken för falska negativa, det vill säga att en art finns i undersökningsområdet men upptäcks inte. Detta är ett generellt problem som gäller även andra tekniker som till exempel provfiske men bör utredas och förhoppningsvis statistiskt säkerställas. Problemet blir tydligt när det kommer till risken att tidigt upptäcka främmande invasiva arter. Vi vet att till exempel blåskrabba inte släpper ifrån sig tillräckligt med DNA för att kunna upptäckas i fält trots kort avstånd till krabban och en verifierad assay (Sundberg et al. 2016). En pilotstudie på vitfingrad brackvattenkrabba visade på samma resultat (Panova et al. 2022). Här är det klart att eDNA inte kan användas för att övervaka dessa arter utan kräver ytterligare utredning under vilka omständigheter det skulle fungera (med hänsyn till årstid, habitat, osv.).

Att uppnå nivå 4 och 5 i Figur 2 skulle kräva kontrollerade försök under olika omständigheter för nivå 4. För nivå 5 handlar det nog om modelleringar givet olika värden för abundans och patchiness och kunde resultera i hur stort stickprov som krävs för att ge en viss risk för falska negativa svar. Vi noterar att i många rapporter som baseras på eDNA saknas det ofta den typ av statistiska diskussioner som normalt finns i andra typer av rapporter. Sundberg et al. (2020) lyfte fram detta som ett problem när det kom till att utvärdera olika undersökningar.

## 2.5 Data publicering

En viktig del av hela projektet handlade om att testa olika metoder för hantering och publicering av genetiska data och därigenom bidra till utveckling av genetiska databaser för ekologisk forskning och naturvård. Detta arbete blev ett bidrag i utveckling av den Svenska biodiversitetsdata infrastrukturen SBDI ([www.biodiversitydata.se](http://www.biodiversitydata.se)) som nu erbjuder resurser och tjänster för publicering och analys. Rå genetiska sekvensdata (fastq) och rensade genetiska data (fasta format) som genererades i projektet deponerades i publika databaser och beskrivs i respektive vetenskapliga publikationer och rapporter.

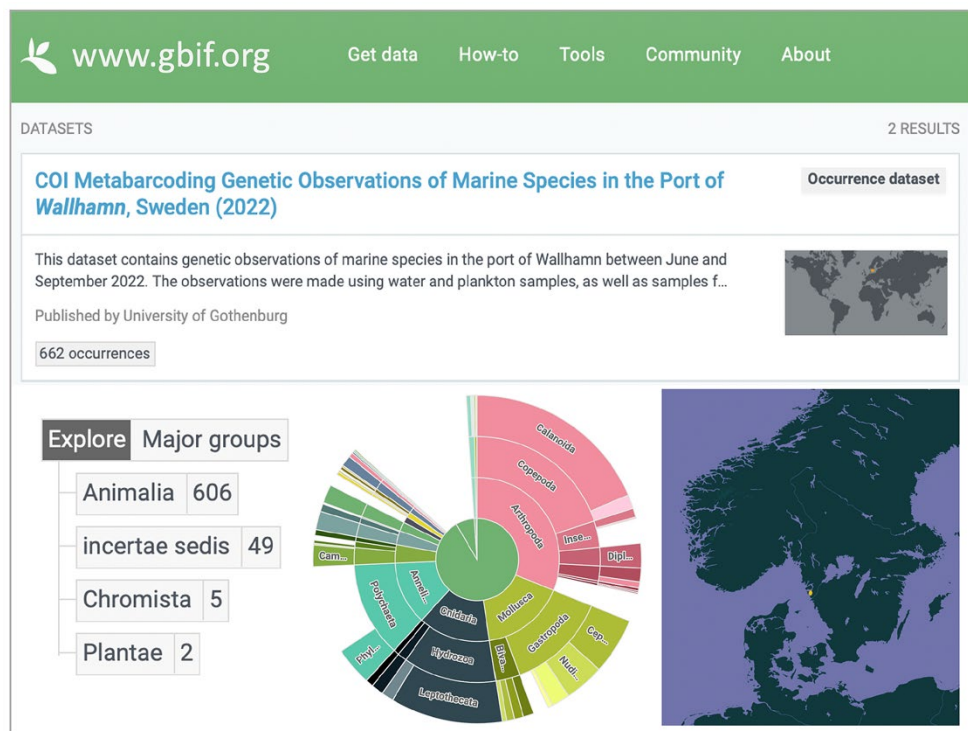
Alla genetiska data och bilddata som skapades inom hårdbotten projekt (kapitel 3.4.2) är publicerade på ARMS MBON resurssidan (<https://data.arms-mbon.org>). Vi publicerade dessutom genetiska data från flera projekt i den Svenska ASV-portalen (<https://asv-portal.biodiversitydata.se>) som automatiskt exporterar dessa data till GBIF ([www.gbif.org](http://www.gbif.org), Figur 3). Exempel är

<https://doi.org/10.15468/y3upe9>

<https://doi.org/10.15468/z8pm63>

<https://doi.org/10.15468/cw5jrv>

Genetiska observationer i vissa projekt även skickats till HELCOM's databaser för hamnövervakning <https://portal.helcom.fi/>. Data från eDNA analyser samt dykerobservationer i publikation av Staehr et al. (2022) har gjorts tillgängligt via PlutoF plattformen, projekt 107978 (<https://app.plutof.ut.ee/study/view/107978>).



Figur 3. Exempel på ett genetisk dataset från det nationella övervakningsprogrammet för främmande arter. Dataset innehåller alla sekvenser och identifierade taxa som observerades i prover från Wallhamn, 2022. Datasetet publicerades via Swedish Biodiversity Data Infrastructure till gbif.org (<https://doi.org/10.15468/cw5jrv>).

## 3. Resultat

### 3.1 Metodologiska studier

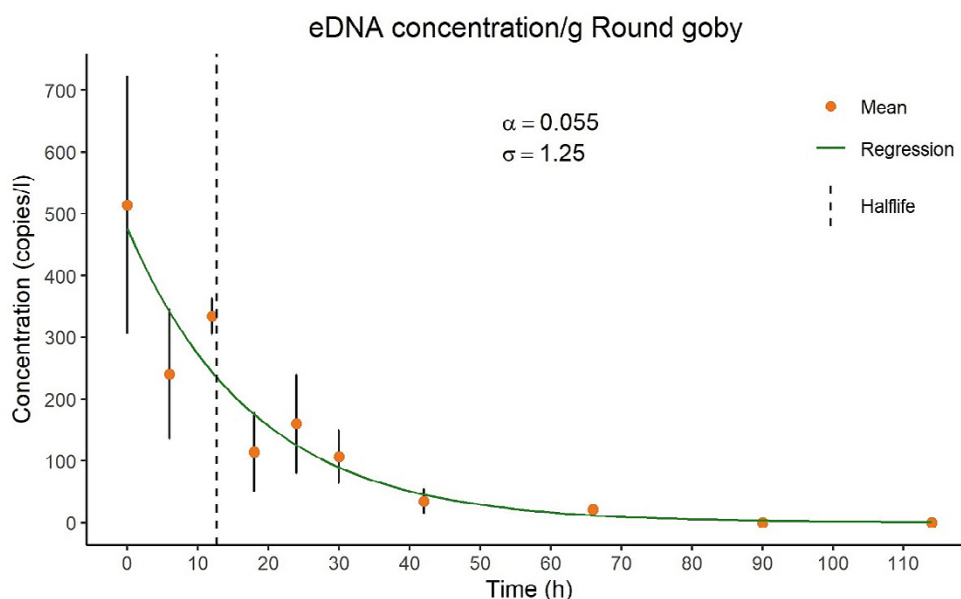
#### 3.1.1 Nedbrytning av smörbult DNA och betydelse för tolkning av resultat

För att undvika falska positiva svar är det viktigt att veta hur länge det finns detekterbart DNA kvar i miljön efter att källan (målarterna) har försvunnit. Om det är lång "livslängd" på DNA:t blir det svårt att veta om det finns levande djur av målarten i till exempel en vik, eller om det är rester av gammalt DNA. När det gäller främmande invasiva arter är det uppenbart att ett falskt positivt svar kan ha stora ekonomiska effekter.

För att testa detta genomfördes ett försök med svartmunnad smörbult (*Neogobius melanostomus*) som model (Axberg 2021; Green et al. 2024). Levande fisk av svartmunnad smörbult förvarades i en tunna med vatten med en salthalt som ska motsvara artens naturliga miljö. Mängden fisk varierades (1, 3 och 5 fiskar), fyra experiment-tunnor per omgång. DNA mättes efter att fiskarna funnits i tunnorna 24 timmar, varefter de togs bort (=tid 0). Därefter togs prover efter 6, 12, 18, 24, 30, 42, 54, 78, 102 och 112 timmar. För varje prov togs 1 L vatten och filtrerades genom 0.22 µm Sterivex filter. Resultaten från försöken slogs samman eftersom fiskarna varierade i storlek och det fanns ingen signifikant korrelation mellan eDNA nivåer och antal fiskar. Sammanlagt togs 120 vattenprov.

Mängden detekterbart DNA minskade snabbt över tid med en skattad halveringstid på 12 timmar (Figur 4). Andra studier rapporterar liknande halveringstider för fisk eDNA, mellan 2–12 timmar (Andruszkiewicz Allan et al. 2020; Kirtane et al. 2021; Sassoubre et al. 2016); nedbrytningen går troligen snabbare i naturliga miljöer med högre halter av bakterier än i akvarieförsök. Efter fyra dagar bedöms halten vara så låg att det är osannolikt att kunna påvisa DNA i en realistisk nivå (Axberg 2021; Green et al. 2024). Om det finns anledning att kontrollera att det inte handlar om ett falskt positivt svar på en lokal bör provtagningen därför göras om efter en vecka.

Resultatet belyser vikten av att filtrera och fixera proverna i direkt anslutning till provtagningen. Nedbrytningshastigheten påverkas av många faktorer och kan förväntas vara snabbare i ett riktigt vattenprov med högre bakteriehalt än i laboratorieexperimentet ovan. Redan några timmar kan göra skillnad i hur mycket DNA som har brutits ner.



Figur 4. Exponentiell nedbrytning av eDNA från svartmunnad smörbult i mesokosm-experimentet. Orange punkt är genomsnittligt antal positiva partitioner per liter med standard error linjer. Den gröna linjen är skattad nedbrytning givet en exponentiell modell för sönderfallet. Skattad halveringstid (streckad vertikal linje) uppnåddes efter 12,4 timmar. Från Axberg (2021).

### 3.1.2 Verifiering av eDNA metoder

När det gäller övervakning av främmande arter är det viktigt att verifiera metoden för att minska risken för falska negativa. Önskvärt vore förstås att alla de steg som tas upp ovan skulle vara genomgångna innan ett övervakningsprogram startar baserat på eDNA så är det i alla fall möjligt att nå nivå tre, det vill säga test i fält. Inom projektet har vi gjort parallella insamlingar av målarter (med fiske) i två fall: svartmunnad smörbult (*Neogobius melanostomus*) och solabborre (*Lepomis gibbosus*). Det finns också indikationer på att kräftdjur släpper ifrån sig DNA i en mindre grad och därför kan vara svåra att upptäcka och bekräfta med eDNA. Tidigare kontrollerade försök (Sundberg et al. 2016) med blåskrabba visade att trots en fungerande assay kunde arten inte påvisas med eDNA i närheten av krabbor (dessa hölls i burar ute i havet). I ett litet pilotförsök undersöktes under kontrollerade förutsättningar om det ändå skulle vara möjligt att använda eDNA för upptäckt av den invasiva vitfingrad brackvattenskrabba (*Rhithropanopeus harrisi*). Resultaten av dessa studier rapporteras kortfattat nedan, för utförligare resultat och undersökningsdetaljer hänvisas till citerade rapporter och publikationer.





Figur 5. Solabborre (*Lepomis gibbosus*) och dammen där arten upptäcktes 2018 (Foto Per Sundberg).

## VERIFIERING MED EL-FISKE

Den invasiva fisken solabborre (*Lepomis gibbosus*) hittades i ett litet viltvatten i närheten av Kungsbacka 2018 (Figur 5). Det året genomfördes en eDNA-baserad undersökning i vattendrag runt och kopplade till dammen för att se om arten spridit sig (Bohman et al. 2018). Det fanns inga indikationer att så var fallet och det genomfördes ett försök att utrota populationen genom att tömma dammen. Under 2022 ville Länsstyrelsen i Halland göra en uppföljning med eDNA och i samband med detta göra en parallell undersökning med elfiske (Sundqvist et al. 2023).

I en första omgång i juni 2022 påträffades inga exemplar av solabborre vid elfisket men det fanns eDNA i en hölja alldeles vid dammen. Detta prov analyserades om flera gånger för att utesluta en falsk positiv signal. I ljuset av detta resultat genomfördes augusti en utökad eDNA provtagning i dammen och i samma hölja som ovan – nu med väldigt tydliga positiva resultat för eDNA analysen (Tabell 1). Samma dag genomfördes också ett utökat elfiske i dammen och höljan. Detta resulterade i fångst av 34 stycken solabborrar i dammen med varierande storlek mellan 2,6–6,2 cm och i höljan fångades en fisk på 5 cm (Sundqvist et al. 2023).

**Tabell 1. Resultatet av förnyad eDNA-provtagning (se text). De låga volymerna filtrerat vatten beror på väldigt mycket partiklar i dammen. Se Sundqvist et al. (2023) för mer detaljer. Signalstyrkan markeras med "+" där + är svagast och +++ starkast signal.**

| Dammen (D) / höljan (H) | filtrerad volym (ml) | dPCR +/- |
|-------------------------|----------------------|----------|
| D1:1                    | 130                  | +        |
| D1:2                    | 130                  | +        |
| D2:1                    | 60                   | ++       |
| D2:2                    | 65                   | +        |
| D3:1                    | 110                  | +++      |
| D3:2                    | 110                  | +++      |
| H:1:1                   | 70                   | ++       |
| H:1:2                   | 60                   | +        |

Indikationen på arten i höljan vid dammen under provtagningen i juni visar på potentialen i tekniken. Det är en liten hölja och elfisket där borde ha visat på förekomst av solabborre om de hade funnits där vid prov-tillfället. Den svaga, men tydliga signalen indikerade att arten fanns i höljan eller uppströms i dammen.

Nytt elfiske senare bekräftade också förekomsten av solabborre både i höljan och uppströms i dammen. Utan eDNA resultaten hade förmodligen arten betraktats som utrotad efter tidigare bekämpningsinsatser då dammen tömts.

Vi betraktar i ljuset av den undersökningen att eDNA kan användas för övervakning av solabborre, men vi vet fortfarande inte hur många prov som behöver tas för att minimera risken för falska negativa, eller hur många fiskar per damm krävs för en eDNA signal. I det här fallet rör det sig om små vatten och bäckar/åar i kombination med en relativt stor organism (fisk) som också rör sig vilket sammantaget är faktorer som gör det lättare att fånga upp DNA-molekyler. Det kan ju också noteras att mängden filtrerat vatten (Tabell 1) är väldigt liten.

Nästa exempel på verifiering handlar om en art i marin, mer öppen miljö, som förmodligen är mer utmanande för tekniken – svartmunnad smörbult (*Neogobius melanostomus*). Denna invasiva främmande art upptäcktes första gången i Karlskrona skärgård 2008. Därefter har fynd rapporterats från många lokaler från Göteborg på västkusten och runt kusten upp till Gävle i Bottenhavet. Det är en art med stor invasions- och spridnings-potential och därför är det viktigt att förekomst och spridning övervakas om man önskar göra några insatser för att minimera spridningen. Övervakning och inventering av fiskförekomster sker traditionellt genom olika typer av provfiske vilket är tidskrävande och destruktivt eftersom även andra fiskarter fångas.

Om eDNA ska ersätta, eller komplettera, traditionell övervakning är det viktigt att med olika försök verifiera att det fungerar i den miljö som tekniken ska användas. En studie genomfördes där vattenprover från 10 lokaler analyserades för eDNA och förekomsten av svartmunnad smörbult kontrollerades med provfiske i dessa lokaler några dagar senare (Sundberg et al. 2022b). eDNA provtagningen genomfördes innan fisket med burar och ryssjor för att förhindra kontamination på lokalerna från dessa redskap. För att påvisa svartmunnad smörbult användes dPCR tillsammans med en utvecklad assay för arten (Panova et al. 2021).

För provfisket användes räkburar, krabburar och sammanlänkade ryssjor i enlighet med de protokoll som finns för provfiske (Figur 6).



Figur 6. De fiskredskap som använts för provfisket (från Sundberg et al. 2022b).  
Foto Johanna Bergkvist.

På tre av lokalerna (Husvik Brännö, Stora Amundön, Hönö Klåva) hittades arten med eDNA men inte vid provfisket (Tabell 2). Arten har tidigare rapporterats från de första två lokalerna och med tanke på spridningen runt Hönö betraktar vi även detta fynd som sant positivt även om arten tidigare inte rapporterats från den lokalen. Varken eDNA eller provfiske hittade arten på lokalen "Tjolmenhamnen" (Tabell 2) men det är en lokal som vetter utåt havet och vi bedömer resultatet som sant negativt.

Resultaten verifierar att eDNA fungerar som metod för övervakning av svartmunnad smörbult och att den tycks mer effektiv än provfiske såsom här genomfört. Eftersom DNA-analysen dessutom är baserad på kvantitativ PCR och inte sekvensering så blir den mer kostnadseffektiv än ett mer omfattande provfiske, och kräver heller inga speciella tillstånd. Resultaten visar också på betydelsen av att ta flera prov per lokal. Exakt hur DNA sprids från källan till omgivningen är inte känt i detalj, med det finns flera indikationer på att förekomsten är fläckvis. Det kan bero på att DNA fäster vid andra partiklar och alltså inte förekommer i så stor utsträckning som fria, jämt spridda, molekyler i vattnet.

**Tabell 2. Lokaler och resultat av dPCR analysen som antalet positiva (spår av DNA från svartmunnad smörbult) per prov samt om förekomst av arten vid provfiske. Fyra prover (1 liter) för eDNA togs på varje lokal. Från Sundberg et al. (2022b). <sup>1</sup>Förekomst av fisken på den här lokalen innanför piren (lokal 5) bekräftades med mete något senare i samband med annan undersökning.**

| Lokal                        | Antalet positiva prov/alla prov | Bekräftad förekomst (+) vid provfiske |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| 1 Husvik Brännö              | 3/4                             | -                                     |
| 2 Färjeläget Vrångö          | 2/4                             | +                                     |
| 3 Stora Amundön              | 3/4                             | -                                     |
| 4 Ganlets badplats           | 2/4                             | +                                     |
| 5 Långedrag                  | 3/4                             | +                                     |
| 6 Hällsvik                   | 1/4                             | +                                     |
| 7 Store Udd badplats         | 4/4                             | +                                     |
| 8 Sillviksbadet              | 4/4                             | +                                     |
| 9 Hönö Klåva                 | 2/4                             | -                                     |
| 10 Tjolmenhamnen Öckerö      | 0/4                             | -                                     |
| Extra Långedrag <sup>1</sup> | 4/4                             | +                                     |

## VERIFIERING MED OBSERVATIONER BASERADE PÅ DYKNING

Lädersjöpung (*Styela clava*) är listad som invasiv i HELCOM/OSPAR listan över de målarter som ska beaktas i samband med ansökan om undantag från kravet på rening av barlastvatten enligt IMO "ballastwater convention". Arten rapporterades för första gången i Sverige 2023 från hamnar nära Lysekil (<https://artfakta.se/art-information>). Inom projektets ram genomfördes ett test av möjligheten att använda eDNA som metod för övervakning och tidig upptäckt på uppdrag av Länsstyrelsen Västra Götaland. I undersökningen ingick test av artspecifik assay och verifiering av tekniken genom simultana observationer av dykare i vattnet. För detta valdes en marina nära Skalhamn, norr om Lysekil, där arten har tidigare påträffats och dykare samma dag som vår provtagning verifierade att arten var rikligt förekommande i de områden som vi benämnt 1–4 samt 7–10 (Figur 7). Se Sundberg et al. (2023b) för detaljer.



Figur 7. Provtagningspunkter Basteviksholmarnas marina (1–4; 7–10) plus liten hamn norr om vägbanken (5) och Ramsvik (6). Från Sundberg et al. 2023b.

Det var tydliga signaler av målarten på lokalerna inne i marinan (1–4; 7–10) där också dykare konstaterade riklig förekomst (Tabell 3). Ingen dykning förekom på lokalerna 5 och 6. Det fanns en tydlig signal av målarten på en av provtagningsplatserna på lokal 6 som var alldeles vid en brygga med påväxt. Vi betraktar det som säker indikation på att lädersjöpung även fanns där. Det är högst troligt med tanke på närheten till de andra lokalerna med adulta individer som indikerar att arten bör ha funnits där ett tag.

**Tabell 3. Målartens DNA koncentration i kopior per  $\mu\text{l}$  i de olika proverna (se Figur 7). På varje insamlingslokal togs två prover a 1 liter vatten som filtrerades med 0.45  $\mu\text{m}$  Sterivex-filter i nära anslutning till provtagningen. Från Sundberg et al. (2023b). <sup>1</sup>medelvärde två duplikat.**

| lokal/prov | Målartens DNA, kopior per $\mu\text{l}$ <sup>1</sup> | lokal/prov | Målartens DNA, kopior per $\mu\text{l}$ <sup>1</sup> |
|------------|--|------------|--|
| 1:1        | 2,2  | 6:1        | 4,6  |
| 1:2        | 2,3  | 6:2        | 0,4  |
| 2:1        | 5,5  | 7:1        | 1,4  |
| 2:2        | 5,2  | 7:2        | 6,4  |
| 3:1        | 3,3  | 8:1        | 11,1   |
| 3:2        | 10,3   | 8:2        | 5,2  |
| 4:1        | 79,5   | 9:1        | 2,7  |
| 4:2        | 3,3  | 9:2        | 3,4  |
| 5:1        | 0  | 10:1       | 1,5  |
| 5:2        | 0  | 10:2       | 4,5  |

Resultaten från analysen baserat på positiva kontroller och fält-proverna visar att tekniken fungerar samt att eDNA kan användas för övervakning och upptäckt av arten. Vi vet inte hur långt ifrån källan det går att hitta DNA från arten och provtagning bör därför ske i direkt anslutning till påväxt på potentiella habitat som till exempel bryggor. Det gör ju också provtagningen relativt enkel och kostnadseffektiv.

## 3.2 Övervakning främmande arter

En art (eller underart) definieras som främmande om den har introducerats (med eller utan människans hjälp) utanför sitt historiska eller nutida utbredningsområde. Arter som sprids och introduceras till nya miljöer med hjälp av människan kan påverka miljön och ekosystemen på ett mycket negativt sätt. Detta kan få stora ekonomiska konsekvenser för samhället, utgöra ett hot mot den biologiska mångfalden, och även ha direkta hälsoeffekter både på människor och andra djur och växter. Arter som får fäste i miljön och som har förmågan att sprida sig benämns främmande invasiva arter (invasive alien species, IAS). Alla främmande arter bedöms inte som invasiva; ibland används det generella begreppet "NIS" från engelskans "non-indigenous species" för främmande arter. Det är viktigt att komma ihåg att vad som bedöms som "främmande" är en definitionsfråga. I Sverige utgår vi ifrån definitionen i Strand et al. (2018) som klassificerar en art som främmande om den förts in i landet med människans hjälp efter 1800.

I den akvatiska miljön är fartyg förmodligen en betydande källa till att främmande invasiva arter sprids, via påväxt på skroven eller via det barlastvatten som fartyg tar in/släpper ut i samband med lastning och lossning. Därför är hamnar och farleder speciellt intressanta när det gäller kontroll och övervakning av NIS eftersom de av naturliga skäl är platser där introduktionen ofta sker (Bergkvist et al. 2020a). Det kan också finnas en sekundär spridning med fritidsbåtar från de större hamnarna och då sprids arter via påväxt eller redskap (tex. ankare). Det kan därför också vara intressant att övervaka fritidsbåtmarinor, även om de förmodligen inte är den primära platsen för introduktion av dessa arter.

Behovet av att övervaka och bedöma förekomsten och utbredningen av främmande arter har ökat under senare år. För vattenmiljön styrs detta av ramdirektivet för vatten, havsmiljödirektivet, barlastvattenkonventionen (IMO), havsmiljökonventionerna HELCOM och OSPAR, och EU:s förordning om invasiva främmande arter. En effektiv övervakning kräver också effektiva metoder, och detta är speciellt viktigt för att snabbt kunna sätta in åtgärder om möjligt för att förhindra etablering och spridning. I övervakningen av främmande arter är det avgörande att kunna bestämma individer till art – i andra övervakningsprogram kan man kanske nöja sig med att rapportera individer till högre (som släkte, familj, djurstam) taxon, men per definition innebär övervakning av invasiva arter också att kunna identifiera individer till art.

Traditionellt identifieras arter utifrån morfologiska karaktärer vilket kräver god kunskap om de grupper som skall bestämmas. Med tanke på den stora artrikedomen och generella diversiteten i den marina miljön är det inte möjligt för enskild expert att kunna identifiera allt med säkerhet. Till detta kommer svårigheter att kunna identifiera juvenila former av arter som kan se helt olika ut som adult, eller att kunna bestämma larver och ägg. Med tanke på att snabb upptäckt är viktigt när det gäller främmande och invasiva arter behöver det utvecklas metoder för pålitlig och snabb upptäckt och identifiering av dessa arter. Det finns ännu inget nationellt antaget program för övervakning men en utgångspunkt går att finna i HELCOM (2020) och Granhag (2016) som beskriver olika undersökningsmetoder. Där nämns fyto- och zooplankton, påväxtorganismer, avskrap av hårbottenfauna, mjukbottenlevande makrofauna och flora, samt fällor för rörlig epifauna. Eftersom en fullständig undersökning i en hamn utifrån protokollet i HELCOM är tidskrävande och dyr

utvärderades ett alternativ (Bergkvist et al. 2017) och 2019 startade Havs och Vattenmyndigheten ett förenklat övervakningsprogram: "Rapid assessment survey" (RAS), som senare under perioden utvecklades och benämndes därefter eRAS ("extended RAS"). I metoden ingår undersökningar av påväxt på uthängda paneler, avskrap från hårda ytor i undersökta hamnar, artificiella habitat (burar) som ska fånga mobil fauna, och visuella observationer i vattnet efter synbara främmande arter. Under åren 2019–2021 undersöktes hamnar i Skåne, Blekinge, Halland, Småland, Östergötland och på Gotland (Bergkvist et al. 2020b,c; Bergkvist et al. 2021; Bergkvist & Fransson 2022). Från dessa undersökningar rapporterades 15 främmande arter (*Mya arenaria* har också rapporterats men enligt definitionen i Strand et al. 2018 är den inte att betraktas som främmande).

Att inkludera DNA-baserade metoder för övervakning av främmande arter framstår alltmer som viktigt och avgörande för korrekt och tidig upptäckt av invasiva arter. Det blir också viktigare allteftersom taxonomisk kompetens för traditionell identifiering av arter är på nedåtgående (Sundberg 2023). Det eRAS-baserade programmet enligt Bergkvist et al. (2020b) kräver god taxonomisk kännedom om funna arter, vilket dessutom försvåras av att erfarenheten och kunskap om främmande arter av naturliga skäl är mer begränsad, speciellt när de börjar uppträda i ett område. Dessutom kan vi förvänta oss att många sprids hit som larver eller juveniler, något som är erkänt svårt att definiera. Molekylära metoder hanterar ju också dessa livsformer.

En första utvärdering, och jämförelse, mellan DNA-baserad identifiering och morfologisk identifiering utfördes runt inseglingen till PREEM-raffinaderiet 2017 (Sundberg et al. 2018). I ljuset av resultaten från den studien utfördes på uppdrag av Havs- och Vattenmyndigheten inom ramen för projektet fördjupade studier för att utvärdera andra typer av påväxtpaneler (ARMS) tillsammans med plankton i vissa. Den studien utfördes i ett antal hamnar och farleder från Strömstad i norr till Helsingborg i söder utmed svenska västkusten.

Nedanför rapportera vi två studier som en del av den nationella övervakningsprogrammet för marina främmande och invasiva arter. Syftet med dessa studier var att testa hur genetiska metoder kan förbättra befintliga protokoll för övervakning av marina främmande arter.

### 3.2.1 Övervakning av främmande arter i hamnar

Under 2020 genomförde vi en studie (Sundberg et al. 2022a) för att undersöka om DNA-baserad identifiering av arter kunde användas inom övervakningen. Undersökningen baserades på en den typ av påväxt-paneler som används inom det internationella ARMS-BON projektet (Obst et al. 2020) med en standardiserad hantering av prover och data (Figur 8). DNA metabarcoding gjordes för tre genetiska markörer: COI, 18S och ITS enligt ARMS-BON protokoll.



Figur 8. Ihopsatt ARMS system med betongplatta i botten färdigt att läggas ut. Påväxtpanel efter tre månader på botten i inloppet till Göteborgs hamn. Från Sundberg et al. 2022a.

Det togs också en del planktonprover på vissa av de platser där det fanns paneler. Studien utfördes under vintern, våren, och försommaren 2020 i och omkring kommersiella hamnar utmed västkusten som antas kunna vara inkörsportar för främmande invasiva arter via barlastvatten och påväxt från/på handelsfartyg. De kommersiella hamnarna som ingick i studien är Preem-raffinaderiet (Brofjorden), hamnarna i Göteborg, Varberg och Helsingborg (Figur 9). I studien ingick också Marstrandfjorden – en plats där sjöfartstrafiken in till Uddevalla och Stenungsund passerar. Platser runt Göteborgs hamn valdes utefter dominerande vattenströmningar ut från hamnen. Två småbåtshamnar/marinor ingick (Getterön, Marstrand), valda för att de är populära hamnar för fritidsbåtar från utlandet och att de är platser där inhemsk sekundär spridning via fritidsbåtar kan tänkas uppträda tidigt. Resultatet från studien redovisas kortfattat i kapitel 3.2.1 nedan. Mer information om lokaler och tidpunkter finns i Sundberg et al. (2022a).



Figur 9. Lokaler utmed svenska västkusten där påväxtpaneler har placerats (blå punkter), och där det både funnits paneler och tagits planktonprover (grå punkter). Från Sundberg et al. (2022a).

DNA från bulkprover (påväxt och planktonprov) extraherades och sekvenserades som beskrivs ovan och i Sundberg et al. (2022a). Sekvenser matchades mot olika referensdatabaser och resultaten sammanfattas i Tabell 4.

**Tabell 4. Sammanställning av främmande arter (NIS) listade i Aqua-NIS och de som riskklassificerats krigsklassificerade som invasiva av Havs- och Vattenmyndigheten (HaV), Helcom/Ospar (HEL & OSP) och SLU. A = funna på ARMS-panelerna, P = i planktonprov, AP = både i plankton och på paneler. Sekvenser matchades mot följande referensdatabaser: HELCOM and OSPAR, Havs- och Vattenmyndigheten, SLU Artfakta, och mot AquaNIS databaser. Max sim (%) anger maximala procent likhet mellan hittad sekvens och sekvens i databas. Notera att alla de arter som rapporteras i AquaNIS är inte utredda som främmande i Sverige enligt definitionen i Strand et al. (2018). Sandmussla (*Mya arenaria*) är med i listan även om den inte är främmande i Sverige, men däremot klassad som det i Danmark. Arter som tidigare rapporterats som ovanlig markeras med en \* och främmande arter som för första gången rapporterats med två \*\*.**

| Vetenskapligt namn                     | Djurstam   | Klass            | HaV | HEL & OSP | SLU | Aqua-NIS | Max sim (%) | Insamlingsmetod (A, P, AP) |
|--|------------|------------------|-----|-----------|-----|----------|-------------|----------------------------|
| <i>Acartia clausi</i>                  | Arthropoda | Copepoda         |     |           |     | x        | 100         | AP                         |
| <i>Acartia tonsa</i>                   | Arthropoda | Copepoda         |     | x         |     | x        | 100         | P                          |
| <i>Acrochaetium moniliforme</i>        | Rhodophyta | Florideophyceae  |     |           |     | x        | 100         | A                          |
| <i>Aglaothamnion halliae</i>           | Rhodophyta | Florideophyceae  | x   |           | x   | x        | 100         | A                          |
| <i>Amathia imbricata*</i>              | Bryozoa    | Gymnolaemata     |     |           |     | x        | 99.67       | AP                         |
| <i>Amphibalanus amphitrite</i>         | Arthropoda | Thecostraca      |     |           |     | x        | 100         | AP                         |
| <i>Amphibalanus eburneus</i>           | Arthropoda | Thecostraca      |     |           |     | x        | 100         | AP                         |
| <i>Amphibalanus improvisus</i>         | Arthropoda | Thecostraca      | x   |           | x   | x        | 100         | AP                         |
| <i>Antithamnionella spirographidis</i> | Rhodophyta | Florideophyceae  |     |           |     | x        | 98.71       | A                          |
| <i>Bonnemaisonia hamifera</i>          | Rhodophyta | Florideophyceae  | x   |           | x   | x        | 100         | AP                         |
| <i>Calanus euxinus</i>                 | Arthropoda | Copepoda         |     |           |     | x        | 100         | P                          |
| <i>Caprella mutica</i>                 | Arthropoda | Malacostraca     | x   | x         | x   | x        | 100         | A                          |
| <i>Crepidula fornicata</i>             | Mollusca   | Gastropoda       | x   | x         | x   | x        | 100         | A                          |
| <i>Dasya bailouviana**</i>             | Rhodophyta | Florideophyceae  | x   |           | x   | x        | 98.00       | P                          |
| <i>Dasysiphonia japonica</i>           | Rhodophyta | Florideophyceae  | x   |           | x   | x        | 100         | AP                         |
| <i>Ercolania viridis**</i>             | Mollusca   | Gastropoda       |     |           |     | x        | 99.35       | P                          |
| <i>Gonionemus vertens*</i>             | Cnidaria   | Hydrozoa         |     |           |     | x        | 100         | A                          |
| <i>Haminoea solitaria**</i>            | Mollusca   | Gastropoda       |     |           |     | x        | 99.68       | P                          |
| <i>Hydroides elegans**</i>             | Annelida   | Polychaeta       |     | x         |     | x        | 98.00       | A                          |
| <i>Hymeniacion sinapium**</i>          | Mollusca   | Gastropoda       |     |           |     | x        | 99.00       | AP                         |
| <i>Jassa marmorata</i>                 | Arthropoda | Malacostraca     |     |           |     | x        | 100         | A                          |
| <i>Lyrodus pedicellatus**</i>          | Mollusca   | Bivalvia         |     |           |     | x        | 99.00       | AP                         |
| <i>Mnemiopsis leidyi</i>               | Ctenophora | Tentaculata      | x   | x         | x   | x        | 99.80       | P                          |
| <i>Monocorophium acherusicum</i>       | Arthropoda | Malacostraca     |     |           |     | x        | 100         | A                          |
| <i>Monocorophium sextonae</i>          | Arthropoda | Malacostraca     |     |           |     | x        | 100         | A                          |
| <i>Mya arenaria</i> <sup>1</sup>       | Mollusca   | Bivalvia         |     |           |     | x        | 100         | AP                         |
| <i>Mytilus trossulus</i>               | Mollusca   | Bivalvia         |     |           |     | x        | 100         | A                          |
| <i>Penilia avirostris</i>              | Arthropoda | Branchiopoda     | x   |           | x   | x        | 100         | P                          |
| <i>Petricolaria pholadiformis</i>      | Arthropoda | Copepoda         |     |           | x   | x        | 99.00       | P                          |
| <i>Pileolaria militaris**</i>          | Annelida   | Polychaeta       |     |           |     | x        | 100         | A                          |
| <i>Proceraea cornuta</i>               | Annelida   | Polychaeta       |     |           |     | x        | 100         | A                          |
| <i>Pseudochattonella verruculosa**</i> | Ochrophyta | Dictyochophyceae | x   | x         | x   | x        | 98          | P                          |
| <i>Pseudodiaptomus marinus**</i>       | Arthropoda | Copepoda         |     |           |     | x        | 99.68       | P                          |
| <i>Sparus aurata</i>                   | Chordata   | Actinopteri      |     |           |     | x        | 100         | A                          |

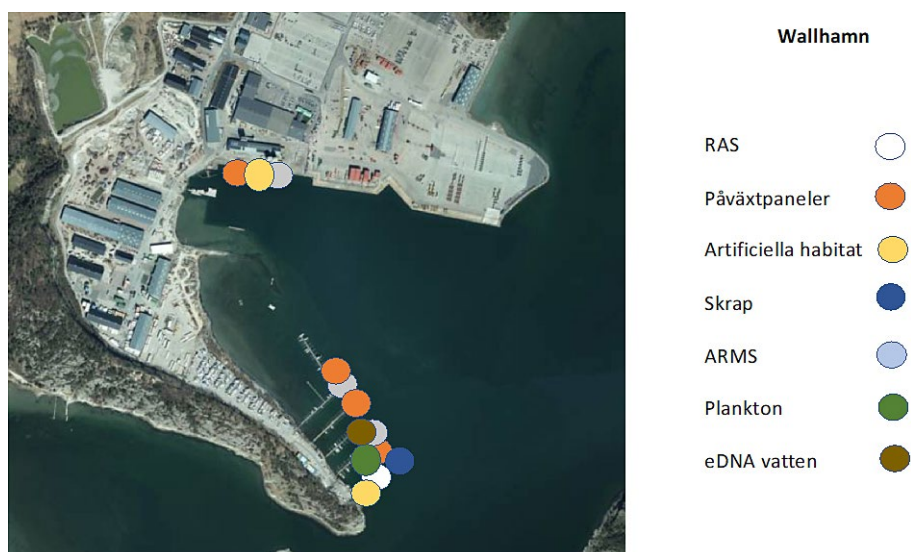


Med den här tekniken gick det att hitta sammanlagt 29 arter på AquaNIS-listan varav 11 arter är riskklassade som invasiva, se också Sundberg et al. (2022a). Studien visar, trots sin begränsning i tid och rum, att genetiska metoder är effektiva i att hitta främmande arter.

### 3.2.2 Jämförande studier av eRAS versus eDNA i Wallhamn

Under 2022 genomfördes en mer direkt jämförelse mellan DNA-baserad övervakning och eRAS protokollet i hamnen Wallhamn på Tjörn (Figur 10) på uppdrag av Havs och Vattenmyndigheten. Hamnen är en av de som identifierats som ”hot-spot” för introduktion av främmande arter. Här baserades jämförelsen på DNA från bulkprover (påväxt ARMS och plankton) samt eDNA från vattenprover. eRAS utförde enligt protokollet i Bergkvist et al. (2020b).

Hamnen valdes baserat på att det är en etablerad hamn som anlöps av ett stort antal fartyg varje år. I eRAS protokollet ingår momenten påväxtplattor, artificiella habitat, skrap av påväxt från befintliga strukturer, samt visuella observationer av främmande arter (som till exempel amerikansk kammanet). Den DNA-baserade identifieringen är baserad på påväxtpaneler (ARMS), planktonprover, och eDNA från filtrerade vattenprover och beskrivs i detalj i Obst et al. (2023).



Figur 10. Placeringen av provpunkter i Wallhamn. Norra delen är den kommersiella hamnen, och den södra delen är Wallhamn Marina. Marinan utnyttjades för flera prover eftersom den var mer tillgänglig och utlagda redskap inte riskerades att störas av tung båttrafik. Avståndet mellan hamn och marina är några hundra meter och detta i kombination med att det är en vik gjorde att vi bedömde det att fauna och flora borde vara lika på bägge sidor. Från Obst et al. (2023).

Undersökningen baserades på sammanlagt 9 planktonprover, 9 eDNA, 3 skrap (eRAS), 2 artificiella habitat, 4 påväxtpaneler (eRAS-standard). Studien påbörjades 23 juni och avslutades 9 september – detaljer i Obst et al. (2023).

Från DNA-proverna identifierades sammanlagt 289 arter, merparten i eDNA och planktonproverna varav 10 är främmande. Två markörer användes i studien: 18S och COI och den senare var mest effektiv för att identifiera främmande arter (Tabell 5).

**Tabell 5. Främmande arter som identifierats med DNA utifrån listor i HaV och Adb NIS. I kolumn Prov listas proverna som arten identifierades i (v = vatten, p = plankton, a = ARMS). Prover togs vid tre tillfällen: 26/6 = jun; 4/8 = aug; 9/9 = sep. Från Obst et al. (2023).**

| Markör: COI     |                 |                  |                            |               |                          |
|-----------------|-----------------|------------------|----------------------------|---------------|--------------------------|
| Djurstam        | Klass           | Ordning          | Familj                     | Släkte        | Art                      |
| Pyrrophytophyta | Dinophyceae     | Gonyaulacales    | Goniodomataceae            | Alexandrium   | Alexandrium minutum      |
| Arthropoda      | Thecostraca     | Sessilia         | Balanidae                  | Amphibalanus  | Amphibalanus improvisus  |
| Rhodophyta      | Florideophyceae | Bonnemaisoniales | Bonnemaisoniaceae          | Bonnemaisonia | Bonnemaisonia hamifera   |
| Mollusca        | Gastropoda      | Littorinimorpha  | Calyptraeidae              | Crepidula     | Crepidula fornicata      |
| Ochrophyta      | Raphidophyceae  |                  |                            | Fibrocapsa    | Fibrocapsa japonica      |
| Ctenophora      | Tentaculata     | Lobata           | Bolinopsidae               | Mnemiopsis    | Mnemiopsis leidyi        |
| Chordata        | Actinopterygii  | Gobiiformes      | Gobiidae                   | Neogobius     | Neogobius melanostomus   |
| Rhodophyta      | Florideophyceae | Ceramiales       | Rhodomelaceae              | Neosiphonia   | Neosiphonia harveyi      |
| Arthropoda      | Branchiopoda    | Ctenopoda        | Sididae                    | Penilia       | Penilia avirostris       |
| Markör: 18S     |                 |                  |                            |               |                          |
| Djurstam        | Klass           | Ordning          | Familj                     | Släkte        | Art                      |
| Dinoflagellata  | Dinophyceae     | Gonyaulacales    | Goniodomataceae            | Alexandrium   | Alexandrium minutum      |
| Ochrophyta      | Bacillariophyta | Bacillariophyta  | Polar-centric-Mediophyceae | Chaetoceros   | Chaetoceros seiracanthus |
| Ochrophyta      | Raphidophyceae  | Raphidophyceae   | Raphidophyceae_XX          | Fibrocapsa    | Fibrocapsa japonica      |
| Metazoa         | Arthropoda      | Crustacea        | Branchiopoda               | Penilia       | Penilia avirostris       |

Undersökningarna baserat på eRAS standarden med påväxtpaneler, artificiella habitat, RAS och skrap identifierade totalt 14 arter (varav 12 på påväxtpanelerna och 6 i de artificiella habitaterna). Inga främmande arter påträffades i Wallhamn med eRAS.

Resultatet visar tydligt att en DNA-baserad övervakning av främmande arter hittar fler än den etablerade eRAS-standarderna.

### 3.2.3 Undersökning av sekundär spridning av främmande arter på fritidsbåt-skrov

Även om fritidsbåtar förmodligen inte är en betydande vektor för introduktion av främmande arter, så kan de fungera som sekundära spridare. Speciellt kanske gäller detta båtar som har sin hemmahamn i närheten av en hamn med många internationella anläp. Exempel på detta är flera småbåtshamnar i Göteborg som ligger i direkt närhet till den stora kommersiella hamnen. Det finns därför intresse för att utveckla och testa DNA-baserade metoder för att artbestämma påväxt på skroven av fritidsbåtar, speciellt de lite större som rör sig längre bort från hemmahamnen. Viss påväxt går ju enkelt att identifiera från habitus (till exempel olika havstulpaner) men mycket av på växten är mera som en filt och kan innehålla larver, ägg och settlingsstadier av arter och svåra att identifiera (Figur 11).

På uppdrag av Länsstyrelsen i Stockholm genomfördes en undersökning 2022 i samband med höstupptagningen av båtar på två marinor: Trälhavet båtklubb och Bullandö marina. Påväxt (biofilm och organismer) skrapades av och fixerades/ förvarades i 70+% etanol fram till extraktion (Figur 11).



Figur 11. Exempel på provtagning i småbåtshamnar (vänstra) samt påväxt på fritidsbåtar (högra). Från Panova et al. 2023b. Foto Jennie Barthel Svedén.

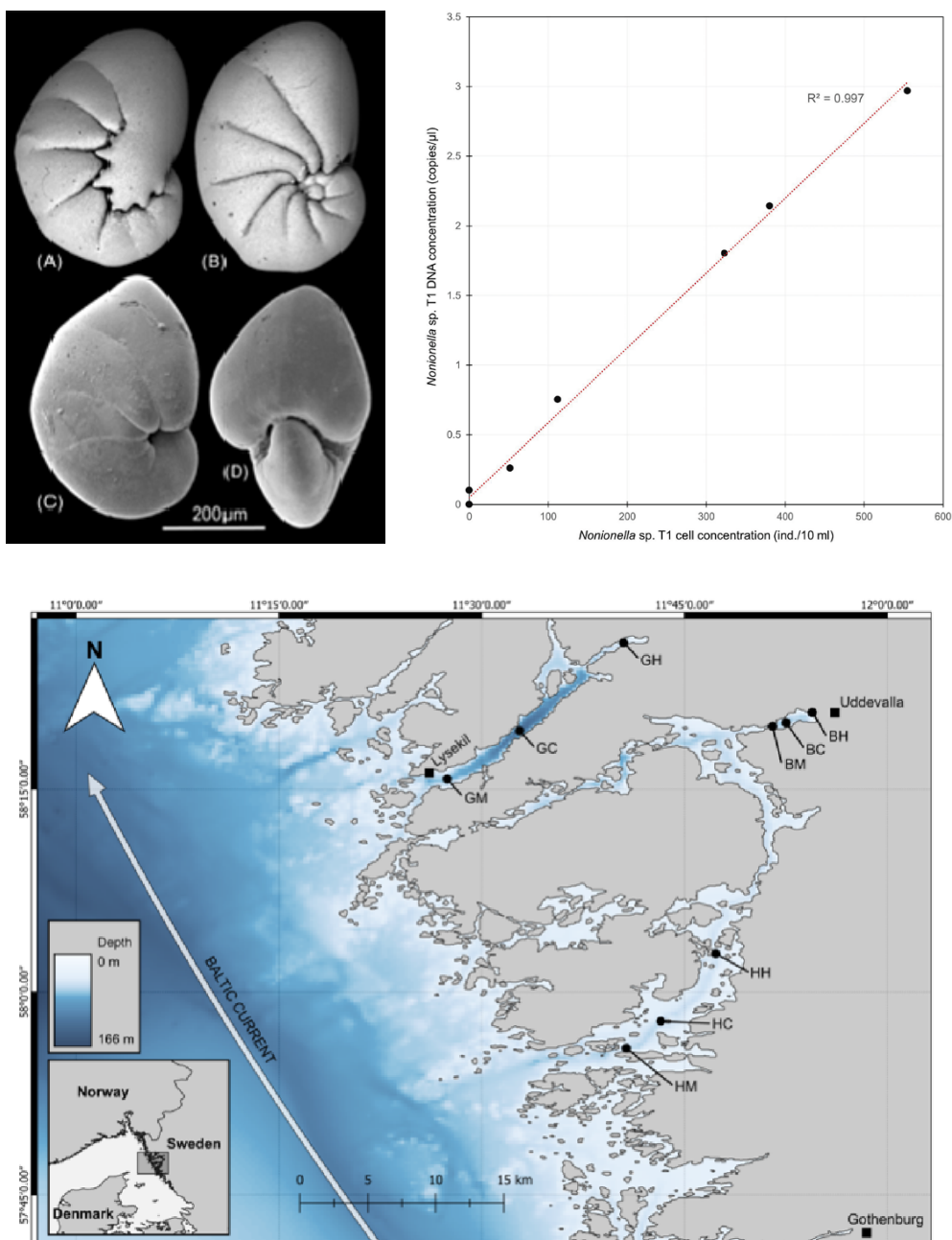
Analysen baserades på både Sanger-sekvensering och metabarcoding (metodförklaringar se kapitel 2). För Sanger-sekvensering användes den mitokondriella COI-genen eftersom vi förväntade oss huvudsakligen evertebrater och det finns en bra referensdatabas för den genen. För metabarcoding analysen användes tre molekylära markörer: 16S (med fokus på blågröna alger), 18S (eukaryoter) och COI (evertebrater) för att täcka in ett större antal organismgrupper. För 16S analyserades resultaten med hjälp av *mothur* pipelinen (Schloss et al. 2009) och för 18S och COI med DADA2 R package (Callahan et al. 2016). Sekvensdata artbestämdes av identifieringsfunktioner i databaserna SILVA för 16S, PR2 för 18S och BOLD (<https://boldsystems.org>) för COI medan förekomst av identifierade arter i Sverige kontrollerades i SLU Artdatabanken portal (<https://artfakta.se>). Ytterligare detaljer för analysen finns i Panova et al. (2023b).

Sammanlagt kunde 12 arter identifieras bland påväxten med hjälp av Sanger sekvenseringen. Förutom de vanliga påväxtorganismerna som havstulpaner och blåmussla påträffades tre främmande arter som klubbpolypen *Cordylophora caspia*

från pontokaspiska regionen, nordamerikanska märlkräftan *Gammarus tigrinus* och trekantig brackvattensmussla *Mytilopsis leucophaeata*, vilket tyder på att fritidsbåtar kan vara en viktig vektor för spridning av främmande arter. Fyndet av trekantig brackvattensmussla är särskilt intressant eftersom arten är relativt nyligen noterad i Stockholms skärgård, och arten är klassificerad som en hög-risk art i Sverige (Strand et al. 2018). Metabarcoding analyser rapporterade förekomst av ett stort antal arter i påväxten: kring 100 olika blågröna alger med 16S, 118 olika eukaryoter med ett brett spektrum av mikro- och makroorganismer påträffades med 18S och 114 arter, huvudsakligen evertebrater men även vissa makroalger, med COI. Studien visade att påväxten från båtskrov är ett rikt samhälle som potentiellt kan innehålla olika främmande invasiva arter.

### 3.2.4 Utbredning och spridningsmönster av en invasiv foraminifer

En potentiellt invasiv foraminifer (Rhizaria), *Nonionella* sp. T1, upptäcktes nyligen i Skagerrak och dess fjordar (Figur 12, A). För att dokumentera utbredningen och förstå spridningsmönstret utvecklade vi en artspecifik dPCR assay. Tillämpning av assayn gav likande resultat som manuell beräkning av organismernas lokala abundans i sedimentet men visar sig vara mycket mindre tidskrävande (Figur 12 B). Denna studie indikerade också att *Nonionella* sp. T1 har tagit sig förbi det yttre Skagerrak och i stället etablerat sig i svenska västkustfjordar (Gullmarsfjorden, Hakefjorden och Byfjorden, Figur 12 C), där den ibland utgör upp till hälften av det levande foraminifer-samhället i fjordmynningsområden. Ekologin hos *Nonionella* sp. T1 och dess potentiella invasiva effekter är fortfarande till stor del okända, men det verkar vara en opportunist som använder flera energikällor såsom nitratandning och kleptoplastik tillsammans med en möjligen mer effektiv reproduktionsstrategi för att få en fördel gentemot de inhemska foraminifera arterna. Studien visar att dPCR är en mycket lämplig metod för att effektivt spåra utbredning, spridning, och abundans av *Nonionella* sp. T1.



Figur 12. A: Rasterelektronmikroskopiska fotografier av *Nonionella* sp. T1 från Skagerrak. B: Samband mellan resultat av fjordstationernas *Nonionella* sp. T1 dPCR DNA-koncentrationer i kopior per mikroliter på Y-axeln mot koncentration av *Nonionella* sp. T1-celler hittade genom mikroskopiska analys, i individer/10 ml sediment, på X-axeln i sedimentprover analyserade med bägge metoder. Varje cirkel representerar en fjordstation. Värdena visar en signifikant positiv korrelation; Pearsons  $r(6) = 0,998$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0,001$ . Station GC representerar ett extremvärde ( $z$ -poäng = +2,655) och har utelämnats i denna figur, på grund av en uppmätt DNA-koncentration en storleksordning större än de andra fjordstationerna. C: Karta över provtagna stationer i Gullmarsfjorden, Byfjorden och Hakefjorden. Från Morin et al. (2023).

## 3.3 Övervakning av rödlistade och fridlysta arter

I Sveriges sötvatten finns idag sju inhemska musselararter med samlingsnamnet stormusslor. De är bottenlevande, filtrerande djur som sitter nedgrävda med bakänden uppåt och sifonerna öppna mot det strömmande vattnet. Några av arterna lever huvudsakligen i sjöar och dammar men samtliga kan påträffas i rinnande vatten.

Det finns ett nationellt program för övervakning av limniska stormusslor som syftar till att följa förändring av populationsstorlek och täthet samt förändring i ålders/storleksstrukturen i avgränsade bestånd av stormusslor. De mest använda metoderna för inventering och övervakning fram till idag är vadning med vattenkikare, fridykning och användning av Lutherräfsa (kastkratta). Luftdykning har hittills enbart använts sporadiskt i djupare vattendrag men i framtiden räknar länen med att öka användning av både fridykning och luftdykning (Lundberg & Bergengren 2008)

Även om eDNA undersökningar av stormusslor inte kan besvara flera av de frågor som ställs i övervakningsprogrammet så kan det ge svar på om en musselart finns i ett vattendrag eller sjö. Denna kunskap kan sedan medföra en mer detaljerad övervakning enligt programmets riktlinjer och på det sättet göra övervakningen mer kostnadseffektiv.

Stormusslor övervakas traditionellt genom visuella observationer, något som är både tids- och personal-krävande. Det finns därför ett incitament att kunna ersätta detta med eDNA-baserad bekräftelse av förekomst. Inom projektet utvecklades därför assayer baserade på dPCR för fyra arter: flodpärlmussla (*Margaritifera margaritifera*), äkta målarmussla (*Unio pictorium*), tjockskalig målarmussla (*Unio crassus*) och flat dammussla (*Pseudoanodonta complanata*). Fokus har varit på flodpärlmussla där det genomfördes flera undersökningar i olika vattendrag under projektiden. Här rapporterar vi bara två studier. En genomfördes i Sollumsån i Västra Götaland där vi utgick ifrån en lokal med visuellt bekräftad population. Den andra studien gällde förekomst och kartläggning av alla fyra arter i två vattendrag i Kalmar län (Alsterån och Virån).

### 3.3.1 Övervakning av rödlistade stormusslor i Sollumsån

I Sollumsån togs flera prover nedströms till ett avstånd på ungefär 1,5 km från lokal 1. Det finns observationer av populationer i den sträckan (inte bekräftat av oss) så nedströms prover går inte att tolka i termer som hur långt ifrån källan det går att upptäcka musslorna. I ett liknande försök i Norge (Wacker et al. 2019) visades att detekterbart DNA spreds flera kilometer nedströms. Den studien visade också på årstidsvariationer – något vi inte undersökte systematiskt men prov togs på lokal 1 vid tre olika tillfällen: i mars, maj och september. En faktor som kan påverka målarts DNA koncentrationen är stora skillnader i vattenstånd (Figur 13). Andra faktorer kan vara kopplade till musslornas biologi, då de släpper mer DNA under aktiv filtrering och lek i augusti–september, för mer detaljer se Sundberg et al. (manuskript). Slutsatsen är att september är den bästa säsongen för eDNA inventering av musslor.



Figur 13. Sollumsån, vattenstånd vid två tillfällen: 23/3-2020 till vänster och samma plats 13/5-2020 till höger. Lokaler 1 och 4 i Tabell 6 ligger cirka 20 meter uppströms den här platsen.

**Tabell 6. Test av eDNA för övervakning av flodpärlmussla i Sollumsån. Datum för provtagning, antal prov per lokal och målarts-DNA koncentration från dPCR analysen (medelvärden för 2 replikat). Från Sundberg et al. (manuskript).**

| Lokal       | Datum      | Antal prov | Filtrerad volym, mL | DNA kopior/ $\mu$ L |
|-------------|------------|------------|---------------------|---------------------|
| Sollumsån 1 | 2020-03-23 | 4          | 750–900             | 0–0,3               |
| Sollumsån 2 | 2020-03-23 | 4          | 700–850             | 0–0,3               |
| Sollumsån 3 | 2020-03-23 | 4          | 850                 | 0–0,3               |
| Sollumsån 4 | 2020-05-13 | 4          | 850–1000            | 0,03–80,9           |
| Sollumsån 5 | 2020-05-13 | 3          | 850                 | 0,1–39,7            |
| Sollumsån 6 | 2021-09-22 | 5          | 1000                | 46,3–92,7           |
| Sollumsån 7 | 2021-09-22 | 5          | 690–810             | 27,9–44,3           |
| Sollumsån 8 | 2021-09-22 | 5          | 250–300             | 6,2–9,4             |

Testet i Sollumsån visade att eDNA i kombination med dPCR är en fungerande metod för att påvisa förekomsten av arten. Den verifierades också genom att koppla till en observerad och bekräftad population (lokal 1) av levande flodpärlmusslor. Skillnaden i mängd DNA-molekyler mellan de två insamlingstillfällena på lokal 1 (mars och maj) med olika vattenstånd visar på betydelsen av abiotiska faktorer som kan påverka hur mycket DNA som kan detekteras och därmed en eventuell koppling till populationsstorlek. I det här fallet har ingen förändring i musselbeståndet skett under perioden mellan provtagningar.

### 3.3.2 Övervakning av rödlistade stormusslor i Alsterån och Virån

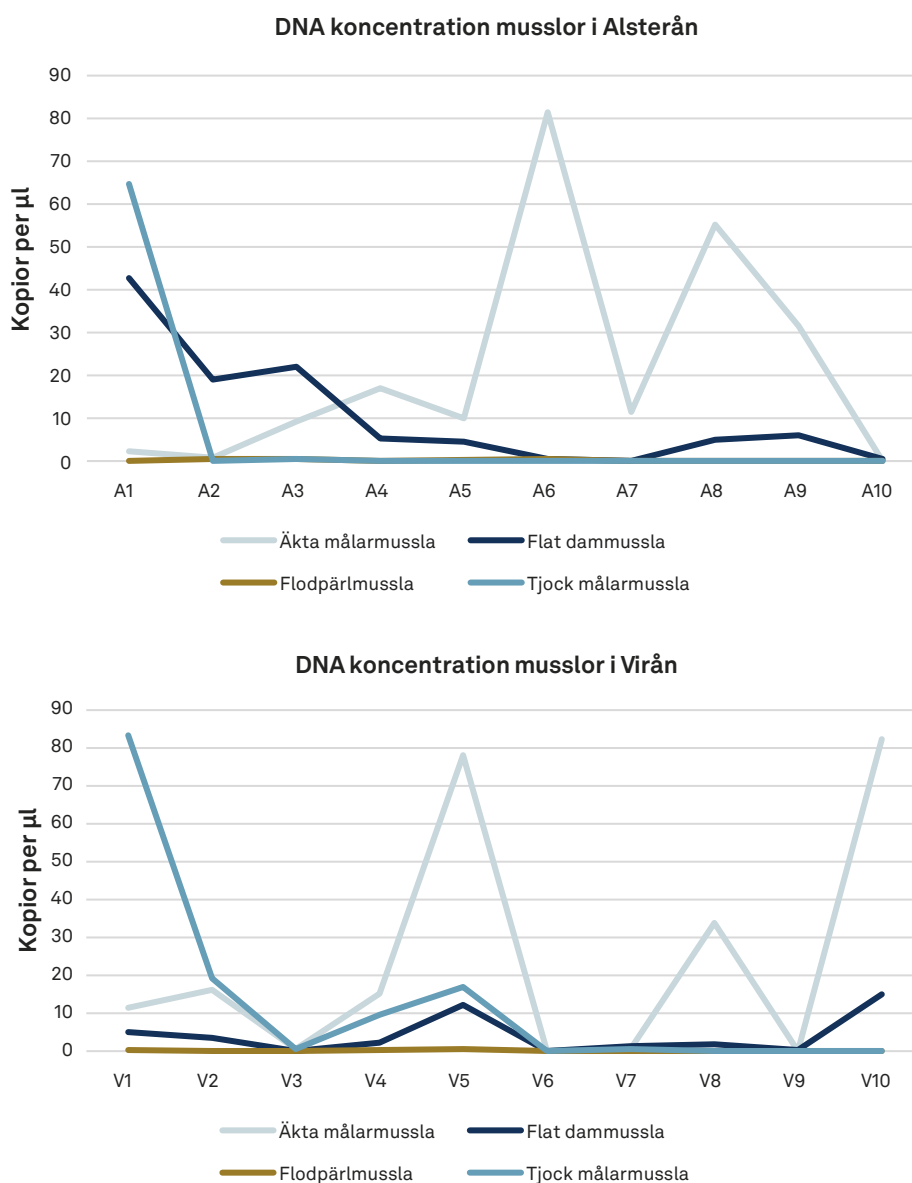
Utifrån erfarenheterna med flodpärlmussla utvecklades assays för de andra tre stormusslorna ovan. Dessa, tillsammans med flodpärlmussla, testades i en undersökning i två vattendrag (Alsterån och Virån) i Kalmar Län. Här användes också möjligheten att samtidigt analysera upp till fem arter i det dPCR-system som använts. Vi har inte testat känslighet av multiplex metoden i jämförelse med analyser av en art i taget statistiskt men vi observerade inga skillnader i dPCR signal i positiva kontroller (DNA från de olika musslorna) när flera arter analyserades samtidigt eller var för sig.

Tabell 7 visar på resultaten från dPCR i antal kopior av målarts DNA per µl PCR reaktion som innehöll 10 µl av eDNA tillsammans med filtrerad vattenvolym. Vattenvolym som kunde filtreras genom 0.45 µm Sterivex filter varierade mellan 360 och 1000 ml, och i detta fall fanns ingen signifikant korrelation mellan filtrerad volym och målarts DNA koncentrationerna (Sundberg et al. manuskript). Figur 14 visar resultat från tabell 7 omräknad som medelvärden mellan två replikat från varje lokal.

**Tabell 7. Identifiering av fyra stormusslor i Alsterån och Virån med eDNA. Provlokal, filtrerad vattenvolym (med 0.45 µm Sterivex filter), och målarts DNA koncentration i kopior per µl PCR reaktion. A = *Unio pictorium*, B = *Pseudoanodonta complanata*, C = *Margaritifera margaritifera*, D = *Unio crassus*. Från Sundberg et al. (manuskript).**

| Lokal       | Prov  | Filtrerad volym (ml) | DNA A (kopior/µl) | DNA B (kopior/µl) | DNA C (kopior/µl) | DNA D (kopior/µl) |
|-------------|-------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Alsterån 1  | A1:1  | 900                  | 2,5               | 34,5              | 0                 | 58                |
|             | A1:2  | 960                  | 2                 | 51                | 0                 | 71,5              |
| Alsterån 2  | A2:1  | 840                  | 1                 | 23,5              | 1                 | 0                 |
|             | A2:2  | 900                  | 0,5               | 14,5              | 0                 | 0                 |
| Alsterån 3  | A3:1  | 660                  | 6,5               | 32                | 0                 | 0                 |
|             | A3:2  | 780                  | 12                | 12                | 1                 | 1                 |
| Alsterån 4  | A4:1  | 720                  | 14                | 5,5               | 0                 | 0                 |
|             | A4:2  | 600                  | 20                | 5                 | 0                 | 0                 |
| Alsterån 5  | A5:1  | 420                  | 10                | 4,5               | 0,5               | 0                 |
|             | A5:2  | 420                  | 10                | 4,5               | 0                 | 0                 |
| Alsterån 6  | A6:1  | 420                  | 77                | 0,5               | 0,5               | 0                 |
|             | A6:2  | 360                  | 86                | 1                 | 0                 | 0                 |
| Alsterån 7  | A7:1  | 360                  | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 |
|             | A7:2  | 420                  | 23                | 0                 | 0                 | 0                 |
| Alsterån 8  | A8:1  | 660                  | 60                | 5                 | 0                 | 0                 |
|             | A8:2  | 600                  | 50,5              | 5                 | 0                 | 0                 |
| Alsterån 9  | A9:1  | 600                  | 29,5              | 2,5               | 0                 | 0                 |
|             | A9:2  | 660                  | 33,5              | 9,5               | 0                 | 0                 |
| Alsterån 10 | A10:1 | 720                  | 0                 | 0,5               | 0                 | 0                 |
|             | A10:2 | 720                  | 0                 | 0,5               | 0                 | 0                 |
| Virån 1     | V1:1  | 1000                 | 6,5               | 4                 | 0                 | 123,5             |
|             | V1:2  | 1000                 | 16,5              | 6                 | 0,5               | 44                |
| Virån 2     | V2:1  | 1000                 | 32,5              | 7                 | 0                 | 39,5              |
|             | V2:2  | 1000                 | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 |
| Virån 3     | V3:1  | 840                  | 0,5               | 0                 | 0                 | 1                 |
|             | V3:2  | 780                  | 0,5               | 0                 | 0                 | 0                 |
| Virån 4     | V4:1  | 720                  | 16,5              | 4                 | 0                 | 3,5               |
|             | V4:2  | 690                  | 14                | 0,5               | 0                 | 1                 |
| Virån 5     | V5:1  | 1000                 | 73,5              | 6,5               | 0,5               | 17                |
|             | V5:2  | 960                  | 83,5              | 18                | 0                 | 27                |
| Virån 6     | V6:1  | 1000                 | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 |
|             | V6:2  | 1000                 | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 |
| Virån 7     | V7:1  | 960                  | 0                 | 0                 | 0                 | 0,5               |
|             | V7:2  | 840                  | 1                 | 2,5               | 0                 | 0,5               |
| Virån 8     | V8:1  | 720                  | 49                | 2                 | 0                 | 0                 |
|             | V8:2  | 1000                 | 19                | 1,5               | 0                 | 0                 |
| Virån 9     | V9:1  | 600                  | 0                 | 0,5               | 0                 | 0                 |
|             | V9:2  | 720                  | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 |
| Virån 10    | V10:1 | 1000                 | 97                | 10,5              | 0                 | 0                 |
|             | V10:2 | 1000                 | 68,5              | 19,5              | 0                 | 0                 |





Figur 14. Grafisk presentation av resultaten i Tabell 7. Målarts DNA koncentrationer visas i kopior per µl PCR reaktion som innehöll 10 µl eDNA.

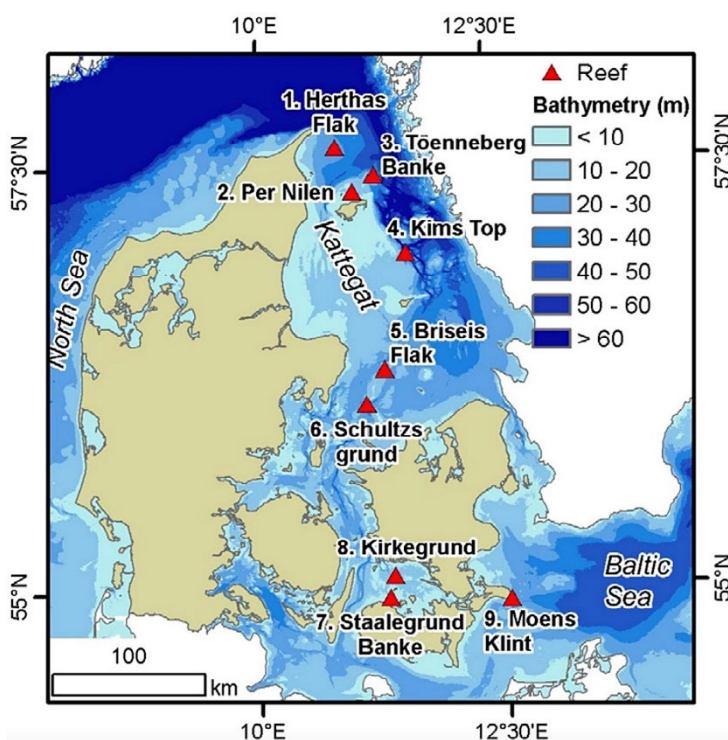
Resultaten visar att dPCR metoden kan övervaka förekomst av flera röd-listade arter samtidigt längs en flod. Förekomsten av tjock målarmussla (*Unio crassus*) var tidigare okänt men i ljuset av eDNA besöktes lokalerna och förekomsten av arten kunde bekräftas med visuella observationer.

## 3.4 Övervakning av allmän biologisk mångfald

### 3.4.1 Skattning av marin biodiversitet med eDNA

Många exempel, speciellt initialt, på framgångsrik användning av eDNA i miljöövervakningen kommer från sjöar och vattendrag. I den miljön är avgränsningen tydligare vad som undersöks. I havet däremot är det mer oklart – plockar vi upp DNA från mer avlägsna platser och observationer kanske undersökningen då egentligen inte säger något om hur det ser ut just på den platsen vi genomför undersökningen? Dessutom är den taxonomiska diversiteten i den marina miljön med alla drygt 30 djurstammar representerade plus en rikare algflora.

Tillsammans med kollegor i Danmark genomfördes en undersökning på nio hårdbottenrev i Kattegatt och Östersjön (Figur 15). Syftet var att jämföra eDNA som metod för att skatta biodiversiteten på dessa rev och jämföra med dykbaserad övervakning som tidigare använts i kontrollprogrammet för att utreda om DNA långt ifrån plockas upp, eller om den funna artsammansättningen kan hänföras till reven (Staeher et al. 2022). Vattenprover för eDNA togs nedströms, uppströms och direkt över nio reven som är omgiven av mjukbottnar med annan fauna och växtlighet. Varje vattenprov bestod av 780–1200 ml vatten taget ca. 1 m från botten som direkt filtrerades genom 0.22 µm Sterivex filter.



Figur 15. Lokaliseringen av de nio hårdbottenreven i Kattegatt och Östersjön. Från Staeher et al. (2022).

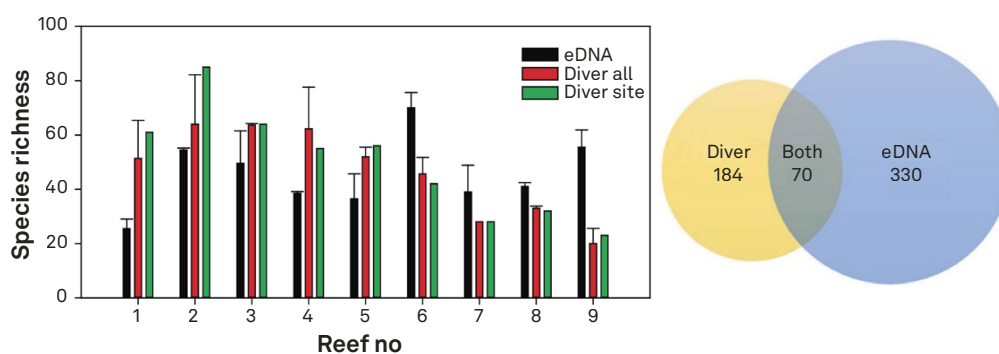
Tabell 8 sammanställer arter/släkten som hittats med de två olika metoderna för skattning av biodiversiteten. Här sammanfattar vi de viktigaste resultaten, mer detaljer och utförligare analyser finns i Staehr et al. (2022). Överlag hittas fler arter med eDNA från tre markörer (COI, 18S, och 12S) men för makroalger fungerar inte de markörer som använts och dessa saknas i eDNA resultat (Tabell 8, Figur 16). När det gäller makroalger saknas det beprövade protokoll för metabarcoding (Bartolo et al. 2020).

Vi ser att överlappen av gemensamt påträffade arter inte är så hög. Det visar att varken eDNA eller dykning ger en fullständig bild av artsammansättningen på reven men när det kommer till infauna och fisk är eDNA överlägsen dykning. Med tanke på att dykning är personalkrävande och kostsam så blir eDNA ett mer kostnadseffektivt alternativ – dock inte fullt täckande.

När det gäller artsammansättningen upp-, ned-ströms, på reven så finns det ingen indikation på annat än att de prov som tas direkt över reven speglar diversiteten där och i den absoluta närmsta omgivningen.

**Tabell 8. Sammanställning över antalet funna arter/taxa med olika metoder (från Staehr et al. 2022).**

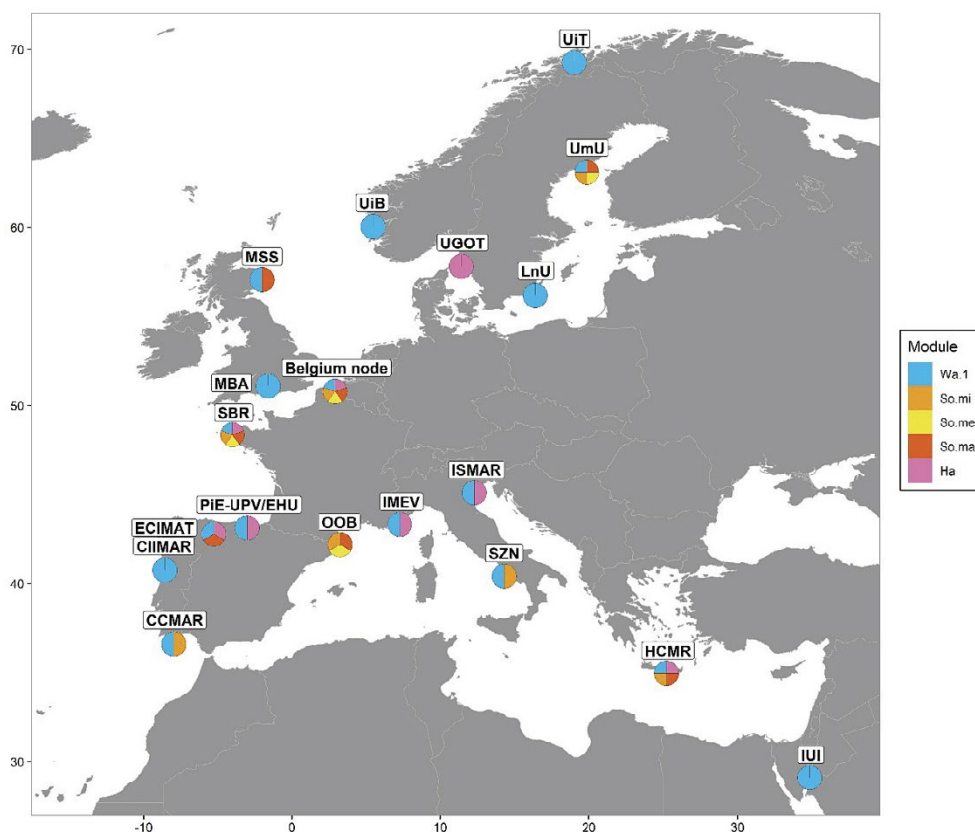
| Taxonomisk nivå | Funktionell grupp | Antal från dykning prov | Antal från eDNA | Tillsammans (% av totala antalet) | Totalt |
|-----------------|-------------------|-------------------------|-----------------|-----------------------------------|--------|
| art             | makroalger        | 78                      | 33              | 16 (13)                           | 127    |
|                 | epifauna          | 94                      | 143             | 48 (17)                           | 285    |
|                 | fisk              | 8                       | 36              | 4 (8)                             | 48     |
|                 | infauna           | 4                       | 118             | 2 (2)                             | 124    |
|                 | total             | 184                     | 330             | 70 (12)                           | 584    |
| släkte          | makroalger        | 49                      | 18              | 22 (25)                           | 89     |
|                 | epifauna          | 69                      | 105             | 50 (22)                           | 224    |
|                 | fisk              | 5                       | 26              | 6 (16)                            | 37     |
|                 | infauna           | 2                       | 98              | 3 (3)                             | 103    |
|                 | total             | 125                     | 247             | 81 (18)                           | 453    |



Figur 16. Grafisk sammanfattning av resultaten i Tabell 8. Till vänster: Jämförelse av det genomsnittliga antalet arter som observerats genom eDNA och dykarterade observationer vid varje rev. "Diver all" är ett genomsnitt av antalet arter som observerats från flera dykplatser, medan "Diver site" är antalet arter på platsen för eDNA-provtagning. Felstaplar anger en standardavvikelse. Till höger: Överlapp i antal identifierade arter med de två övervakningsmetoderna (dykning, eDNA). Från Staehr et al. (2022).

### 3.4.2 Mot ett genetisk övervakningsprogram

Med bakgrund i alla tidigare pilotförsök och implementeringsstudier lanserades sommaren 2021 ett pan-Europeisk nätverk för genetisk övervakning i kustnära områden (Santi et al. 2023). Detta nätverk har nu utvecklats och idag ingår mer än 20 långtids-övervakningsstationer som använder samma protokoll och metoder för att dokumentera den genetiska mångfalden och artsammansättning i plankton, mjuk- och hårbottenmiljöer. Sverige bidrar i dagsläget med tre stationer för långtidsövervakning (Kosterhavets nationalpark, Linnaeus Microbial Observatory, Umeå Marina Forskningsstation). Nätverket är långtidsfinansierad av den marina forskningsinfrastrukturen EMBRC ([www.EMBRC.eu](http://www.EMBRC.eu)) och GU koordinerar övervakningsprogrammet för hårbotten (Obst et al. 2020). Exempel på tillämpningar av denna observationsnätverket är spridningsstudier för främmande arter (Martaeng et al. 2023, Sundberg et al. 2022).



Figur 17. Karta som visar platsen för de 19 EMO BON (European Marine Omics Biodiversity Observation Network) observationsstationer. Typen av provtagning visas i färgkoder under varje observationsetikett. Wa.1: Vattenpelares provtagning (mikroorganismmodul); So.mi: Provtagning av mjukt substrat (mikroorganismmodul); So, me: Sampling av mjukt substrat (meiobentosmodul); So.ma: Provtagning av mjukt substrat (makrobentosmodul); Ha: Provtagning av hårt substrat (Modul för Autonomous Reef Monitoring Structure).

## 4. Diskussion

Det råder ingen tvekan om att olika DNA-baserade metoder för att identifiera och upptäcka arter kommer att få en allt större betydelse i miljöövervakningen. Det finns många publicerade framgångsrika studier baserade på eDNA och vi har också visat under projektets gång i samband med olika undersökningar och tester att det fungerar och i vissa fall säkert kan ersätta befintliga metoder, beroende på frågeställningen. Handlar det till exempel att påvisa förekomsten av fiskarter i en sjö fungerar det bra, men det ger ingen uppfattning om storlek, åldersfördelning, reproduktiv status – frågor som kan vara viktiga i ett bevarandeperspektiv. Det är därför viktigt att det blir tydligt för myndigheter, vattenvårdsförbund och andra aktörer vad eDNA kan göra, och vad tekniken inte kan göra. Här har vi stött på en bristande kunskap och kanske att tekniken speciellt i början har presenterats på ett sätt som gör att det har ställts orimliga och oriktiga förväntningar. Så är metoderna mogna för mer omfattande användning? Vi tror det men vill samtidigt lyfta några aspekter som behöver synliggöras, utvärderas och diskuteras. Det gäller till exempel hur metabarcoding studier ska tolkas och analyseras, behovet av verifiering och risken för olika falska svar.

### *Metabarcoding*

Metabarcoding av hela den biologiska samhällen är förmodligen den vanligaste applikationen av eDNA, speciellt när det kommer till fisksamhällen i den limniska miljön. Här presenteras oftast resultatet som en lista av påträffade arter men utan djupare bakgrundsinformation. Detta har diskuterats och påtalats i Sundberg et al. (2020) med en uppmaning till beställare att ställa större krav på levererade rapporter. Idag går det inte att på ett vedertaget vetenskapligt sätt utvärdera, eller upprepa studierna, utifrån den data som presenteras. Det framförs ibland att om alla dessa detaljer ska vara med så blir rapporterna för tekniska, men det finns idag inga hinder att göra olika bakgrundsdata och annan mer teknisk information tillgänglig i olika databaser. Inom den vetenskapliga publiceringen har det idag till exempel blivit standard att lägga den här typen av information som ”supplementary material” utanför själva publikationen. Vi ser idag inga tekniska hinder för att, speciellt, beställande myndigheter hanterar datalaggningen av information på ett sådant sätt så att den blir tillgänglig för extern utvärdering och för framtida (andra) analysmetoder.

Att svaret kan bero på vad man frågar gäller också i hög utsträckning metabarcoding-analyser. De generella primrar som används kommer att svara på olika sätt mot olika arter – för vissa passar den bättre och för andra sämre. Det kommer att påverka hur många sekvenser som produceras i sekvenseringssteget och det här kan påverka till exempel om resultatet tolkas i form av populationsstorlek. Det kan också innebära att vissa mer ovanliga arter ”skuggas” i analysen och kanske inte alls noteras. Detta är dock en mycket vanlig artefakt även med traditionella metoder.

Vi är tveksamma till att relatera mängden sekvens-läsningar till populationsstorlek annat än i mycket generella och relativa termer. Även om abundans påverkar så finns det många andra faktorer, organismernas biomassa, temperatur och aktivitet bland djur, avstånd till källan, och andra abiotiska förhållanden. Vi kunde till exempel påvisa att en så självklar faktor som vattenståndet i den å vi tog prover för

flodpärlmussla kraftigt påverkade antalet positiva partitioner i dPCR-analysen. Skulle det ha tolkats i absoluta termer så hade populationen förändrats kraftigt på ett par månader. Däremot verkar metabarcoding metoder kunna användas för att kartlägga inomartsvariation och konnektivitet mellan populationer ifall provtagning och analyserna är standardiserade (Martaeng et al. 2023).

En aspekt som inte framgår tydligt i många rapporter är också hur valet av referensdatabas kan påverka resultatet. Kopplat till detta är också nödvändigheten av att taxonomiskt kontrollera och utvärdera oväntade arter. I Sundberg et al. (2022a) ges exempel på vad som krävs för den här typen av taxonomisk utvärdering. Rapporter av speciellt främmande arter kan av naturliga skäl få betydande konsekvenser och då är det viktigt att utesluta att det är själva verket handlar om en närbesläktad inhemsk art.

#### *Verifiering av eDNA inom miljöövervakningen*

Många undersökningar handlar om att påvisa förekomsten av specifika målarter, speciellt gäller detta övervakningen av invasiva och rödlistade arter. I de här fallen är någon form av kvantitativ PCR både enklare (kräver ingen sekvensering eller bioinformatisk analys) och känsligare. Men det är viktigt att för varje aktuell målart verifiera att det fungerar i fält, under realistiska förhållanden. Thalinger et al. (2021) identifierar fem steg i en verifierings-process, vad vi kan se i litteraturen så uppfylls i många fall bara de två första stegen (ovan) och utifrån detta utgår man ifrån att det också fungerar i fält. Vi har dock exempel på när det inte fungerar. Till exempel så kunde Sundberg et al. (2016) visa att även om blåskrabba kunde påvisas med eDNA och ddPCR (digital droplet PCR) i vattnet från akvarium med flera krabbor så gick det inte i ett kontrollerat fältförsök. Här placerades krabbor i en bur i havet och prover togs på olika avstånd och riktningar från buren utan att det gick att få någon indikation på arten med eDNA. Ett liknande försök genomfördes med en annan invasiv art, vitfingrad brackvattenkrabba – den här gången med dPCR (beskrivet ovan). dPCR fungerade med vatten från spann med krabbor, men ingen respons observerades med vattenprov tagna direkt i anslutning till observerade krabbor på grunt vatten. I det senare fallet blev vår rekommendation att använda andra metoder för övervakning av brackvattenkrabba.

Vi har i andra kontrollerade undersökningar visat att eDNA fungerar som övervakningsmetod. Ovan beskrivna undersökningarna med stormusslor, solaborre och svartmunnad smörbult är verifikationer på att eDNA fungerar som övervakningsmetod. Även om det finns kopplingar till populationsstorlek och antalet kopior av målarts DNA i dPCR-analysen så är det ändå inte ett absolut mått och resultaten ska tolkas i termer som finns/finns inte i första hand. Ett positivt svar kan däremot utgöra anledning till utökad undersökning.

#### *eDNA och falska svar*

I en eDNA undersökning kan vi dels träffa på falska positiva och falska negativa. Falska positiva svar kan bero på att gammalt DNA finns kvar långt efter att källan försvunnit, eller att en miljö blivit ”kontaminerad” med till exempel fiskrens eller avlopp från närliggande restaurang. Eller att DNA kommer från en lokal långt ifrån, till exempel har färdats till en sjö med vatten från ett tillrinnande vattendrag. Vi (Axberg 2021) kunde visa att DNA bryts ner ganska fort och det är också vad som andra studier har kunnat visa (Kutti et al. 2020). Därför kan det vara idé att upprepa en provtagning efter en vecka eller två om något oväntat har påträffats, detta gäller ju då framför allt invasiva arter där ett falskt svar kan få stora konsekvenser.

Ett alternativ kan vara att basera undersökningar på eRNA. Miyata et al. (2021) visar till exempel att eRNA kan fungera bättre i undersökningar av fisksamhällen i en sjö än eDNA. Samt att det påvisar falska positiva svar och är en indikator på att vad som är levande bland funna arter. eRNA används idag inte vid rutinmässiga DNA-baserade undersökningar, men kommer förmodligen bli vanligare i framtiden allteftersom olika molekylärbiologiska tekniker utvecklas och förfinas.

Risken och förekomsten av falska negativa svar är något som behöver uppmärksammas och utredas mer. Vi har i rapporten beskrivet hur vissa invasiva krabbor är svåra att övervaka med eDNA, att alla arter på stenreven i Danmark inte hittades med eDNA fast det fanns. I de olika verifieringsstegen som Thalinger et al. (2021) anger når väldigt få undersökningar upp till steg 4 och 5. Hur många individer, hur mycket biomassa krävs för att generera tillräckligt med DNA för att kunna upptäckas? Detta varierar förstås mellan arter och grupper av organismer – fiskar till exempel är förmodligen lättare att upptäcka än fastsittande djur. Hur många prover behövs för att med viss säkerhet kunna säga att en art verkligen inte finns i den undersökta miljön? Detta är komplicerade frågor som Klymys et al. (2020) ger prov på hur de kan angripas. Men här krävs mer grundläggande forskning och större medvetenhet om problemet. Det är speciellt viktigt att veta de här gränserna när det kommer till övervakning/upptäckt av invasiva arter där resultaten kan få stora ekonomiska och legala konsekvenser.

Negativa svar är svåra att tolka som ”arten finns inte”. I en undersökning av ullhandskrabba (Dahl & Boltenstern, 2023) konstaterar undersökningen att inga spår hittas. Det framhålls i rapporten att arten förmodligen är svår att påvisa med eDNA, samtidigt som man ser resultatet som positivt och indikation på att arten inte finns, eller hör hemma, i området. Negativa resultat bör rapporteras som ”inget resultat” ”går inte att utesluta” eller med en statistisk bedömning av ett Typ II fel, d.v.s. sannolikheten/risken för utsagan att arten inte finns i undersökningsområdet fast den egentligen gör det.

## 5. Slutsatser och rekommendationer

Vi har i olika delprojekt visat att DNA-baserade metoder fungerar i miljöövervakningen. Delrapporterna visar att målartsanalys med dPCR är en mycket lämplig metod för att kartlägga förekomst och utbredning av arter med känd identitet. Likadant är flerartsanalys är en mycket lämplig metod för allmänna uppskattningar av biodiversitet, för att spåra och identifiera okända arter, och för att mäta genetisk mångfald och inomartsvariation. Metoderna fungera däremot inte för alla arter, grupper och frågeställningar.

I vissa fall bör DNA-baserade metoder kunna direkt ersätta befintliga övervakningsprotokoll. Ett exempel är övervakningen av främmande arter i hamnar och marinor där nuvarande eRAS protokoll inte hittar arter på samma sätt som eDNA och genomisk DNA-analys gör. Övervakning av målarter i sjöar och vattendrag med kvantitativ PCR tycks också i många fall kunna ersätta andra mer kostsamma, invasiva, och destruktiva metoder som till exempel provfiske.

Den övergripande slutsatsen är att framtida övervakning av främmande arter bör i huvudsak baseras på DNA-identifiering av arter. Men, som Husa et al. (2024) visar så kan det också finnas en vinst i att kombinera dessa metoder med traditionella metoder baserade på visuella observationer. I slutändan får det bli en fråga om budget och acceptabelt utfall där omfattningen av provtagningen får styras av budget och praktiska möjligheter. Det får också bli en avvägning mellan sannolikheter att hitta en art i ett givet område och att kunna inventera ett större geografiskt område givet en begränsad budget. Om en art har upptäckts i ett område kan det finnas anledning att följa dess utbredning i närheten med mer artspecifik mål-artsanalys.

Det finns fortfarande frågor som behöver lyftas och som kräver fördjupade analyser och studier och förbättrade övervakningsrutiner. Dessa frågor borde dock inte bromsa tillämpning av DNA-metoder i övervakningsprogram utan borde bli en del av dessa.

DNA-baserade undersökningar kopplade till specifika målarter behöver verifieras och säkerställas med oberoende observationer i realistiska fältsituationer innan de kan ersätta nuvarande övervakning.

Risker för olika falska svar bör belysas bättre i rapporter, speciellt svårt att hantera är falska negativa. Här skulle det behövas grundläggande studier, teoretiska och empiriska, vad gäller storleken av provtagningen kopplat till statistiska *Typ I* och *Typ II* fel. Detta är också kopplat till frågan om metodernas känslighet ("level of detection").

Det behövs en bättre dialog mellan beslutsfattare, beställare och utövare av DNA-baserad miljöövervakning så att det tydliggörs vad som efterfrågas och vilka förväntningar man kan ställa på DNA-baserade metoder. Det är viktigt att välja rätt metod för en viss frågeställning.

Rapporter, speciellt undersökningar baserade på metabarcoding behöver dokumenteras bättre och innehålla mer tekniska detaljer för att kunna utvärderas. Data bör sparas i publika databaser så långt möjligt för att kunna möjliggöra jämförande analyser från olika övervakningsinsatser.



## 6. Tack

Förutom namngivna personer som finns med på olika artiklar och rapporter vill vi också tacka alla andra som varit engagerade i projektet på olika sätt: Helena Wiklund, Donald Blomqvist, Peter Lundström, Anna Dimming, Erland Lettevall, Peter Nordin. Vi vill också tacka alla de som varit väldigt hjälpsamma och tillmötesgående i samband med provtagningar och utsättande av olika redskap i hamnar och marinor. Till sist vill vi tacka Gunilla Ejdung för hennes stöd och engagemang genom åren när det kommer till användningen av DNA-baserade metoder inom miljöövervakningen.

## 7. Källhänvisning

Rapporter markerade med \* finns att hämta på <https://seanalytics.se/> eller fås på begäran från rapportens förste författare.

Andruszkiewicz Allan, E., Zhang, W. G., C. Lavery, A. & Govindarajan, A. (2021). Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*, 3: 492–514.

Axberg, A. (2021). Comparing genetic methods – Detecting and monitoring non-indigenous species. Mastersuppsats 60 hp Göteborgs universitet.\*

Bartolo, A. G., Zammit, G., Peters, A. F. & Küpper, F. C. (2020). The current state of DNA barcoding of macroalgae in the Mediterranean sea: presently lacking but urgently required. *Botanica Marina*, 63: 253–272.

Bergkvist, J., Magnusson, M. & Rosenberg, R. (2017). Test och utvärdering av ny övervakning av främmande arter i hamnar och utsatta områden. Havs- och vattenmyndigheten rapport 2017:13.

Bergkvist, J., Magnusson, M., Obst, M., Sundberg, P. & Andersson, G. (2020a) Provtagningsdesign för övervakning av främmande arter. Övervakning i marin miljö. Havs- och vattenmyndighetens rapport 2020:22. ISBN 978-91-88727-86-2.

Bergkvist, J., Fransson, K. & Norlinder, E. (2020a). Vidareutveckling och test av övervakning av främmande arter. Extended Rapid Assessment Survey – eRAS. Havs- och vattenmyndigheten rapport 2020:23.

Bergkvist, J., Fransson, K. & Norlinder, E. (2020b). Övervakning av främmande arter i hamnar med förenklad provtagning enligt eRAS-metoden – Fältrapport 2019. Havs- och vattenmyndigheten rapport 2020:24.

Bergkvist, J., Fransson, K. & Norlinder, E. (2021). Övervakning av främmande arter i hamnar med förenklad provtagning enligt eRAS-metoden – Fältrapport 2020. Havs- och vattenmyndigheten Rapport 2021:16.

Bergkvist, J. & Fransson, K. (2022). Övervakning av främmande arter i hamnar med förenklad provtagning enligt eRAS-metoden. Fältrapport 2021. Havs- och Vattenmyndigheten Rapport 2022:05.

Bohman, P., Sundberg, P., Klint, M. & Obst, M. (2018). Jakten på solabborren (*Lepomis gibbosus*) – en eDNA-studie i Kungsbackaån. Department of Aquatic Resources, Sveriges lantbruksuniversitet. Aqua Reports 2018:21.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. & Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13: 581–583.

Dahl, M. & Boltenstern, M. (2023). Undersökning av akvatiska invasiva främmande arter med miljö-DNA. IVL rapport C782.

Doi, H., & Nakamura, K. (2023). Environmental DNA as a practical tool for aquatic conservation and restoration. *Landscape and Ecological Engineering*, 19: 1–2.

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–299.
- Green L., Dahlgren TG, Axberg A, Panova M, Obst M & Sundberg P (2024). Monitoring of the invasive round goby in an estuarine seascape based on eDNA. bioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2024.05.06.592655>
- Hunter, M. E., R. M. Dorazio, J. S. S. Butterfield, G. Meigs-Friend, L. G. Nico & Ferrante, J. A. (2017). Detection limits of quantitative and digital PCR assays and their influence in presence–absence surveys of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 17: 221–229.
- Husa, V., Fossøy, F., Davey, M., Agnalt, A-L., Bransøgg, H., Bruntveit, L., Eilertsen, M., Falkenhaug, T., Forsgren, E., Grefsrud, E. S., Taraldset Haugland, B., Asserud Olsen, S., Olsson, R. & Svensen, Ø. (2024). Monitoring marine alien species in Norway. A pilot study for implementing a national program. Rapport från Havforskningen nr 2024-1.
- Kirtane, A., Wiczorek, D., Noji, T., Baskin, L., Ober, C., Plosica, R., Chenoweth, A., Lynch, K., & Sassoubre, L. (2021). Quantification of Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three commercially harvested fish species and comparison between eDNA detection and trawl catches. *Environmental DNA*, 3: 1142–1155.
- Klymus, K.K., Merkes, C.M., Allison, M.J., Goldberg, C.S., Helbing, C.C., Hunter, M.E., Jackson, C.A., Lance, R.F., Mangan, A.M., Monroe, E.M., Piaggio, A.J., Stokdyk, J.P., Wilson, C.C. & Richter, C.A. (2020). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, 2: 271–281.
- Kutti, T., Johnsen, I.A., Skaar, K.S., Ray, J.L., Husa, V. & Dahlgren, T.G. (2020). Quantification of eDNA to map the distribution of cold-water coral reefs. *Frontiers in Marine Science*, 7: 446.
- Lundberg, S. & Bergengren, J. (2008). Miljöövervakningsstrategi för stormusslor. Utveckling av nationell miljöövervakning för sötvattenslevande stormusslor 2008. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2008:1. Naturhistoriska riksmuseets småskriftserie.
- Martaeng, R., Obst, M. & Kuklinski, P. (2023). Phylogeographic study using autonomous reef monitoring structures indicates fast range expansion of the invasive bryozoan *Juxtacribrilina mutabilis*. *Hydrobiologia*, 850: 4115–4126.
- Meyer, C.P. (2003). Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 401–459.
- Miyata, K., Inoue, Y., Amano, Y., Nishioka, T., Yamane, M., Kawaguchi, T., Morita, O. & Honda, H. (2021). Fish environmental RNA enables precise ecological surveys with high positive predictivity. *Ecological Indicators*, 128:107796.
- Morin, F., Panova, M., Schweizer, M., Wiechmann, M., Eliassen, N., Sundberg, P., Cluzel-Burgalat, L. & Polovodova Asteman, I. (2023). Hidden aliens: Application of digital PCR to track an exotic foraminifer across the Skagerrak (North Sea) correlates well with traditional morphospecies analysis. *Environmental Microbiology*, 25: 2321–2337.

- Obst, M., Källström, B., Panova, M., Breidenbach, M. & Sundberg, P. (2023). Övervakning av främmande arter: jämförelse eRAS och DNA-baserad inventering Wallhamn (Tjörn). SeAnalytics rapport 2023:2.\*
- Obst, M., Exter, K., Allcock, A.L., Arvanitidis, C., Axberg, A., Bustamante, M. et al. (2020). A marine biodiversity observation network for genetic monitoring of hard-bottom communities (ARMS-MBON). *Frontiers in Marine Sciences*, 7: 572680.
- Panova, M., Axberg & A. Wocken, Y. (2021). Development of dPCR assay for DNA-based identification of the round goby (*Neogobius melanostomus*). SeAnalytics rapport 2021:05.\*
- Panova M., Breidenbach, M., Sundberg, P., Barthel Svedén, J. & Reid, N. (2022). Inventering av vitfingrad brackvattenskrabba (*Rhithropanopeus harrisi*) med eDNA-metodik – en pilotstudie SeAnalytics rapport 2022:10.\*
- Panova, M., Breidenbach, M. & Sundberg, P. (2023a). Artbestämning av påväxt på fritidsbåtar med hjälp av DNA-streckkodning. Sanger sekvensering. SeAnalytics Rapport 2022:13.\*
- Panova, M., Breidenbach, M. & Sundberg, P. (2023b). Artbestämning av påväxt på fritidsbåtar med hjälp av DNA-streckkodning. Metabarcoding. SeAnalytics Rapport 2023-06.\*
- Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L. & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*, 29: 4258–4284.
- Santi, I., Beluche, O., Beraud, M., Buttigieg, P. L., Casotti, R., Cox, C. J. et al. (2023). European Marine Omics Biodiversity Observation Network: a strategic outline for the implementation of molecular approaches in ocean observation. *Frontiers in Marine Sciences*, 10: 1118120.
- Sassoubre, L. M., Yamahara, K. M., Gardner, L. D., Block, B. A., & Boehm, A. B. (2016). Quantification of Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates for Three Marine Fish. *Environmental Science & Technology*, 50: 10456–10464.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L, Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B. et al. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 7537–7541.
- Staeher, P.A.U., Dahl, K., Buur, H., Göke, C., Sapkota, R., Winding, A., Panova, M., Obst, M. & Sundberg, P. (2022). Environmental DNA monitoring of biodiversity hotspots in Danish marine waters. *Frontiers in Marine Sciences*, 8: 800474.
- Stelzer, M., Ord, J., Neyrinck, S., Steiner, J., Hartikainen, H., Brys, R., & Schmidt-Posthaus, H. (2023). Optimal detection protocol of *Tetracapsuloides bryosalmonae* by environmental DNA: A comparison of qPCR and ddPCR approaches. *Environmental DNA*, 6:e501.
- Strand, M., Aronsson, M. & Svensson, M. (2018). Klassificering av främmande arters effekter på biologisk mångfald i Sverige – Artdatabankens risklista. Artdatabanken Rapport 21. Artdatabanken, SLU, Uppsala.

Sundberg, P., Berggren, M. & Dahlgren, T. (2016). Test av eDNA och ddPCR som metod för att upptäcka/övervaka invasiva främmande arter: svartmunnad smörbult och blåskrabba. Rapport till Havs- och vattenmyndigheten dnr 3574-16.\*

Sundberg, P., Haenel, Q. & Bourlat, S. (2018). Utvärdering av DNA-streckkodning och referensbibliotek för övervakning av invasiva främmande arter. Rapport Havs- och Vattenmyndigheten dnr 2440-15.\*

Sundberg, P., Obst, M., Bourlat, S.J., Bergkvist, J. & Magnusson, M. (2018). Utvärdering av ny övervakning av främmande arter. Metodjämförelse mellan traditionell och DNA-baserad identifiering. Havs- och vattenmyndighetens Rapport 2018:24.

Sundberg, P., Panova, M., Strand, M. & Svensson, M. (2020). eDNA och fiskinventeringar – ställ krav på rapporterna. *Fauna & flora*, 115: 40–47.

Sundberg, P., Axberg, A., Daragmeh, N., Panova, M. & Obst, M. (2022a). Genetic methods in environmental monitoring. Early detection and monitoring of non-indigenous species based on DNA. Havs- och vattenmyndigheten Rapport 2022:4, ISBN: 978-91-89329-32-4.

Sundberg, P., Axberg, A., Bravell, F., Wocken, Y., Ahlsen, J., Bergkvist, J. & Magnusson, M. (2022b). Övervakning av svartmunnad smörbult – pilotstudie med eDNA och provfiske i Göteborgs skärgård 2021 Länsstyrelsen Västra Götaland Rapport 2022:14. ISSN 1403-168X.

Sundberg, P., Axberg, A., Cluzel-Burgalat, L., Wocken, Y. & Panova, M. (2023). Analys av eDNA i sediment och vatten i Kalmar län. Stormusslor och fisksamhällen i Alsterån och Virån. Rapport till Länsstyrelsen Kalmar Län.\*

Sundberg, P., Dorup, T., Breidenbach, M. & Panova, M. (2023 b). Test: inventering av lädersjöpung (*Styela clava*) med eDNA-metodik. Rapport Länsstyrelsen Västra Götaland.\*

Sundberg, P. (2023). En skata är en skata och en gädda en gädda. *Clarteisten (Uppsala) 2023(2): 20–23.*

Sundberg, P., Axberg, A., Daragmeh, Wengström, N. & Panova, M. Monitoring of endangered freshwater mussels using digital PCR (dPCR) (manuskript).

Sundqvist, F., Sundberg, P., Cluzal-Burgalat, L., Breidenbach, M. & Panova, M. (2023). Uppföljande inventering av den invasiva arten solabborre. Länsstyrelsen Halland Rapport 2023:01.

Taberlet, P. Bonin, A., Zinger, L. & Coissac, E. (2018). *Environmental DNA for biodiversity research and monitoring*. Oxford University Press.

Thalinger, B., Deiner, K., Harper, L.R., Rees, H.C., Blackman, R.C., Sint, D., et al. (2021). A validation scale to determine the readiness of environmental DNA for routine species monitoring. *Environmental DNA*, 3: 823–836.

van der Loos, L.M. & Nijland, R. (2021). Biases in bulk: DNA metabarcoding of marine communities and the methodology involved. *Molecular Ecology*, 30: 3270–3288.

Wacker, S., Fossøy, F., Larsen, B. M., Brandsegg, H., Silverstgård, R. & Karlsson, S. (2019). Downstream transport and seasonal variation in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) eDNA concentration. *Environmental DNA*, 1: 64–73.

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

# DNA-baserad övervakning av arter i akvatisk miljö

## Verifiering och tillämpning

DNA-baserade metoder för att identifiera och upptäcka arter kommer att få en allt större betydelse i miljöövervakningen. Flertal studier visar på att de kan ersätta traditionella metoder som provfiske, elfiske och visuella observationer. DNA-baserade metoder kan idag användas för att påvisa förekomst av art/arter, men ännu inte för skattning av populationers exakta storlek, spridning och reproduktiva förmåga. Detta är dock aktiva forskningsområden. Fiskar är generellt stora och rörliga, vilket leder till att de släpper ut mängder med DNA, arter som är mindre och mer stationära släpper ifrån sig mindre DNA. Det leder till att man kan få både falska positiva och falska negativa resultat med DNA-baserade metoder.

Forskarna har genom jämförande studier, försök i fält och mesokosm-experiment undersökt hur många prover som behöver tas, hur provtagningen ska gå till samt hur lätt arter kan identifieras genom att fånga upp dess DNA. Studierna har genomförts både i den limniska och marina miljön och berör flera olika arter och djurstammar.

Forskningen visar att eDNA som metod är bättre på att hitta arter i vissa fall, medan traditionella metoder är att föredra för andra arter då dessa är svåra att upptäcka med eDNA. Att förstå när och hur DNA-baserade metoder kan användas är viktigt ur ett bevarandeperspektiv för de som arbetar med miljöövervakning.

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