

Inventering av groddjur i tre dammar i Lövsta med eDNA samt konventionell metodik

AquaBiota Report 2019:06

Författare: Nicklas Wijkmark, Cecilia Edbom
Blomstrand, Vide Ohlin, Micaela Hellström

AquaBiota Water Research



AquaBiota

STOCKHOLM, JUNI 2019, UPPDATERAD NOVEMBER 2019

Beställare:

Undersökningen är utförd av AquaBiota Water Research AB för Sweco Energuide AB.

Författare:

Nicklas Wijkmark (nicklas.wijkmark@aquabiota.se)

Cecilia Edbom Blomstrand (cecilia.edbom.blomstrand@aquabiota.se)

Vide Ohlin (vide.ohlin@calluna.se)

Micaela Hellström (micaela.hellstrom@aquabiota.se)

Bilder:

Nicklas Wijkmark

Kontaktinformation:

AquaBiota Water Research AB

Adress: Löjtnantsgatan 25, SE-115 50 Stockholm, Sweden

Tel: +46 8 522 302 40

www.aquabiota.se

Kvalitetsgranskad av:

Johan Näslund (johan.naslund@aquabiota.se)

Distribution:

Fri

Internetversion:

Nedladdningsbar hos www.aquabiota.se

Citera som:

Wijkmark, N., Edbom Blomstrand, C. Ohlin, V., Hellström, M. 2019. Inventering av groddjur i tre dammar i Lövsta med eDNA samt konventionell metodik. AquaBiota Report 2019:06. 13 sid.

INNEHÅLL

INNEHÅLL	3
Sammanfattning	4
1. Inledning	5
2. Material och Metoder	6
2.1 Fältmetoder eDNA	6
2.2 Laboratoriemetoder eDNA	7
2.3 Fältmetoder – konventionella inventeringar	8
3. Resultat och Diskussion	8
3.1. Arternas förekomst – eDNA och sammanlagd översikt	8
3.2. Resultat från konventionella inventeringar	9
3.3. eDNA kvalitet samt kvalitetskontroll	10
3.4. Diskussion	10
Referenser	14

SAMMANFATTNING

I april 2019 utförde AquaBiota på uppdrag av Sweco Energuide AB en eDNA-inventering av groddjursfaunans sammansättning samt groddjurssjukdomar i tre dammar i Lövsta damm- och våtmarkssystem. Sex vattenprover från tre dammar samlades in för undersökningen och analyserades. Resultaten jämfördes med en parallell undersökning av groddjurs förekomst med konventionella inventeringsmetoder vilka utfördes av Vide Ohlin på Calluna.

I båda inventeringsmetoderna (eDNA samt konventionella inventeringar) hittades arterna vanlig padda och mindre vattensalamander. Padda hittades med båda metoderna i samtliga dammar medan mindre vattensalamander hittades i två av tre dammar vid konventionell inventering och i samtliga tre dammar vid eDNA-inventering. Groddjurssjukdomar påträffades inte i undersökningen.

1. INLEDNING

I området vid Lövsta avfallsanläggning planeras ett nytt kraftvärmeverk samt ny hamnanläggning. På uppdrag av Sweco Energuide AB har AquaBiota därför utfört en fältundersökning av tre dammar på och anslutning till golfbanan som ligger strax norr om Lövsta avfallsanläggning. De tre dammarna undersöktes med eDNA våren 2019 med avseende på groddjurs förekomst. Inventering med konventionella metoder genomfördes också i dammarna vid sammanlagt fem tillfällen mellan april och mitten av juni 2019. Resultaten jämfördes med eDNA (miljö DNA) analyser som baserade på vattenprover som togs den 29 april 2019. Vidare undersöktes dammarna med eDNA-metoden för eventuell förekomst av groddjurssjukdomen *Chytridiomycosis* som hos grodor och paddor orsakas av svamparten *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) och hos salamanderarter av svamparten *B. salamandrivorans* (Bs).

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

2. MATERIAL OCH METODER

2.1 Fältmetoder eDNA

Fältarbetet utfördes 26 april 2019. Provtagningspunkter anges i Figur 1 och i tabell 1. Koordinaterna anges som decimalgrader i WGS84. Lufttemperaturen mätte 2–17 °C. Provpunkternas position bestämdes i samråd med uppdragsgivaren. Djupet varierade mellan 0,2 och 1 meter.

Innan provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria engångsförpackningar. Fem liter vatten samlades in per prov i form av 10 underprover som var jämnt fördelade längs dammens strandkant enligt Spens m.fl. (2017). Vattnet blandades och filtrerades. Negativa fältkontroller utgjordes av rent vatten som hanterades med samma provtagningsutrustning som proverna och filtrerades på plats för att utesluta kontaminering av DNA mellan prover eller från provtagare. Insamling och fixering följde Spens m.fl. (2017).



Figur 1. Provtagningspunkter i dammarna. Bakgrundskarta CC BY-SA OpenStreetMap Foundation.



Figur 2. Dammarna C, D1 och D2 samt hane av mindre vattensalamander som påträffades i damm C vid eDNA-provtagning.

Tabell 1. Provpunkter. Damm, position, djup vid provtagningen, volym filtrerat vatten (mL), vattentemperatur, provtagningstidpunkt och mållart för varje provpunkt. Proven samlades in 26 april 2019.

Provpunkt namn	Damm	Latitud (N)	Longitud (Ö)	Djup (m)	Volym (mL)	H ₂ O °C	Tid	Mållart
LG -01_A Lövsta Damm 1	D1	59,389123	17,787982	0,5	4000	8,0	07:10	groddjur
LG_01_B Lövsta Damm 1	D1	59,389212	17,788198	0,5	3000	8,0	07:10	groddjur
LG_02_B Lövsta Damm 2	C	59,390292	17,78660	0,5	2400	11,6	07:30	groddjur
LG_02_B Lövsta Damm 2	C	59,390266	17,786408	0,5	2400	11,6	07:45	groddjur
LG_03_B Lövsta Damm 3	D2	59,388892	17,787433	0,5	3500	11,3	08:40	groddjur
LG_03_B Lövsta Damm 3	D2	59,388712	17,786641	0,5	3000	11,3	08:45	groddjur

2.2 Laboratoriemetoder eDNA

För groddjur gjordes flerartsanalyser. Vidare undersöktes svampsjukdomarna Bd och Bs genom enartsanalyser d.v.s. qPCR. Laboratoriemetoderna beskrivs i bilaga 1, 2, 3 och 4.

2.3 Fältmetoder – konventionella inventeringar

De konventionella inventeringarna utfördes av Vide Ohlin med visuellt eftersök med hjälp av lampa, audiellt eftersök för att upptäcka spelande grodor eller paddor samt med hjälp av Ortmanfällor.

Två lampor användes, den ena en pannlampa med bred ljuskägla och den andra en handhållen ficklampa med smal ljuskägla denna lämpar sig väl för eftersök på längre distanser och i vatten medan den föregående lämpar sig bättre för eftersök vid kortare avstånd på land. Båda lamporna har en maximal ljusstyrka på ca 1000 lumen.

Ortmanfällor är en typ av fälla som utgörs av en större hink med fem ingångar vilka utgörs av inåtvända trattar. Den använda fällan saluförs på www.salamander-trap.no.

Upplägg för undersökningen

Totalt fem besök genomfördes. Inventeringsområdet utgjordes av de tre dammarna i figur 1. Därtill utfördes stråkinventering längs inventeringssträckan som visas i bilaga 7. Den valda sträckan löper utmed Kyrkhamnsvägen, Lövestavägen och det dike som löper nordöst från Lövestavägen mot Lingonrisgräns.

Tabell 2. Tider och väderförhållanden vid de fyra inventeringstillfällena med konventionella metoder.

Datum	Klockslag	Väder	Metod
2019-04-21	19:50-23:00	4°C. Dagstemp. 15°C. Ingen nederbörd.	Visuellt och audiellt eftersök.
2019-04-23	20:00-23:00	5°C. Dagstemp. 20°C. Ingen nederbörd.	Visuellt och audiellt eftersök.
2019-05-23	20:30-23:30	10°C. Dagstemp. 16°C. Ingen nederbörd.	Visuellt och audiellt eftersök. Utplacering av fällor.
2019-05-24	20:00-23:00	9°C. Dagstemp. 18°C. Lätta regnskurar.	Visuellt och audiellt eftersök. Vittjande av fällor.
2019-06-14	23:30-01:30	15°C. Dagstemp 23°C. Duggregn tidigare under dagen.	Visuellt eftersök i vatten och på land.

3. RESULTAT OCH DISKUSSION

3.1. Arternas förekomst – eDNA och sammanlagd översikt

I den konventionella inventeringen påträffades vanlig padda (*Bufo bufo*) i alla tre av dammarna och mindre vattensalamander (*Lissotriton vulgaris*) i två dammar. eDNA-studien detekterade vanlig padda och mindre vattensalamander i alla tre undersökta dammar (tabell 2). Tabell 3 visar artförekomsten i procent. Vanlig padda dominerade i damm D1 och D2, medan mindre vattensalamander dominerade i damm C. Sekvenserna matchade 90 % (D1), 73% (C) och 60% (D2) referenser för målarterna groddjur.

Förutom groddjuren påträffades även sekvenser av rådjur, åkersork och större skogsmus vid damm D2. Vidare påträffades DNA-spår av gravand/gräsand i damm C och D2. Dessa arter hybridiserar i det vilda och kan inte särskiljas för denna sekvens. Sothöna påträffades i damm D1. Spår av fisk-eDNA påträffades i alla prov, och härstammar troligtvis från vattnet som pumpas in från Mälaren i dammarna som inte innehåller fisk. Antal läsningar för arternas sekvenser finns i tabell B6_1 i bilaga 6. Ingen av patogenerna *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) eller *B. salamandrivorans* (Bs) påträffades i någon av dammarna.

Tabell 3. Jämförande tabell av de två inventeringsmetoderna. Vanlig padda upptäcktes i alla dammar oavsett metod. Mindre vattensalamander upptäcktes i damm C och D23 med traditionell inventeringsmetod. Med eDNA upptäcktes mindre vattensalamander i alla dammar. Notera att inga fällor placerades ut vid D1 utan den inventerades enbart visuellt samt med eDNA.

Damm	D1		C		D2	
	Inventering	eDNA	Inventering	eDNA	Inventering	eDNA
Vanlig padda	X	X	X	X	X	X
Mindre vattensalamander		X	X	X	X	X

Tabell 4. Arternas förekomst över lokalerna i procent. Figuren visar arternas förekomst i eDNA-inventeringen över de olika lokalerna i procent.

Art	D1	C	D2
Vanlig padda	81,4	33,9	80,8
Mindre vattensalamander	18,6	66,1	19,2
SUMMA	100	100	100

3.2. Resultat från konventionella inventeringar

Visuellt eller audiellt observerade groddjur

Antalet observerade groddjur presenteras i Tabell 5. Karta med observationer finns i bilaga 7.

Tabell 5. Groddjur observerade visuellt och audiellt.

Datum	Vanlig padda	Mindre vattensalamander
2019-04-21	11	4
2019-04-23	3	4
2019-05-23	2	65
2019-05-24	2	(se tabell 3)
2019-06-14	1	10

Fällor

Vid sydvästra dammen (damm D2) samt norra dammen (damm C) användes 6 respektive 4 fällor under ett dygn. De placerades ut kvällen den 23/5 och vittjades påföljande kväll. Resultat av fångster visas i Tabell 6.

Tabell 6. Här redovisas resultat från Ortmanfällor. Mindre vattensalamander (*Lissotriton vulgaris*) förkortas L.v.

Fälla	Damm	Groddjur	Övrigt
1	D2	L.v. 3 hanar, 1 hona	Medelstor dykare
2	D2	L.v. 1 hane, 0 honor	Medelstor dykare
3	D2	-	1st Hästigel
4	D2	L.v. 1 hane, 2 honor	Hästigel 3st
5	D2	L.v. 4 hanar, 0 honor	-
6	D2	L.v. 5 hanar, 0 honor	En stor sländlarv av satt typ
7	C	-	-
8	C	-	Gulbrämad dykarbagge 5 st samt 3 st mellanstora dykarbaggar
9	C	-	Hästigel samt nattsländelarv
10	C	L.v. 1 hane, 0 honor	Gulbrämad dykare. Nattsländelarv. Stavlik vattenscorpion. Vattenbagge

3.3. eDNA kvalitet samt kvalitetskontroll

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

3.4. Diskussion och slutsatser

I båda inventeringsmetoderna (eDNA samt konventionella inventeringar) hittades arterna vanlig padda och mindre vattensalamander. Padda hittades med båda metoderna i samtliga dammar medan mindre vattensalamander hittades i två av tre dammar vid konventionell inventering och i samtliga tre dammar vid eDNA-inventering. Båda metoderna utfördes grundligt med två eDNA-samlingsprover per damm samt fem fältbesök med konventionell inventeringsmetodik. Det är därmed mycket osannolikt att ytterligare någon groddjursart använder någon av de undersökta dammarna som lekvatten. Resultaten visar också att eDNA är en tillförlitlig metod för inventering av groddjur eftersom båda arterna detekterades med eDNA i samtliga underprover som togs i de tre dammarna. Beroende på frågeställning kan konventionella inventeringar ge värdefull tilläggsinformation till eDNA-studier som observationer av aktiviteter såsom

spel eller lek eller att identifiera vandringsvägar mellan övervintringsplatser och lekvatten.

Vid den konventionella inventeringen hittades några vanliga paddor vid stråkinventeringen. Dessa fynd tyder på att en del av populationen av vanlig padda använder området söder om Kyrkhamnsvägen som sommaruppehållshabitat samt att övervintringshabitat finns där.

Det observerade antalet paddor i de konventionella inventeringarna var mycket lågt jämfört med antalet djur observerade vid ett besök som företogs våren 2017 i samband med att provtagning för gisselsvampen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) som orsakar svampsjukdomen chytridiomycosis företogs. Vid provtagningen 2017 påträffades Bd på paddor i området. Detta kan tyda på en reell populationsminskning och Bd kan vara orsaken. Det är för tidigt att dra slutsatser kring detta men om det är så är det den första dramatiska populationsminskningen orsakad av Bd som dokumenterats i Stockholm. Varken Bd eller Bs detekterades i eDNA-undersökningen 2019. Detta kan bero på att sjukdomen inte förekommer i de provtagna vattnen och att drabbade individer har dött men det skulle också kunna bero på vattenomsättningen då nytt vatten pumpas in från Mälaren. Den ovanligt varma sommaren 2018 kan också ha bidragit till både minskningarna av vanlig padda samt utslagning av Bd, då vissa stammar dör ut redan vid 28°C (Kilpatrick mfl 2010).

Inventeringarna av groddjur med eDNA samt traditionell metodik planerades baserat på den biotopinventering som utfördes i området i oktober 2018. Inventeringarna förlades framförallt till de potentiella lekvattnen men även till potentiella vandringsvägar mellan vinter- och sommarhabitat (som identifierades vid biotopinventeringen 2018) och dessa lekvatten. Områden som är direkt olämpliga för groddjur såsom hårdgjorda, hårt exploaterade och bebyggda ytor undersöktes inte. Mälaren som är en stor sjö med mycket fisk utgör inte en lämplig lekmiljö för groddjur och provtogs därför inte med eDNA. Eftersom strandzonen utanför de gamla deponierna samt småbåtshamnen inte befinner sig mellan lekvattnen och de potentiella övervintrings- och sommarhabitaten utgör den inte lekvandringväg och därför gjordes ingen stråkinventering efter groddjur där.

Sammantaget hittades ingen rödlistad eller sällsynt groddjursart vid inventeringarna. De två vanliga arter som förekommer här (mindre vattensalamander samt vanlig padda) är dock liksom alla andra Sveriges groddjur fridlysta, vilket innebär att de inte får dödas, fångas eller skadas. Till skillnad från den större vattensalamandern finns de inte i Habitatdirektivets bilaga 2 vilken innebär att även artens livsmiljö ska skyddas. Det finns alltså inget specifikt skydd för livsmiljöerna kopplat till just de groddjur som hittats i detta område. Småvatten som ligger i jordbrukslandskap omfattas av biotopskydd enligt miljöbalken. Damarna i detta område befinner sig på, eller i anslutning till annan mark såsom en golfbana och har anlagts för bevattningsändamål, varvid de inte omfattas av biotopskyddet för småvatten i jordbrukslandskap enligt Naturvårdsverkets vägledning för biotopen (Naturvårdsverket, 2014).

Delar av området ingår i en modellerad karta över habitatnätverk för groddjur (Mörtberg m.fl. 2006) vilken diskuteras mer ingående i biotopinventeringen (Wijkmark m.fl. 2018) och från området finns goda spridningsmöjligheter främst mot nordväst. Den större delen av stranden som omfattas av planerna är dock inte naturstrand utan domineras av en småbåtshamn samt en artificiell strandkant av stenblock där vattenvegetation. De största värdena för groddjur i Lövsta är de undersökta dammarna samt kringliggande vinter- och sommarhabitat vilka beskrivs i biotopinventeringen (Wijkmark m.fl. 2018). Dessa dammar saknas i kartan över habitatnätverket, vilket sannolikt beror på att kartan över habitatnätverket (Mörtberg m.fl. 2006) skapades innan dammsystemet i Lövsta var färdigställt då arbetet med dammarna pågick mellan 2002 och 2009. Dammarna utgör betydligt bättre reproduktionslokaler för groddjur än de bäckar som markerats som "potentiell reproduktionslokal" i kartan över habitatnätverk. Kvarnbäcken med dess omgivande fuktiga skogsmiljö (område 7 i biotopinventeringen av Wijkmark m.fl. 2008) söder om undersökningsområdet utgör dock ett lämpligt sommarhabitat och innehåller även lämpliga strukturer för övervintring. Den korta sträcka av en bäck som rinner ut genom en vägtrumma under Kyrkhamnsvägen och mynnar vid badplatsen väster om småbåtshamnen är av mindre värde då omgivningarna är torrare och öppnare utan omgivande fuktig mark. Även själva bäcken var torr vid biotopinventeringen. I likhet med den modellerade habitatnätverkskartan anser vi att det fortfarande är troligt att Lövstaområdet är en spridningsväg inom ett habitatnätverk för groddjur men baserat på våra undersökningar i området kan vi göra några tillägg och justeringar till den kartan: Dels saknas dammarna i den kartan (troligtvis p.g.a. att kartans ålder) och det är dessa som utgör goda reproduktionslokaler i området. Den lilla "potentiella reproduktionslokalen" som pekats ut i den modellerade kartan vid badplatsen baseras troligtvis på den bäck som ibland rinner ut där. Detta är ett litet och rinnande vatten som ibland torkar ut helt och utgör inte en lämplig reproduktionslokal för groddjur. Mot bakgrund av dammarna som inte finns med i den modellerade kartan samt att stranden är kraftigt exploaterad kan de norra delarna av undersökningsområdet vara bättre ur spridningssynpunkt än vad den modellerade kartan anger samtidigt som strandlinjen troligtvis är sämre än vad som anges, även om denna inte utgör en barriär.

De viktigaste habitaterna för groddjur i området ligger utanför planområdet och utgörs av de undersökta dammarna (reproduktionslokaler) samt skogsområdena strax utanför planområdet. Ett undantag är område 4 i biotopinventeringen (Wijkmark m.fl. 2018) vilket kan ha viss betydelse som sommar- och övervintringshabitat. Enligt planskisserna kommer dock större delen av skogen inom område 4 att bevaras. Planområdet utgörs till allra största delen av olämpligt habitat för groddjur såsom hårdgjord mark, kajer, konstgjord strandlinje av sprängsten utan vattenvegetation, vägar, bebyggelse och torr gräsmark. Vår bedömning är att de allra flesta av groddjuren finns sig i de mer gynnsamma områdena utanför planområdet och därför inte riskerar att dödas under det planerade arbetet. Det går inte att helt och hållet säkerställa att ingen individ befinner sig inom planområdet även om det inte utgör ett lämpligt habitat. Vår bedömning är dock att om någon eller några individer skulle dö till följd av arbete inom planområdet så är det rimligtvis så få att de utgör en försumbar del av population. Det förutsätter dock att vandring (t.ex. lekvandring) mellan skogsområdena och lekvattnen inte sker genom

området där arbetet utförs eller på vägar som är kraftigt trafikerade under lekvandringen. Vid lekvandringen kan en stor del av en groddjurspopulation vara i rörelse samtidigt. Denna risk kan undvikas med åtgärder som leder groddjuren kring arbetsområdet och hindrar dem från att vandra över trafikerade vägar, genom att istället leda dem utmed vägarna till särskilda grodtunnlar under vägbanan. Detta är en effektiv åtgärd för att minska antalet groddjur som dör under vandringen mellan övervintringsplatser och lekvatten. För detta finns både tillfälliga och permanenta lösningar. Lämpliga grodtunnlar och barriärer beskrivs i flera publikationer (t.ex. Trafikverket, 2016 och Banverket och Trafikverket, 2005). Störst sannolikhet för stora vandringar av groddjur är under vårnätter vid fuktigt väder. Det är därför också lämpligt att undvika transporter eller arbete som sammanfaller med groddjurens vandringsstråk vid sådana tillfällen, i synnerhet om inte tillförlitliga skyddsåtgärder vidtagits för att styra om groddjurens vandring från vägar och andra riskområden.

I övrigt bör hänsyn tas till groddjurens lekvatten och övriga habitat såsom övervintringsplatser. Dammarna bör underhållas genom att växtlighet röjs vid behov så att dammarna inte växer igen eller skuggas för mycket men eftersom vattenvegetation samtidigt är viktig för arterna bör inte all vegetation tas bort när röjningen utförs.

REFERENSER

Banverket och Trafikverket. 2005. Vilda djur och infrastruktur – en handbok för åtgärder. Banverket miljösektionen rapport 2005:5. Vägverket publikation 2005:72.

Bohmann, K., A. Evans, M. T. P. Gilbert, G. R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, D. W. Yu, och M. de Bruyn. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 29:358 – 367.

Deiner, K., H. M. Bik, E. Mächler, M. Seymour, A. Lacoursière-Roussel, F. Altermatt, S. Creer, I. Bista, D. M. Lodge, N. de Vere, M. E. Pfrender, och L. Bernatchez. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26:5872-5895.

Kilpatrick, A.M., Briggs, C.J. and Daszak, P., 2010. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(2), pp.109-118.

Leese, F., Altermatt, F., **Hellström M.**,+ 103 authors & Stenke, D (2016). DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Research Ideas and Outcomes* (Rio), 2, e11321.

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ... & Kondoh, M. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088.

Mörtberg, U., Zetterberg, A. och Gontier, M. 2006. Landskapsekologisk analys för miljöbedömning: Metodutveckling med groddjur som exempel. Miljöförvaltningen, Stockholms stad. Dnr: 2008-011175-216.

Naturvårdsverket. 2014. Småvatten och våtmark i jordbruksmark. Beskrivning och vägledning för biotopen Småvatten och våtmark i jordbruksmark i bilaga 1 till förordningen (1998:1252) om områdes-skydd enligt miljöbalken m.m. 2014-04-15.

Olds, B. P., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Li, Y., Evans, N. T., Turner, C. R., ... Shirey, P. D. (2016). Estimating species richness using environmental DNA. *Ecology and Evolution*, 6, 4214–4226.

Pedersen, M. W., S. Overballe-Petersen, L. Ermini, C. D. Sarkissian, J. Haile, M. **Hellstrom**, **J. Spens**, m.fl. 2015. Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 370:20130383

Spens, J., A. R. Evans, D. Halfmaerten, S. W. Knudsen, M. E. Sengupta, S. S. T. Mak, E. E. Sigsgaard, och **M. Hellström**. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution* , 8(5), 635-645

Inventering av groddjur i tre dammar i Lövsta med eDNA samt konventionell metodik

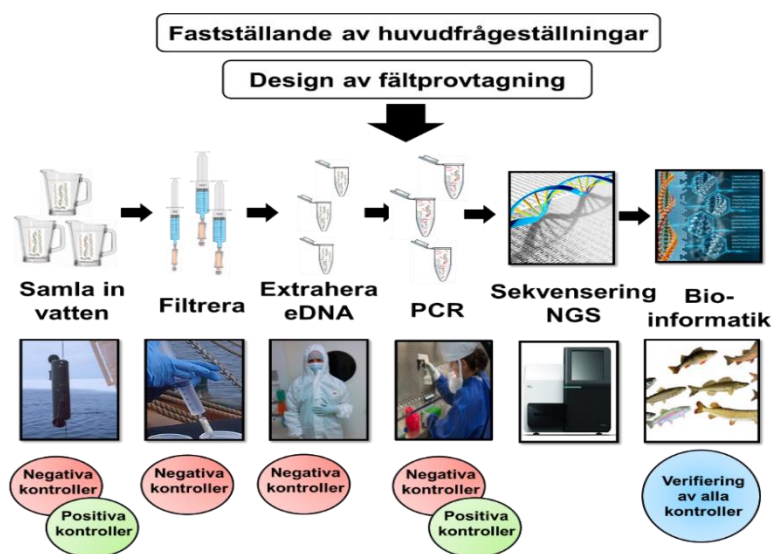
Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793

Trafikverket. 2016. Natur Groddjur TEMABLAD SKAPA, Beställningsnummer 100837, Utgåva 2.

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

BILAGA 1: Laboratoriearbete

B1.1 Extraktion, PCR och sekvensering



Figur B1. Flödesschema som visar de olika stegen för eDNA undersökningar. (Figur: Micaela Hellström)

Flödesschemat i figur B1 beskriver eDNA-processen från insamling till analys. eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Detta kunde ske genom ett exklusivt samarbete med MoRe Research i Örnsköldsvik. Extraktionerna utfördes av molekylärbiologiska tekniker som är tränade i att extrahera eDNA. Proverna analyserades med flerartsanalyser för förekomst av fisk (bilaga 2) samt andra vertebrater. Varje PCR prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs under bioinformatiken. En modifierade markörer som amplifierar 12S rDNA regionen användes (KMiyä m.fl 2015) . Principerna för metabarkodning förklaras mer utförligt i bilaga 1. Vidare användes en positiv DNA kontroll med känd artsammansättning som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyserades för att säkerhetsställa kvalitetskrav (bilaga 2).

B 1.2. Bioinformatik och verifiering

Varje enskild art har en unik streckkod eller sekvens. Varje unik sekvens fick en molekylär identitet. De olika sekvenserna kördes mot en internationell databas (tillgänglig för allmänheten, som grundar sig på GenBank och upprätthålls av National Center for Biotechnology Information, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) där sekvenser på mer än 370 000 kända arter finns tillgängliga (Benson m.fl. 2017) med 0,6 miljarder sekvenser och 2,6 biljoner baspar enligt NCBI:s hemsida. De olika sekvenserna matchades mot databasen och fick på så sätt fisk, däggdjurs och groddjurs identitet. Tack vare nya framsteg inom metabarkodning är det möjligt att få information på artnivå istället för enbart familje- eller genus- nivå. Antalet läsningar per art gav en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekom i ett prov

Bilaga 2. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar

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

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

Enartsstudier qPCR eller ddPCR levereras ej i detta projekt

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

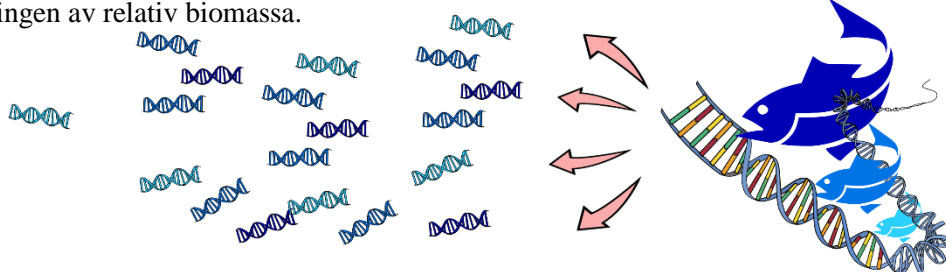
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundanser mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Som exempel kan nämnas att 1000 DNA kopior av gädda inte motsvarar 1000 kopior av abborre och analyserna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

Flerartsstudier –Metastreckkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

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

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

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



Bilaga 3. Kvalitetssäkring av eDNA

Därför är kontrollprover nödvändiga vid eDNA-provtagning

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

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

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

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

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

Positiv kontroll; En positiv kontroll innebär att ett prov som innehåller ett känt DNA testas för att verifiera att den använda metodiken fungerar som den skall. Om DNA-signaler inte hittas i en positiv kontroll innebär det att metodiken måste justeras och analysen eller undersökningen måste göras om.

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

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

Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser

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



Referenser:

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

Bilaga 5: Resultat av kvalitetskontroller

Bakgrunden till kvalitetskontrollerna anges i Bilaga 4. Värden för kontrollerna anges i tabell B5_1. DNA var rent och visade hög kvalitet. Alla negativa kontroller var negativa för målarter. De positiva kontrollerna var positiva. Kontaminant-DNA tillhörande hund och människa som är vanliga i reagenser och vattnet runtomkring oss togs automatiskt bort från analysen.

Resultaten av MiSeq parvis sekvensering för 12S (230 baspar) som detekterar groddjur och fisk, inkluderade i denna rapport 1 103 080 sekvenser som godkändes genom alla kvalitetsfilter. Av dessa var mindre än 0,001% kontamineringar så som människa och hund. Dessa läsningar inkluderade en separat fiskundersökning från Lövsta småbåtshamn. För dammarna matchade totalt 218 826 sekvenser målarterna groddjur. Detta är en indikation på hög kvalitet på eDNA och slutgiltigt data. Sekvenseringsdata för markörerna analyserades genom en pipeline som är specialdesignad av NatureMetrics Ltd. Datat testades mot både NCBI och NatureMetrics kurerade referensdatabaser.

Tabell B5-1. Kvalitetsgranskning av eDNA och kontroller. eDNA koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR. Band på gel av målarter efter PCR visar att provanalyserna har fungerat. PCR negativ innefattar 12 replikat. Filtrerad volym vatten anges i liter, eDNA koncentration ng/μl, inhibering samt anti-inhibering, band gel PCR anger om målarterna visade band på gel för närvaro före sekvenseringen. Kont% anger % av sekvenser från hund och människa som togs bort som naturlig kontaminering. Alla negativa kontroller var negativa.

Provlokal	Damm- område	H2O V (L)	eDNA (ng/μL)	Inhibering	Anti- inhibition	Band Gel PCR	# PCR	kont%	Målart kont% Miya
LG_01_A	D1	4	>17	Ja	Ja	Ja	12	<0,001	0
LG_01_B	D1	4	>17	Ja	Ja	Ja	12	<0,001	0
LG_02_A	C	2,4	>17	Ja	Ja	Ja	12	<0,001	0
LG_02_B	C	2,4	>17	Ja	Ja	Ja	12	<0,001	0
LG_03_A	D2	3,5	>17	Ja	Ja	Ja	12	<0,001	0
LG_03_B	D2	3	>17	Ja	Ja	Ja	12	<0,001	0
Lab neg			0,17	Nej	Nej	Nej	12	<0,001	0
Fält neg		5	0	Nej	Nej	Nej	12	<0,001	0

Bilaga 6: Antalet läsningar av artsekvenser

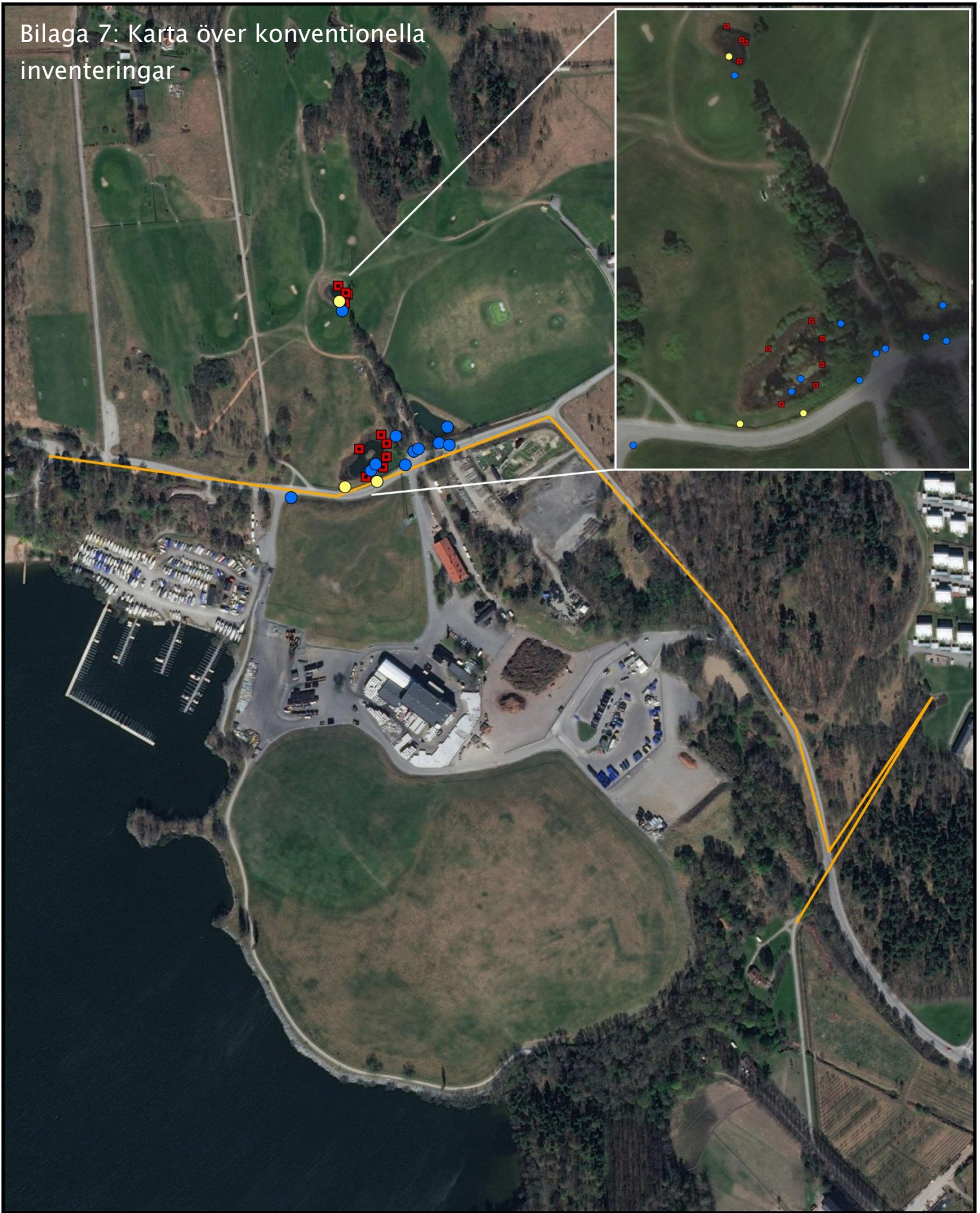
Tabell B6_1. Antal läsningar av arternas sekvenser. Målarternas sekvenser påträffades inte i det negativa fältprovet (LG_NEG) vilket innebär att ingen kontaminering detekterades.

Art	Damm 1	Damm 2	Damm 3	LG_NEG
Vanlig padda	63 954	20 253	64 973	
Mindre vattensalamander	14 658	39 568	15 420	
Totala läsningar	78 612	59 821	80 393	

Tabell B6_2. Antal läsningar av arternas sekvenser, icke-poolade prover. Målarternas sekvenser påträffades inte i det negativa fältprovet (LG_NEG) vilket innebär att ingen kontaminering detekterades.

Art	LG_01_A	LG_01_B	LG_02_A	LG_02_B	LG_03_A	LG_03_B	LG_NEG
Vanlig padda	29 169	34 785	8715	11 538	22 511	42 462	
Mindre vattensalamander	4218	10 440	3747	35 821	5100	10 320	
Totala läsningar	33 387	45 225	12 462	47 359	27 611	52 782	

Bilaga 7: Karta över konventionella inventeringar



Groddjursregistrering

- Mindre vattensalamander
- Vanlig padda
- Fällor
- Inventeringssträcka

Datum kartproduktion: 2019-05-31
Koordinatsystem: SWEREF99 18 00
Copyright bakgrundskarta: World Imagery: Source: Esri, DigitalGlobe, GeoEye, Earthstar Geographics,

0 0.04 0.09 0.18 Km



 CALLUNA

g av groddjur i tre dammar i Lövsta med eDNA samt konventionell metodik

www.aquabiota.se