

# eDNA-inventering

## AV STORMUSSLA och FISK I STRÖMSBÄCKEN I LILLA EDETS KOMMUN



**EDNASOLUTIONS**

**waterCIRCLE**

*Dokumenttitel: eDNA-inventering av stormusslor och fisk i Strömsbäcken*

*eDNA solutions AB*

*Postadress: Kärrbogata 22,*

*441 96 Alingsås, SE*

*Tel: +46 702 11 52 91*

*www.ednasolutions.se*

*WaterCircle*

*Postadress: Kärrbogata 22,*

*441 96 Alingsås, SE*

*E-post: [info@watercircle.info](mailto:info@watercircle.info)*

*Beställare: WSP AB*

*Författare: Alexander Eiler ([alex@ednasolutons.se](mailto:alex@ednasolutons.se)), Omneya Osman*

*([omneya@ednasolutions.se](mailto:omneya@ednasolutions.se)) Johan Andersson ([info@watercircle.se](mailto:info@watercircle.se))*

*Foto framsida: Strömsbäcken (Lokal 5)*

*Rapportnummer: eDNA solutions Rapport 2022:01*

*Dokumentdatum: 2022-09-15*

*Kartmaterial hämtat från VISS.*

## Innehåll

SAMMANFATTNING .....	2
1. INLEDNING .....	3
2. MATERIAL OCH METOD .....	3
2.1 Fältarbete .....	3
2.2 Laboratoriearbete .....	4
2.2.1 eDNA kvalitet samt kvalitetskontroll .....	4
2.2.2 DNA extraktion och kvantitativ PCR detektion .....	4
2.2.3 Fisk metabarkodning .....	5
2.2.4 Stormusslor metabarkodning .....	5
2.2.5 Sekvensdataanalys .....	6
2.2.6 Intern PCR kontroll.....	6
3. RESULTAT OCH SLUTSATS .....	6
3.2 Förekomst av fiskar .....	7
3.3 PCR amplifikation och inhibition .....	7
Referenser .....	9

## SAMMANFATTNING

Akvatiskt miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) har under det senaste decenniet visat sig vara ett lovande verktyg för miljöövervakning av vattenorganismer. Undersökningsmetoden baserar sig på det faktum att alla levande organismer, både växter och djur, kontinuerligt avger genetiska avtryck i miljön i form av slem, avföring, svett och döda celler. Dessa genetiska spår kallas eDNA. eDNA kan utvinnas ur ett vattenprov 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 ger analyserna en bild av artförekomst i nutid.

I juli och september 2022 utförde eDNA solutions AB och WaterCircle på uppdrag av WSP AB en eDNA inventering av stormusslor Strömsbäcken, Lilla Edets kommun.

eDNA från spetsig målarmussla (*Unio tumidus*) detekterades i två provlokaler i området. I 4 av dessa provlokaler detekterades DNA från flera fiskarter. Exempel av fiskarter är elritsa (*Phoxinus phoxinus*), öring (*Salmo trutta*), Bäcknejonöga (*Lampetra planeri*), mört (*Rutilus rutilus*), stäm (*Leuciscus leuciscus*), gädda (*Esox lucius*), abborre (*Perca fluviatilis*), småspigg (*Pungitius pungitius*), gärs (*Gymnocephalus cernua*), björkna (*Blicca bjoerkna*), ål (*Anguilla anguilla*), löja (*Alburnus alburnus*), braxen (*Abramis brama*) och stensimpa (*Cottus gobio*).

## 1. INLEDNING

I juli och september 2022 utförde WaterCircle Göteborg AB och eDNA solutions AB på uppdrag av WSP AB en eDNA inventering av stormusslor och fisk i flera provlokaler i Strömsbäcken. Sammantaget togs prov från 5 lokaler vid två olika tillfällen. eDNA från stormusslor och fisk detekterades med kvantitativ PCR och med metabarkoding. Undersökningsmetoden miljö-DNA eller eDNA (environmental DNA) baserar sig på det faktum att alla levande organismer som till exempel växter och djur kontinuerligt avger genetiska fotavtryck i miljön i form av slem, avföring, svett och döda celler (Taberlet & Bouvet 1992, Goldberg m.fl. 2011). 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 i stor utsträckning är kortlivat ger analyserna en bild av artförekomst i nutid. eDNA har visat sig ha en stor potential som verktyg för inventering av vattenlevande organismer (Giovannoni m.fl. 1990, Eiler m.fl. 2004, Bohman m.fl. 2014, Eiler m.fl. 2018).

## 2. MATERIAL OCH METOD

### 2.1 Fältarbete

Fältarbetet utfördes 9:e Juni och 22:a september 2022. Provtagningspunkter anges i figur 1 och tabell 1. För provtagningen i fält användes sterila sprutor (50 ml) och filter (sterivex filter 0.45 µm). Vatten filtrerades genom att fylla sprutorna och trycka vatten genom filtret tills motståndet från det igensatta filtret blev för stort, då avbröts filtreringen för att inte riskera att förstöra filtret. Mellan 55 och 470 ml vatten filtrerades genom varje filter (Tabell 1). Två prover (filter) togs från varje lokal, vilket resulterade i totalt 20 prover där partiklar på filtret är utgångspunkten för analysen. Prov lagrades omedelbart i flyttande kväve. Negativa fältkontroller utgjordes av prov från avjoniserad vatten för att utesluta kontaminering av DNA mellan provtagningar.

*Tabell 1. Visar provlokaler, vattendrag samt vilken vattenmängd som filtrerats. Alla prover utom prov 1 på lokal 1, den 22 september, har tagits med spruta.*

Lokal	Tidpunkt	Volym filtrerat vatten	Temperatur
1	9:e Juni	prov 1: 470ml, prov 2: 470 ml	16,4
2	9:e Juni	Prov 1: 270ml, prov 2: 270ml	13,8
3	9:e Juni	Prov 1: 105ml, prov 2: 105ml	14,1
4	9:e Juni	Prov 1: 55ml	14,2
5	9:e Juni	Prov 1: 205ml, prov 2: 205ml	16,1
1	22:a September	Prov 1: 600ml, prov 2: 600ml	13,8
2	22:a September	Prov 1: 180ml, prov 2: 180ml	10,6
3	22:a September	Prov 1: 60ml, prov 2: 60ml	8,3
4	22:a September	Prov 1: 190ml, prov 2: 190ml	9,2
5	22:a September	Prov 1: 600ml, prov 2: 600ml	13,9



Figur 1. Karta över provpunkterna i Strömsbäcken.

Även swipes från flodpärlmussla togs som positiva kontroller och analyser av en spändingsserie genomfördes för att testa sensitiviteten och det dynamiska området för analysen. För att testa specificiteten hos analysmetoden gjordes jämförande analyser av swipes från Äkta Målarmussla (*Unio pictorum*) och Flodpärlmussla (*Margaritifera margaritifera*). Dessa prover togs från Sportfiskarnas odling av musslor i Göteborg. Positiva kontroller för metabarkodning av fisk inkluderade 10 fiskarter som köptes på diverse fiskmarknader i Göteborgsområdet.

## 2.2 Laborariearbete

### 2.2.1 eDNA kvalitet samt kvalitetskontroll

Kvalitetskontrollerna samt mängden filtrerat vatten anges i Tabell 1 och följer direktiven i Sveriges lantbruksuniversitets kunskapssammanställning av eDNA analyser (Bohman 2018). DNA var rent och visade hög kvalitet. Alla negativa kontroller var negativa. De positiva kontrollerna var positiva.

### 2.2.2 DNA extraktion och kvantitativ PCR detektion

eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Qiagen (DNeasy PowerWater Sterivex Kit) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Fyra swipes från musslor (2 från Flodpärlmussla och 2 från Äkta Målarmussla) extraherades enligt protokoll från Qiagen (DNeasy Blood and Tissue kit). Extraktionerna utfördes av en erfaren molekylärbiolog. Proverna analyserades sedan med en kvantitativ PCR analys.

Två PCR-protokoll från litteraturen användes för Flodpärlmussla [1], [2]. Dessa baseras på artspecifika primers för flodpärlmussla som riktar sig mot en liten region av mitokondriellt DNA (mtDNA) som cytokrom oxidas 1 (främre-primer: 5'- TTG TTG ATT CGT GCT GAG TTA GG-3' och bakre-primer: 5'- GCA TGA GCC GTA ACA ATA ACA TTG-3') eller 16S (främre-primer: 5'- GCA ACA CGG AAA ACC CCT G -3', och bakre-primer: 5'- GGC TGC GCT CAT GTG AAT TA -3'). För bedömning av användbarheten testades qPCR protokollen med positiva kontroller som representerade DNA från swabber av flodpärlmussla och negativa kontroller som representerade DNA från äkta målarmussla. DNA från flodpärlmussla späddes också till en

fyrfaldig utspädningsserie. Baserat på utfallet av utvärderingsexperimenten (dvs linjäritet hos standardserien, homogenitet av smältkurvor och detektionsgräns) var det slutliga qPCR-protokollet följande:

Varje PCR-reaktionsblandning (20 µl) innehöll 3 µl av DNA-lösning med 250 nM 16S främre- och bakre primers i en 1 × PCR-mastermix (Quant-IT-picogreen-dsDNA-kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). PCR-reaktioner utfördes under termiska cykler om 30s vid 95 °C och 40 cykler om 5s vid 95°C och 30s vid 60 °C på en CFX Anslut realtidssystem (Bio-Rad).

För varje prov utfördes i 2 replikata PCR analyser tillsammans med en standardserie av den positiva kontrollen (DNA från Flodpärlmussla). Flera negativa kontroller användes som fältprovtagningkontroller och tekniska kontroller för det molekylära arbetet vid analyserna i laboratoriet. PCR protokollet följer beskrivningen i Eiler m.fl. [3].

### 2.2.3 Fisk metabarkodning

Inför biblioteksberedningen gjordes både arbetsyta och utrustning rena enligt ovan. Det första PCR-experimentet utfördes i ett pre-PCR-laboratorium medan det andra PCR- experimentet och reningar utfördes i en post-PCR-miljö för att skydda mot kontaminering.

Vi använde också kontroller för att övervaka kontaminering, inklusive PCR-blanks för varje experiment. Ett "skensamhälle" av 10 fiskarter framställdes, inklusive *Clupea harengus*, *Gadus macrocephalus*, *Glyptocephalus cynoglossus*, *Melanogammus aeglefinus*, *Pleuronectes platessa*, *Polachius virens*, *Reinhardtius hippoglossides*, *Salmo salar*, *Scomber scombrus* and *Thunus alunga*.

Protokollet som användes för metabarkodning-analysen kallas MiFish[4]. Denna baseras på primrar som är specifika för fisk och amplifierar en hypervariabel region av 12S rRNA-genen (163–185 bp lång) som är en del av mitokondrie-genomet (mtDNA). Regionen innehåller i de flesta fall tillräcklig information för att identifiera fiskar till artnivå. För detaljerad protokoll följer länken till [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.b4awgsfe](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.b4awgsfe)

### 2.2.4 Stormusslor metabarkodning

Protokollet som användes för metabarkodning-analysen är adapterad från [5]. Denna baseras på Unio-Meta primrar ([awggwagacgaaaagacccgcg](#) og [aagccaacatcgaggctcgcaaac](#)) som är specifika för stormusslor och amplifiera en hypervariabel region av 16S rRNA-genen (ca. 240 bp) som är en del av mitokondrie-genomet (mtDNA). Regionen innehåller i de flesta fall tillräcklig information för att identifiera stormusslor till artnivå. För detaljerad protokoll följer länken till

Ett "skensamhälle" av 2 musselarter framställdes, inklusive *Unio pictorum* och *Margaritifera margaritifera*. Eftersom *M. margaritifera* DNA inte amplifieras med Unio-Meta primrar utfördes en specifik qPCR assay (se ovan).

### 2.2.5 Sekvensdataanalys

Råsekvenser bearbetades först med cutadapt v1.18 [6] för att ta bort PCR-primrar och analyserades sedan med R-paketet dada2 v1.14.1 [7] för "denoising" och sekvenspar hopsättning. Efter manuell inspektion av plotter av kvalitetspoäng, avläsningar framåt och bakåt av ampliconen sekvenseringskörningen trimmades till 120 och 100 bp längd för musslor och fisk. Ytterligare kvalitetsfiltrering tog bort eventuella sekvenser med otilldelade baspar och läsningar med en enda Phred-poäng under 10. Efter läsningar skapades framåt- och bakåtfelsmodeller i dada2 med en delmängd av sekvenser ( $10^8$  nukleotider). Fisk- och mussla-genampliconer sattes samman genom sammanslagning de lästa paren. Chimärer togs bort med removeBimeraDenovo från dada2-paketet, vilket resulterade i den slutliga ampliconsekvensvarianttabellen. Taxonomi (till artnivå) tilldelas med blastn och en intern 12S rRNA-gendatabas för fisk och NCBI för stormusslor (16S rRNA gendatabas). Slutligen kördes en Lowest Common Ancestor Analys (LCA) [8] innan sekvenser tilldelades specifika arter (specifika kommandon: -b 8 -id 99 -cov 80 -t only\_lca).

### 2.2.6 Intern PCR kontroll

För att bestämma DNA-extraktionseffektiviteten och förekomsten av inhibitorer tillhandahölls en separat intern extraktionskontroll-DNA, primers och sondblandning med olika målregioner, IPC. DNA spädades med den interna kontrollen till 1:20 och 1  $\mu$ L sattes till en subprov av varje prov, före qPCR. Den interna kontrollen detekteras genom VIC-fluoroforkanalen. Vi antog en extraktionseffektivitet på 100 % om Cq-värdet på 29 observerades med Cq-värden på  $29 \pm 2$  inom det normala intervallet. Prover med Cq-värden på 31 eller högre kan anses ha PCR-hämmare.

## 3. RESULTAT OCH SLUTSATS

### 3.1 Förekomst av musslor

eDNA från flodpärlmussla detekterades inte på någon av de provtagna lokalerna ( $n = 5$ ), varken i juli eller september. Spetsig målarmussla (*Unio tumidus*) detekterades i provlokal 5 i juli (Tabell 2).

Tabell 2. Musslaarter som detekterades i DNA provqerna

Lokal	Tidpunkt	Mussla arter
1	9:e Juni	Ingen detekterad
2	9:e Juni	Ingen detekterad
3	9:e Juni	Ingen detekterad
4	9:e Juni	Ingen detekterad
5	9:e Juni	Spetsig målarmussla ( <i>Unio tumidus</i> )
1	22:a September	Ingen detekterad
2	22:a September	Ingen detekterad
3	22:a September	Ingen detekterad
4	22:a September	Spetsig målarmussla ( <i>Unio tumidus</i> )
5	22:a September	Ingen detekterad



### 3.2 Förekomst av fiskar

Fisk DNA detekterades i fyra av fem lokaler. Fiskarter är: elritsa (*Phoxinus phoxinus*), öring (*Salmo trutta*), Bäcknejonöga (*Lampetra planeri*), mört (*Rutilus rutilus*), stäm (*Leuciscus leuciscus*), gädda (*Esox lucius*), abborre (*Perca fluviatilis*), småspigg (*Pungitius pungitius*), gärs (*Gymnocephalus cernua*), björkna (*Blicca bjoerkna*), ål (*Anguilla anguilla*), löja (*Alburnus alburnus*), braxen (*Abramis brama*) och stensimpa (*Cottus gobio*). En detaljerad artlista per provtagningslokal finns i Tabell 3.

Tabell 3. Fiskarter som detekterades i DNA provqerna

Lokal	Tidspunkt	Fiskarter
1	9:e Juni	<i>Phoxinus phoxinus</i> , <i>Salmo trutta</i> , <i>Lampetra planeri</i> , <i>Cottus gobio</i>
2	9:e Juni	Ingen detekterad
3	9:e Juni	<i>Phoxinus phoxinus</i> , <i>Salmo trutta</i> , <i>Lampetra planeri</i>
4	9:e Juni	<i>Phoxinus phoxinus</i> , <i>Salmo trutta</i> , <i>Lampetra planeri</i>
5	9:e Juni	<i>Phoxinus phoxinus</i> , <i>Salmo trutta</i> , <i>Lampetra planeri</i> , <i>Rutilus rutilus</i> , <i>Leuciscus leuciscus</i> , <i>Gymnocephalus cernua</i> , <i>Blicca bjoerkna</i> , <i>Anguilla anguilla</i> , <i>Alburnus alburnus</i> , <i>Abramis brama</i>
1	22:a September	<i>Phoxinus phoxinus</i> , <i>Salmo trutta</i> , <i>Anguilla anguilla</i> , <i>Pungitius_pungitius</i> , <i>Rutilus rutilus</i> , <i>Perca fluviatilis</i>
2	22:a September	Ingen detekterad
3	22:a September	<i>Pungitius_pungitius</i>
4	22:a September	<i>Anguilla anguilla</i> , <i>Abramis brama</i> , <i>Esox lucius</i> , <i>Leuciscus leuciscus</i> , <i>Pungitius pungitius</i> , <i>Perca fluviatilis</i>
5	22:a September	<i>Phoxinus phoxinus</i> , <i>Salmo trutta</i> , <i>Anguilla anguilla</i>

### 3.3 PCR amplifikation och inhibition

Cq värden av interna PCR kontrollen indikerade ingen inhibering av PCR i alla fem prover i Juni; men i September var de 2 prover. Dessa behövdes förtunna 10 gånger för att PCR amplifikationen skulle fungera (Tabell 4).

Tabell 4. Cq värden av den interna PCR kontrollen (IPC) och amplifikations score. Cq värden och amplifikations scoren är lik kontrollen (Cq = 29.08 och Amp\_score = 0.91).

Lokal	Tidspunkt	Cq	Cq conf	Amp_score
1	9:e Juni	29.16	0.91	0.95
2	9:e Juni	29.11	0.89	0.94
3	9:e Juni	29.38	0.91	0.93
4	9:e Juni	29.29	0.96	0.92
5	9:e Juni	29.18	0.95	0.91
1	22:a September	Undetermined	0	0
2	22:a September	28.27	0.93	1.02
3	22:a September	28.34	0.95	1.02
4	22:a September	28.34	0.95	1.02

5	22-a September	Undetermined	0

## SLUTSATSER

I nedre delen av Strömsbäcken kunde vi med hjälp av eDNA verifiera att de finns ett flertal fiskarter. Även DNA från spetsig målarmussla kunde detekteras i två provlokaler i nedre delen av Strömsbäcken. De tyder på att Strömsbäcken är en viktig biotop för fisk och även för spetsig målarmussla.

## Referenser

- Bohmann, K., A. Evans, M. T. P. Gilbert, G. R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, D. W. Yu, M. de Bruyn. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 29:358–367.
- Bohman, K. 2018. eDNA i en droppe vatten Vattenprovtagning av DNA från fisk, kräftor och musslor – en kunskapssammanställning. *Aqua Reports* 2018:18.
- Eiler, A., S. Bertilsson. 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish Lakes. *Environmental Microbiology* 6:1228–1243.
- Eiler, A., A. Löfgren, O. Hjerne, S. Nordén, P. Saetre. 2018. Environmental DNA (eDNA) detects the pool frog (*Pelophylax lessonae*) at times when traditional monitoring methods are insensitive. *Scientific Reports* 8:5452.
- Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer, K. C. Field. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345:60–63.
- Goldberg, C. S., D. S. Pilliod, R. S. Arkle, L. P. Waits. 2011. Molecular Detection of Vertebrates in Stream Water: A Demonstration Using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. *PLoS ONE* 6: e22746.
- Taberlet, P., J. Bouvet. 1992. Bear conservation genetics. *Nature* 358:197.
- Taberlet, P., E. Coissac, M. Hajibabaei, L. H. Rieseberg. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21:1789-1793.

**water**CIRCLE

**EDNA**SOLUTIONS