

Delrapport 6
eDNA – utvärdering av 2022 års
provtagning

Svensk-norsk handlingsplan
för sötvattenkräftor

SVENSK-NORSK
innsats for
edelkreps/flodkräftor 



Statsforvalteren i Oslo og Viken



Länsstyrelsen
Värmland



Vannområde Glomma
Grensevassdragene



Aurskog-Høland
kommune

Havs
och Vatten
myndigheten



Statsforvalteren i Innlandet



Utmarksavdelingen
Akershus og Østfold

Interreg
Sverige-Norge

Europeiska regionala utvecklingsfonden



EUROPEISKA UNIONEN

Om projektet

Detta är en delrapport inom projektet Svensk-norsk handlingsplan för sötvattenkräftor. Länsstyrelsen Värmland tillsammans med Statsforvalteren i Oslo og Viken står bakom projektet som projektledare. Ytterligare projektdeltagare: Vannområde Glomma Grensevassdragene, Aurskog – Høland kommune, Statsforvalteren i Innlandet och Utmarksavdelningen Akershus og Østfold

Medfinansiering av Havs- och vattenmyndigheten, Miljødirektoratet och Europeiska regionala utvecklingsfonden. Projektet är ett Interreg Sverige-Norge projekt.

Författare:

Jeanette Karlsson

Innehåll

1	Bakgrund	4
1.1	Metodik vid eDNA filtrering.....	4
2	Resultat	6
2.1	Vad har analyserats.....	6
2.2	Träffsäkerhet	7
2.2.1	Billan.....	10
2.2.2	Buåa/Högsäterälven.....	11
2.2.3	Järnsjöns system.....	12
2.2.4	Stor Treens system	13
2.2.5	Stora Börs system	14
2.2.6	Övriga	14
2.2.7	Övrigt material	15
3	Diskussion	17
4	Referenser	19

1 Bakgrund

Alla organismer släpper ifrån sig DNA material till miljön i sin närhet, detta material kan bestå av olika sort, till exempel kan fiskar släppa fekalier och kräftor kan släppa material från sitt hölje (Bohman, 2018). Detta material går att analysera och det går från detta att se vilka arter som finns i området. Olika arter släpper ifrån sig olika mängder DNA till sin omgivning. Fiskar är till exempel relativt lätta att hitta via spår av DNA i vattnet medan musslor och kräftor släpper ifrån sig en mindre mängd och därför är mer svårupptäckta (Bohman, 2018). Då kräftorna släpper ifrån sig en mindre mängd DNA, speciellt om det är låga tätheter och låg aktivitet, kan detta leda till färre träffar vid eDNA- provtagning jämfört med fisk.

Metoden uppkom på 80-talet och användes först för att analysera mikroorganismer för att under åren utvecklas till att analysera större organismer (Bohman, 2018). Metoden utvecklas hela tiden och är idag ett verktyg och komplement till miljöövervakning.

Provtagning av eDNA gör det möjligt att söka efter specifika arter i en sjö eller vattendrag och för invasiva arter utgör det ett viktigt verktyg som kan spåra nya arter tidigt (Bohman & Edsman 2013). En tidig upptäckt av invasiva arter såsom signalkräfta kan möjliggöra att åtgärder sätts in i ett tidigt skede i etableringen, vilket kan lindra störningar i vattnets ekologi och även minska ekonomiska förluster. Att upptäcka DNA från signalkräfta vid eDNA-provtagning kan dock vara svårt beroende på bland annat täthet och aktivitet hos kräftorna, därför kan det vara fördelaktigt att även kräftpest analyseras via proverna. Signalkräftan är ofta bärare av kräftpest (*Aphanomyces astaci*) och det behövs mycket små mängder av kräftpest för att upptäcka den i provtagningen. Flest kräftpestsporer finns i vattnet under de varmare månaderna och möjligheten att upptäcka dem är större i strömmande vatten än i sjöar (Bohman 2018; Strand et al. 2014; Witter 2017).

1.1 Metodik vid eDNA filtrering

Under 2022 har Länsstyrelsen Värmland utfört eDNA-provtagning i Värmlands län. Pumpen som använts för eDNA-filtrering var en ryggsäckspump utan stav och flödes hastigheten som ställdes in på pumpen var 1 liter/minut. Porstorleken på de filter som använts var 2µm.

Vid filtrering för eDNA filtreras fem liter vatten genom filter, och två filter ska användas vid varje lokal. Om vattnet är mycket grumligt kan filtret sättas igen tidigare än fem liter vilket kan leda till att en mindre mängd vatten kan filtreras. Om detta sker och mindre än tre liter vatten kan filtreras ska ytterligare en filtrering genomföras.

Platsen för eDNA-provtagning bestäms utifrån var det bedöms finnas kräftor, mjuka bottenar bör dock undvikas då provtagning på dessa lokaler kan sätta igen filter snabbare. Även vid höga flöden ska eDNA-provtagning undvikas, då detta kan späda ut mängden DNA.

Mängden partiklar i vattnet är även högre vid högflöden vilket kan leda till att filtret sätt igen snabbare.

Vid filtreringen används alltid handskar i alla moment för att undvika kontaminering. Efter utrustningen monterats ihop pumpas ca 2 liter vatten igenom utrustningen för att bli av med rester från desinficering och även för att minska kontaminering. Efter detta placeras filtret i filterhållaren med en pincett, och gummipackningen placeras med en annan pincett, varefter

muttrarna skruvas i. Filterhållaren sänks sedan ned i vattnet på ett lämpligt ställe och den andra slangen där vattnet kommer ut placeras i en hink. Sedan startas pumpen, antingen till 5 liter har filtrerats eller till dess att filtret sätts igen.

Efter första filtreringen tas filterhållaren upp ur vattnet och skruvas isär, samma pincett som tidigare används för att plocka ur gummipackningen och den andra pincetten för att plocka upp filtret och lägga detta i ett provrör. Ett nytt filter placeras sedan i filterhållaren, med den pincett som använts för filtret och gummipackningen placeras på plats med samma pincett som tidigare använts till detta. Filterhållaren placeras i vattnet och pumpen startas, filtreringen pågår till 5 liter har filtrerats eller till dess att filtret sätts igen. Efter den andra filtreringen skruvas filterhållaren isär och gummipackningen plockas ut med samma pincett som tidigare som använts för gummipackningen och filtret placeras i ett provrör med samma pincett som tidigare använts för filter.

Vid lokaler där eDNA-provtagning genomförts plockades även fångstnät av nattsländelarver, om det fanns och gick att plocka, som också skickades in för analys. Filtren och eventuella fångstnät av nattsländelarver placerades i provrör som märktes med datum, vattennamn, lokal och antal liter som filtrerats. Varje filter och nät placerades i ett separat provrör. Provrören frystes ned för att sedan skickas till Statens veterinärmedicinska anstalt [SVA] för analys.

Då provtagningen är klar desinficeras utrustningen. Desinficeringsmedlet som används består av en 10% klorinlösning som förstör DNA som finns på utrustningen. Desinficeringen görs genom att skruva isär alla delar i filterhållaren och lägga detta i en hink, slangarna kopplas till pumpen och lösningen pumpas sedan genom utrustningen (fig. 1). Natriumtiosulfat, vilket har en neutraliserande på klorinlösningen som annars kan påverka prover som tas, pumpas även genom utrustningen och sprayas på utrustningen.

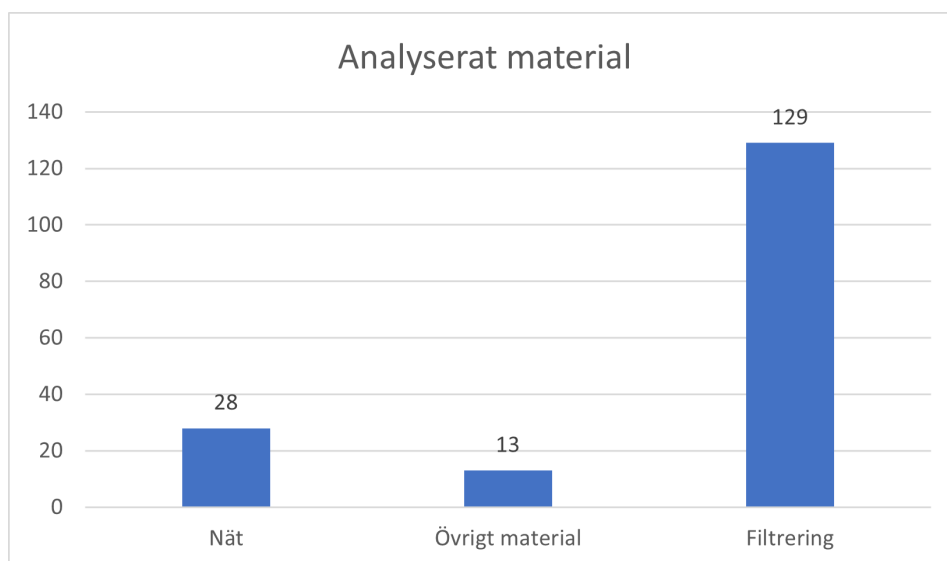


Figur 1. Rygsäckspumpen under desinficering.

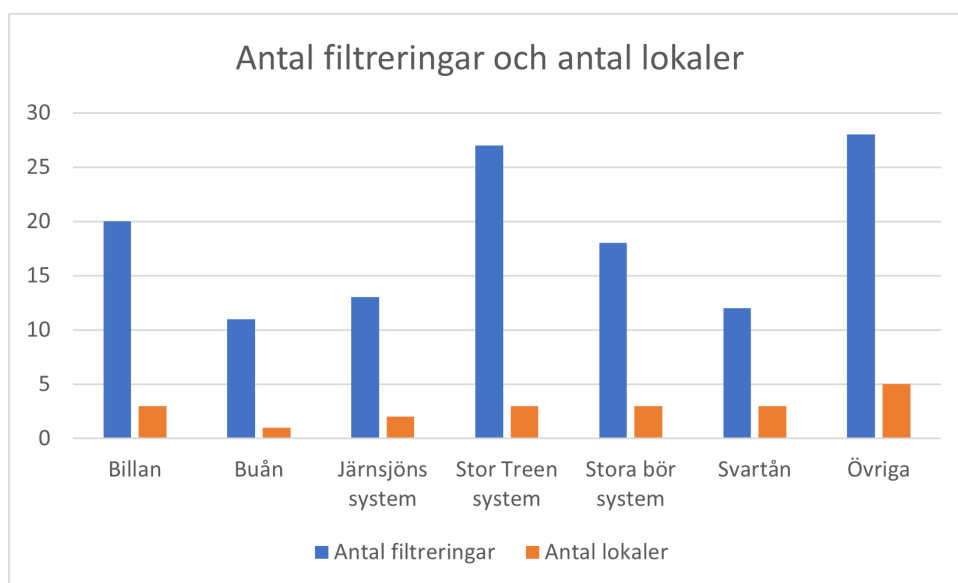
2 Resultat

2.1 Vad har analyserats

De material som har skickats in för analys har varit filter, fångstnät av nattslända och även minkspillning och hela eller delar av döda kräftor (fig 2). Genom att analysera minkspillning går det att undersöka om mink har ätit kräftor och vilken sort. Döda kräftor, hela eller delar, skickades även på analys för att undersöka om kräftorna burit på någon smitta som orsakat dess död. Under 2022 har 129 filtreringar genomförts på sammanlagt 20 olika lokaler (fig. 3).



Figur 2. Det insamlade materialet under 2022 bestod av filter: 129, nät: 28 och övrigt material: 13.

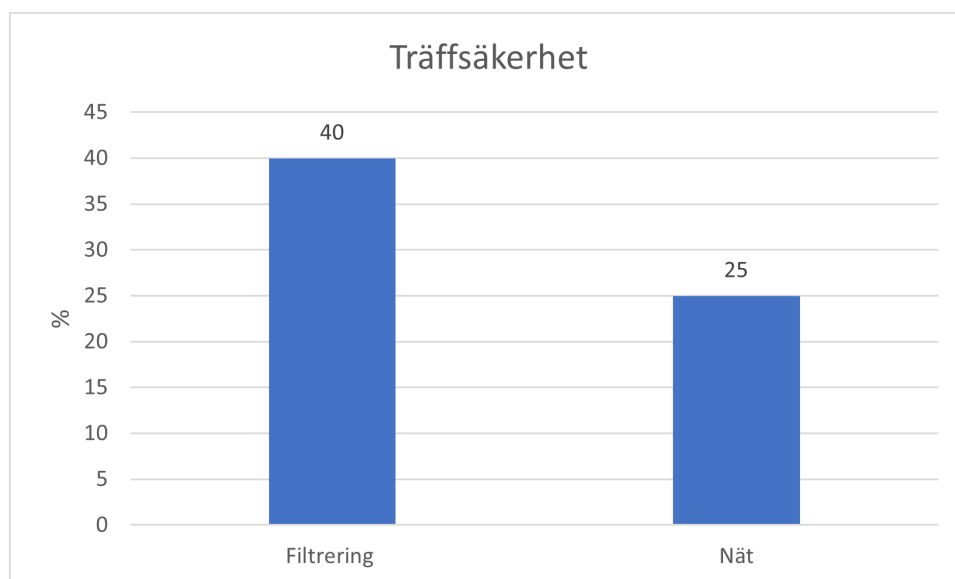


Figur 3. Antal filtreringar under 2022 och antal lokaler i respektive vattensystem.

2.2 Träffsäkerhet

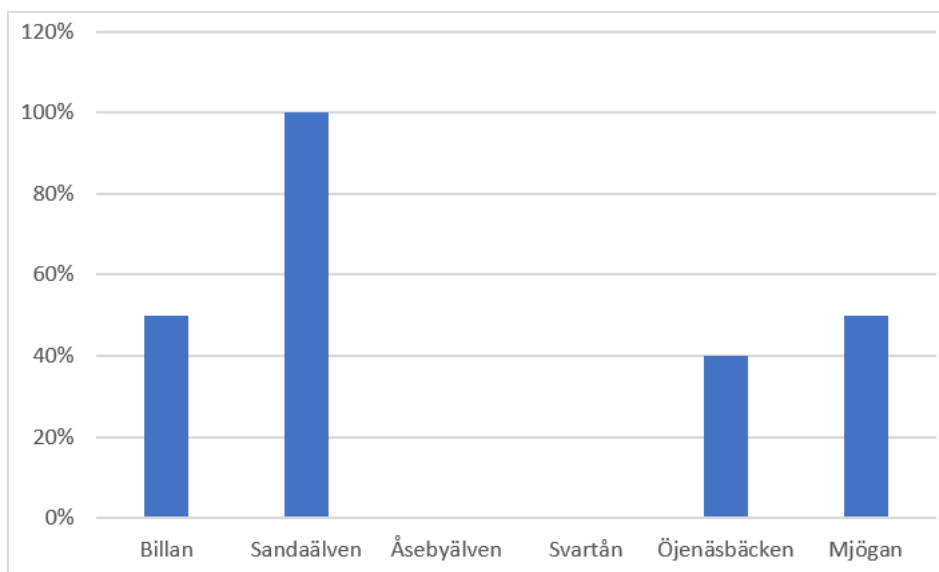
Av sju olika vatten med känd förekomst av flodkräfta eller signalkräfta där eDNA provtagningen genomfördes under 2022 gav 40% av proverna träff på kräftor vid provtagningen med filtrering och 21,4% av de insamlade fångstnäten gav träff i samma vatten (fig. 4). Inga kräftor har observerats vid någon av provtagningarna. De insamlade fångstnäten har resulterat i träffar i två vatten under 2022. Insamlingen av fångstnät har genomförts i närheten av lokalerna där filtreringen genomfördes och i den omfattning det är

möjligt baserat på djup och tillgång på fångstnät. Mängden insamlade fångstnät varierade baserat på hur mycket som fanns på lokalerna, ett provrör fylldes med ca 10–25 nät.

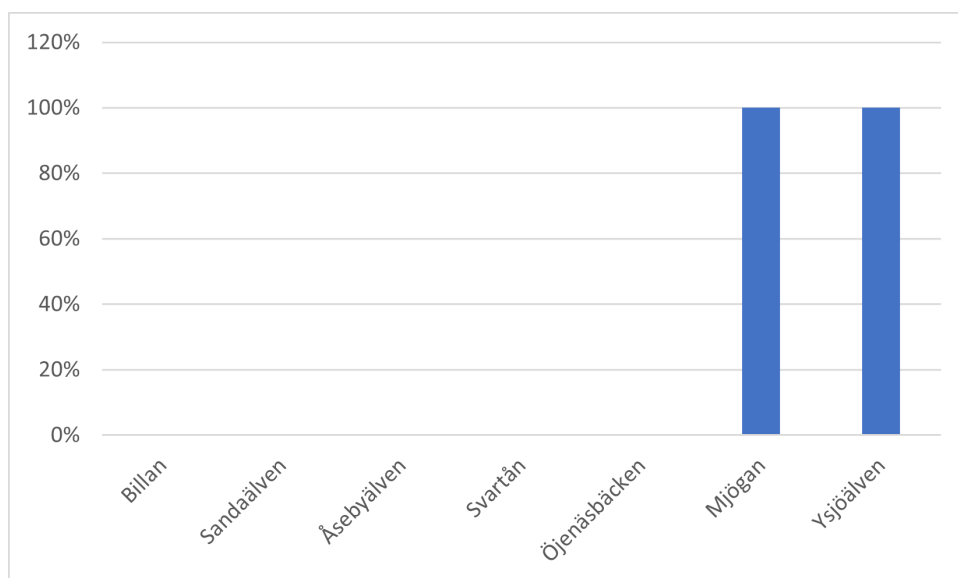


Figur 4. Träffsäkerhet i procent i vatten med kända kräftbestånd 2022. Vid provtagning med filtrering är träffsäkerheten 40% och för insamlade nät 25%.

I samband med elimineringsfiske av signalkräfta i ett av de sju vattensystemen med kända kräftbestånd där även eDNA-provtagning genomförs, Öjenäsbäcken, blev det endast 40% träff på kräftor (fig. 5), trots kännedom om och observation av kräfta längre upp i systemet. Lokalen där det blev träff är en lokal med lugnare vatten, de andra lokalerna i detta vatten har strömmande vatten. Det enda vatten som hade 100% träffsäkerhet var Sandaälven. Under säsongen 2022 blev det endast två träffar på kräftor på de insamlade fångstnäten från nattsländelarver (fig. 6).



Figur 5. Träffsäkerhet i procent vid de olika lokalerna som provtagits med filtrering.



Figur 6. Träffsäkerhet i procent vid de olika lokalerna där nät från nattsländelarver analyserats.

I de vatten där det inte ska finnas några kräftor har inte heller något DNA från dem gått att hitta. Det bör inte finnas kräftor i dessa vatten så detta resultat bör stämma men med hänsyn till att träffsäkerheten endast var 40% i vatten där det finns kräftor tolkas detta resultat med viss osäkerhet. Om resultatet stämmer skulle träffsäkerheten i dessa vatten vara 100% och då dessa inkluderas i beräkningen för träffsäkerhet ge en översiktlig träffsäkerhet på 70% vid filtrering, och 58,33% på de insamlade näten.

Baserat på säsong finns en viss variation i antal träffar, under juni månad blev det fyra träffar på kräftor vid de eDNA provtagningarna som skedde i de vattnen med kända kräftbestånd. I juli 7 träffar och i augusti 6 träffar (tabell 1). Variationen är dock relativt liten.

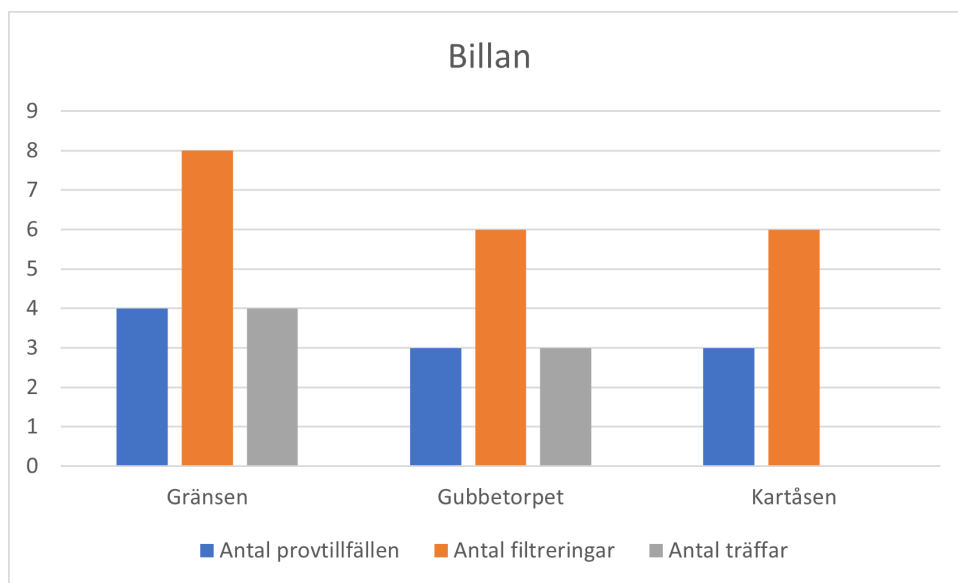
Tabell 1. Antal träffar i vatten med kända kräftbestånd under olika månader.

	Juni	Juli	Augusti
Billan	33%	50%	33%
Åsebyälven	0	0	0
Sandaälven	100%	100%	100%
Svartån	0	0	-
Öjenäsbäcken	0	25%	25%
Totalt	18%	29%	33%

2.2.1 Billan

I vattendraget Billan genomfördes under 2022 provtagningar på tre lokaler, Gränsen, Gubbetorpet och Kartåsen (fig. 7). Vid Gränsen resulterade provtagningen i träff på flodkräfta vid hälften av filtreringarna, även vid Gubbetorpet resulterade provtagningen i träff på

flodkräfta vid hälften av filtreringarna och vid Kartåsen resulterade provtagningen inte i någon träff vilket var förväntat.



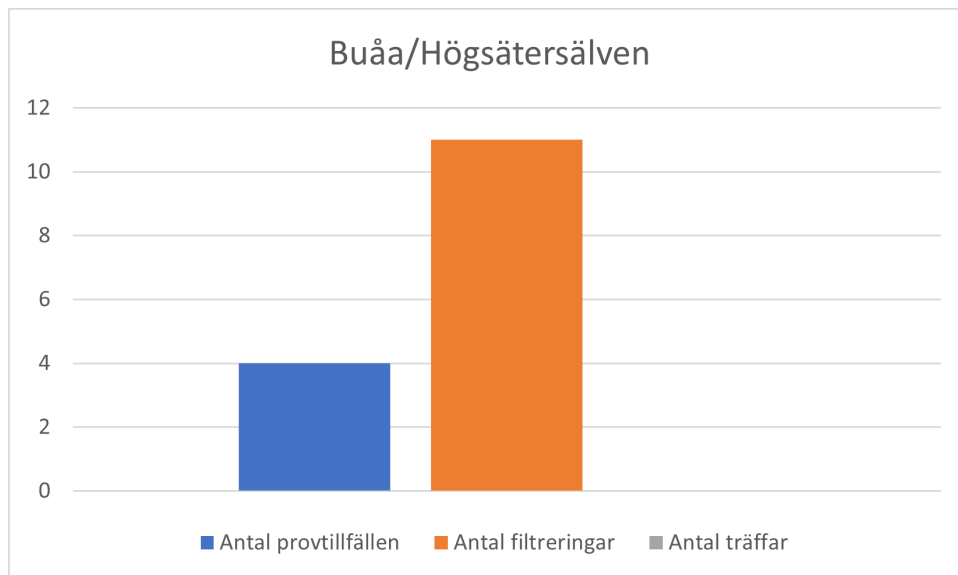
Figur 7. Antal provtillfällen, antal filtreringar och antal träffar i Billan på respektive lokal.

2.2.2 Buåa/Högsäterälven

Buåa/Högsäterälven

I Buåa/Högsäterälven har eDNA-provtagning genomförts fyra gånger (fig. 8). På grund av grumligt vatten har filtren satts igen flertalet gånger och en mindre mängd vatten än de 5 liter som rekommenderas har filtrerats vid varje provtagning. Inga kräftor har kunnat påvisas

genom eDNA-provtagningen. Troligen finns inga kräftor kvar i Buåa/Högsäterälven, efter att illegalt utplanterade signalkräftar upptäcktes 2005 (SNIEF, 2022a).

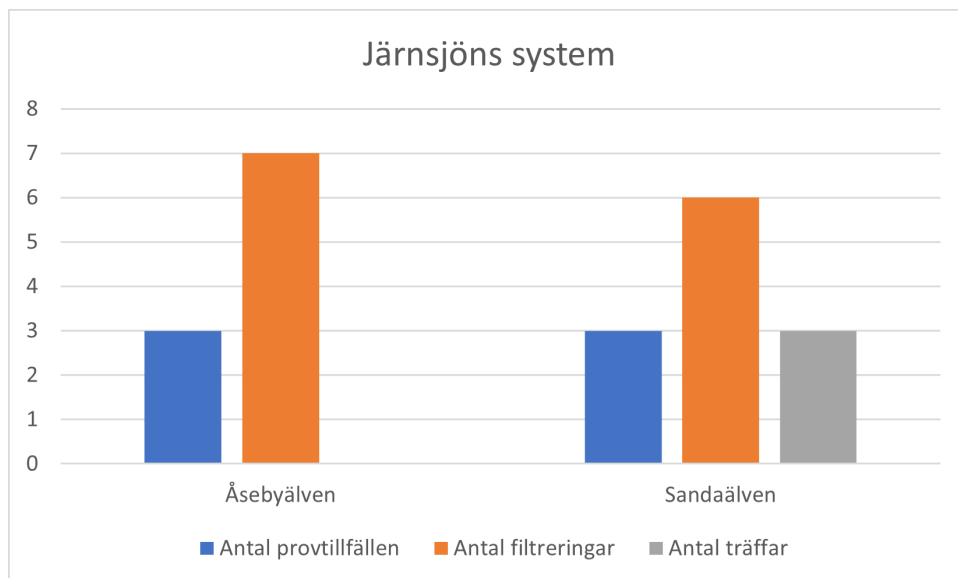


Figur 8. Antal provtillfällen, antal filtreringar och antal träffar i Buåa/Högsäterälven

2.2.3 Järnsjöns system

Järnsjöns system

I Järnsjöns system ingick två lokaler i provtagningen för eDNA, Åsebyälven och Sandaälven (fig. 9). Sedan tidigare finns vetskap om flodkräftor på båda dessa lokaler i relativt höga tätheter, i Åsebyälven har beståndet av flodkräftor bedömts vara mycket bra, även i Sandaälven bedöms beståndet vara mycket bra. Vid provtagning av eDNA i dessa vattendrag blev det dock endast träff i Sandaälven. I Åsebyälven var vattnet vid varje provtagningstillfälle grumligt och mindre än 5 liter filtrerades varje filtrering.

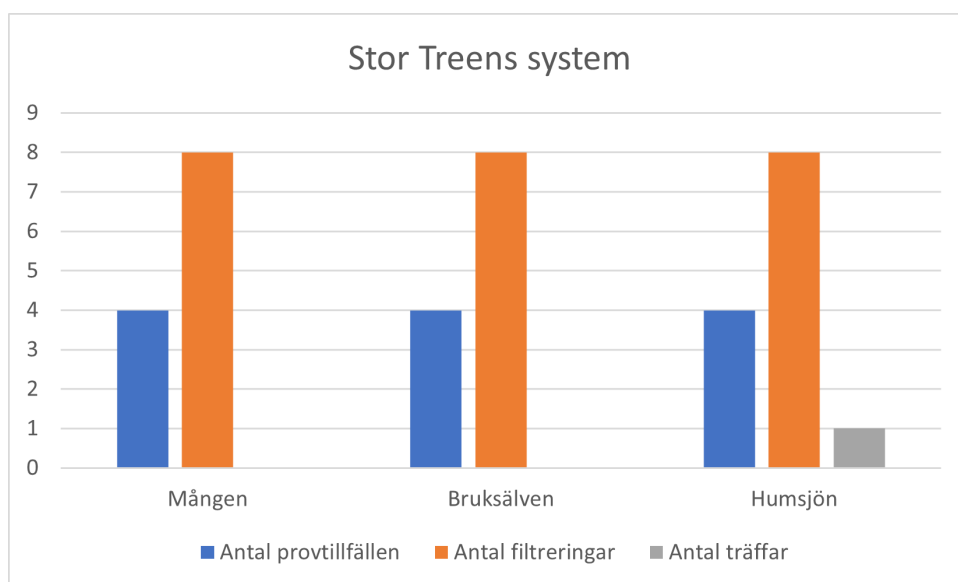


Figur 9. Antal provtillfällen, antal filtreringar och antal träffar i Järnsjöns system på respektive lokal.

2.2.4 Stor Treens system

Stor Treens system

I Stor Treens systemet ingick 3 lokaler i eDNA-provtagningen, Mången, Bruksälven och Humsjön (fig. 10). Alla dessa vatten var drabbade av kräftpestutbrott under 2018 och högst troligt finns inga kräftor i detta system, om det finns bör det vara signalkräftor. I Mången och Bruksälven påvisades inget DNA vilket var väntat. I Humsjön upptäcktes eDNA från flodkräfta, men endast på en filtrering varför det kan ses något osäkert.

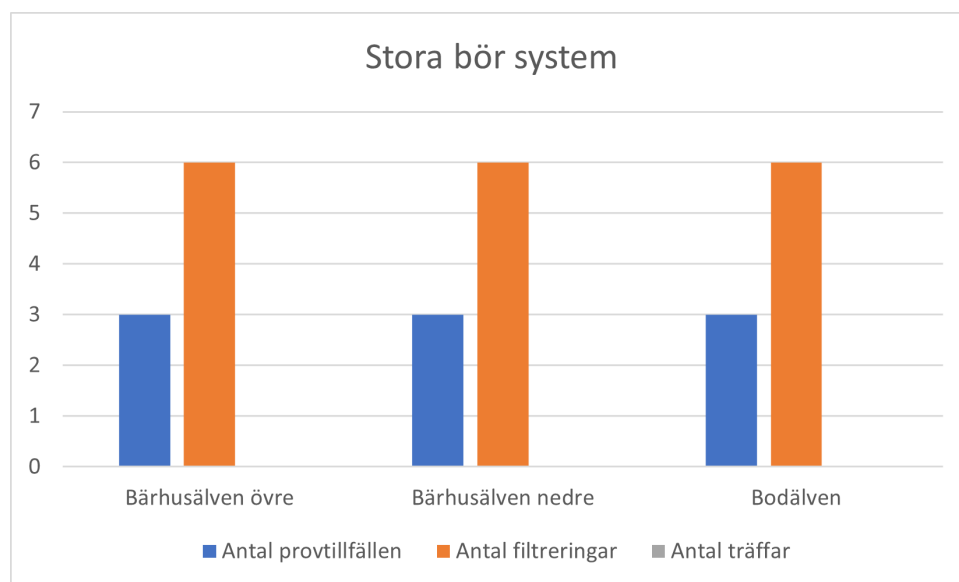


Figur 10. Antal provtillfällen, antal filtreringar och antal träffar i Stor Treens system på respektive lokal.

2.2.5 Stora Börs system

Stora Bör system

I Stora Börs system genomfördes eDNA-filtrering på tre lokaler. Två av dessa var i Bärhusälven på olika platser och en i Bodälven (fig. 11). Stora Bör-systemet drabbades av kräftpest 2018 och förväntades vara tomt, det blev inte heller några träffar i systemet vilket alltså bör stämma.

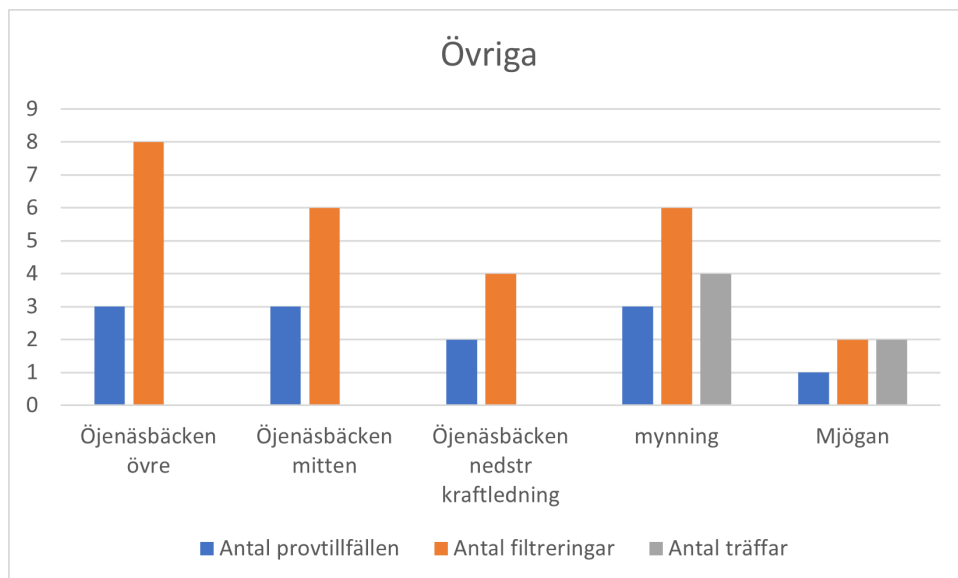


Figur 11. Antal provtillfällen, antal filtreringar och antal träffar i Stora Börs system på respektive lokal.

2.2.6 Övriga

I Öjenäsbäcken har det genomförts eDNA-provtagning på fyra lokaler (fig. 12). Ursprungligen var det tre lokaler, men vid utrotningsfiske av signalkräfta i bäcken observerades kräftor högre upp i vattnet än vad som tidigare misstänktes. Därför lades ytterligare en lokal till nedströms platsen där kräftorna observerats. Endast en lokal visade träff på kräfta i Öjenäsbäcken, detta på lokalen längst ned i bäcken, ”mynning”. Denna lokal var djupare än de andra och hade lugn vattenhastighet, vattnet var vid två av tre provtagningar grumligt.

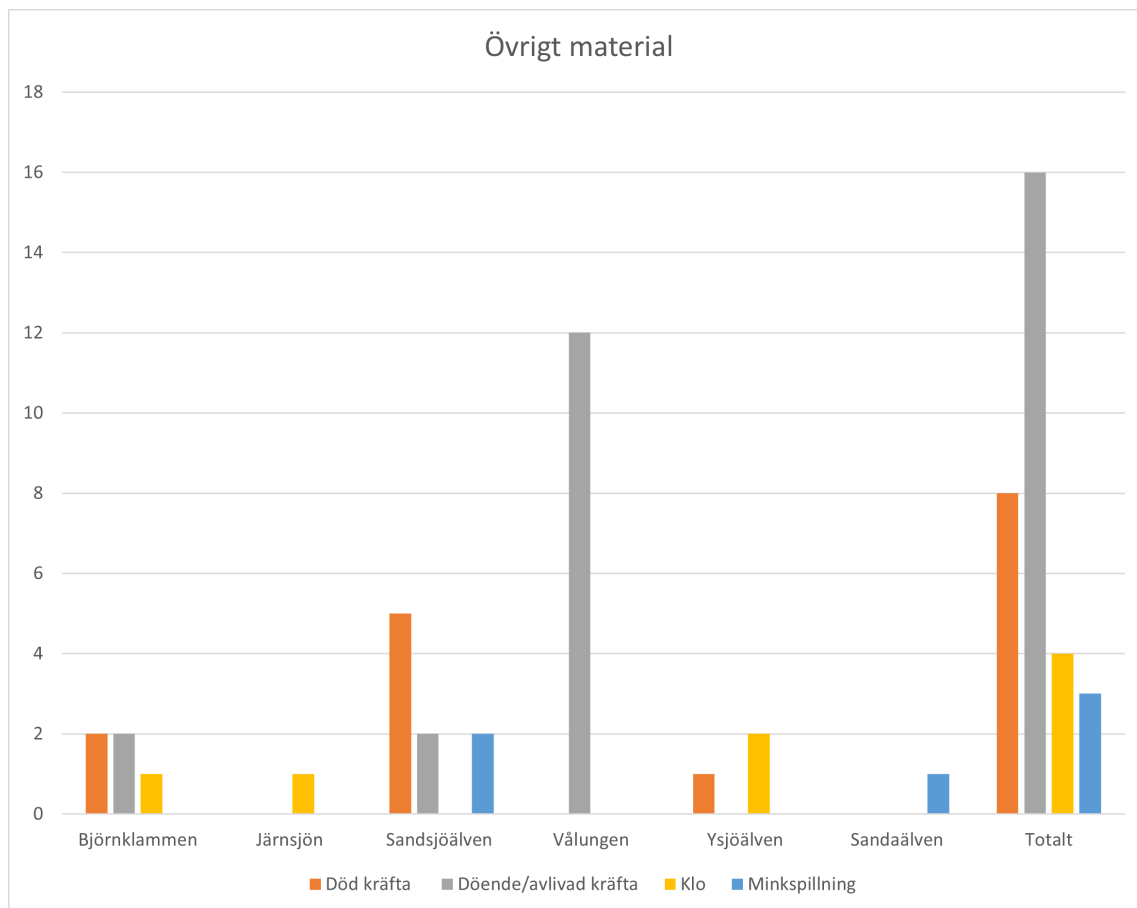
I Mjögan genomfördes eDNA-filtrering en gång under 2022 och här finns sedan många år tillbaka ett konstaterat bestånd av signalkräfta. Vid analys blev det träff på signalkräfta i vattnet.



Figur 12. Antal provtillfällen, antal filtreringar och antal träffar i övriga vatten på respektive lokal.

2.2.7 Övrigt material

Det övriga materialet som samlats in för att skickas på analys bestod av döda kräftor, döende kräftor, klor och minkspillning (fig. 13). Detta material samlades in då det påträffades och en misstanke om smitta fanns.



Figur 13. Övrigt material som samlats in i samband med besök i fält, det övriga materialet består av döda kräftor, döende/avlivad kräfta, klor och minkspillning.

Vid Björnklammens utlopp samlades i juni 2022 en död flodkräfta, en döende flodkräfta samt en klo från flodkräfta in för att skickas på analys på grund av misstanke om kräftpest. Ingen smitta kunde påvisas vid analys på de två kräftorna eller klon. Vid analys av klon kunde porlinsjuka påvisas, men då detta inte kunde påvisas hos någon av kräftorna bör inte denna smitta ha orsakat de andra kräftornas död. I augusti 2022 samlades en död flodkräfta samt en döende flodkräfta in från samma plats, även dessa på grund av misstanke om kräftpest, inte heller denna analys påvisade någon smitta.

En klo från flodkräfta samlades in från Järnsjön i maj 2022 för att skickas för analys på grund av misstanke om kräftpest. Analysen påvisade ingen smitta.

Döda flodkräftor hittades i Sandsjöälven i juni 2022. Dessa samlades in och skickades för analys vilken inte kunde påvisa någon smitta. Under juli återbesöktes vattendraget för att undersöka om det gick att se fler döda kräftor. Vid detta besök hittades ytterligare döda flodkräftor men analysen på dessa kunde inte påvisa någon smitta. Vid första besöket samlades en minskspillning in, analys påvisade att minken ätit flodkräftor. Ingen av de analyserade flodkräftorna påvisade någon smitta.

Vid provfiske i Vålungen där det finns bestånd av flodkräftor i den norra delen av sjön och ett bestånd av signalkräftor i den södra delen av sjön samlades de signalkräftor som fångades i mjärdarna in och avlivades. Dessa 12 skickades sedan på analys för att undersöka om de bar på någon smitta. Efter analys kunde ingen smitta påvisas hos de 6 signalkräftor som blev analyserade.

En död flodkräfta samt två klor från flodkräfta samlades in från Ysjöälven på grund av misstanke om kräftpest. Ingen smitta kunde påvisas på något inskickat material.

I Sandaälven finns ett bra bestånd med flodkräftor och här samlades även minkspillning in vid fältbesök. Detta skickades på analys och flodkräfta påvisades.

3 Diskussion

eDNA-provtagningen visade på 40% säkerhet, vilket var lägre än förväntat och indikerar att det finns förbättringspotential. En högre träffsäkerhet förväntades även på de insamlade fångstnäten från nattslända, då dessa filtrerar en stor vattenvolym och därför bör innehålla mycket eDNA. Fångstnäten från nattslända samlades in på de filtreringslokaler där de hittades och det fanns möjlighet att plocka dem, på vissa lokaler fanns fångstnät inte tillgängligt vid varje besök, och på vissa lokaler fanns aldrig fångstnät att plocka.

På två av tre lokaler där provtagning genomfördes i Billan påvisades flodkräfta. Resultatet att kräftor finns vid Gränsen var glädjande. Träffarna på lokalerna Gränsen och Gubbetorpet var inte 100%, vattennivån var medelhög vid majoriteten av provtagningstillfällena och det gick att filtrera 5 liter vid alla utom ett filtreringstillfälle. Dock är DNA svårare att upptäcka i strömmande vatten (Bohman, 2018; Barnes & Turner, 2016; Seymour et al, 2018; Pillipod et al, 2014). Från det närmsta kända flodkräftbeståndet i Norge till lokalen Gränsen är avståndet ca 2 km och från Gränsen till Gubbetorpet ca 1 km. DNA kan färdas långa sträckor i vattendrag, i stora vattendrag kan DNA upptäckas tiotals mil från källan och i mindre vattendrag är det möjligt att DNA kan upptäckas flera kilometer nedströms källan (Bohman, 2018). Det är därför inte helt otänkbart att DNA färdats i vattnet, men det är mer sannolikt att kräftor faktiskt vandrat nedströms. Flertalet sträckor i Billan, bland annat Gubbetorpet, har inte inventerats sedan 2017, vilket bör genomföras för att undersöka utbredningen av flodkräfta. Även aktiviteten hos kräftorna påverkar möjligheten att upptäcka DNA vilket delvis kan förklara resultatet om kräftorna till exempel inte var särskilt aktiva vid just provtagningstillfället vid lokalen. Lokalen Kartåsen förväntades vara tom vilket stämmer med analys svaret.

De två lokaler som blev provtagna i Järnsjöns system hyser båda bra kräftbestånd och här förväntades träffar på flodkräftor på båda lokalerna. Endast på en lokal, Sandaälven, påvisades kräftor. I Åsebyälven borde vi ha kunnat påvisa kräftor men gjorde inte det. Detta kan bero på att filtret sattes igen av partiklar vid varje filtrering och ingen av filtreringarna filtrerade 5 liter. I vatten som är rika på alger eller är mycket humösa kan det vara svårare att upptäcka DNA, mängden alger ökar under sommaren (Bohman, 2018) och kan därför ha påverkat utfallet av eDNA-provtagningen negativt.

Stora Börs system drabbades av kräftpest 2018 och det förväntades inga träffar här, vilket stämmer överens med analyssvaren. Även Stor Treens system drabbades av kräftpest 2018 och bör således vara tomt med hänsyn till flodkräftor. Vid två av lokalerna resulterade inte provtagningen i några träffar vilket var förväntat, men i Humsjön påvisades flodkräfta. Det har tidigare funnits flodkräfta i sjön, och det finns rykten om att flodkräftor klarat sig i sjön efter kräftpestutbrottet 2018. Vid okulär inventering i sjön observerades dock inga spår efter kräftor vid den del av sjön där de ska finnas (SNIEF, 2022b). Om resultatet från eDNA-provtagningen stämmer är det glädjande besked, men resultatet kan även bero på gammalt DNA som ligger lagrat i sediment som rörts upp vid filtreringen då botten är dyg. DNA i sediment bevaras längre än DNA i fria vattnet (Sakata et al. 2020) och det kan gå att upptäcka DNA från utdöda organismer i sediment (Bohman, 2018). Givet att provtagningslokalen i övrigt är en olämplig kräftbiotop är denna träff osäker.

I Öjenäsbäcken där även utrotningsfiske på signalkräfta genomförts resulterade eDNA-provtagningen i träff på signalkräfta endast vid lokalen längst nedströms i vattendraget trots observation av kräftor högre upp i vattendraget. Ytterligare träff borde skett vid lokalen ovan den längst nedströms. Vattenhastigheten i Öjenäsbäcken är strömmande vid alla provtagningslokaler förutom den nedersta lokalen, vilket skulle kunna förklara varför provtagningen inte resulterade i träff, då det kan vara svårare att upptäcka DNA i rinnande vatten än i till exempel sjöar (Bohman, 2018; Barnes & Turner, 2016; Seymour et al, 2018; Phillipod et al, 2014).

I sjön Vålungen finns ett bestånd av flodkräfta i den norra delen och ett bestånd av signalkräfta i södra delen av sjön, Sex av de 12 fångade signalkräftorna analyserades och hos dessa påvisades ingen pestsmitta (SNIEF, 2022c).

Vikten av att återbesöka sjöar och vattendrag framkommer efter analyserna som genomförts under 2022. Efter upptäckt av döda kräftor är det viktigt att skicka dessa på analys och det är även viktigt att återbesöka lokalen och undersöka om fler döda kräftor upptäcks. Döda kräftor behöver inte betyda aktivt kräftpestutbrott utan kan bero på annat som stressar kräftorna. Kräftor är känsliga för såsom lågt pH, låga syrgasvärden, andra sjukdomar, övergödning, grumling av vattnet (Jansson, 2011).

Kräftor släpper en mindre mängd DNA än exempelvis fisk. Detta kan till viss del förklara den låga träffsäkerheten på 40%, stora kräftor släpper med stor sannolikhet även mindre DNA än små kräftor då de små kräftorna ömsar oftare än de stora (Bohman, 2018). Om tätheten av kräftor dessutom är låg tenderar så kallade falska negativa att bli vanligare.

Det finns en viss säsongsvariation i träffsäkerheten, vilket stämmer överens med forskning inom ämnet. Kräftor ömsar skal under den varmare perioden under året, vanligtvis maj-september (Jansson, 2011) och skalömsning är en aktivitet som släpper DNA-material till omgivningen, under de kallare månaderna är kräftorna i stället mindre aktiva och avger inte mycket DNA (Bohman, 2018). Äggbärande honor släpper även mer DNA till vattnet än andra kräftor (Dunn et al. 2017) vilket bör tas hänsyn till vid eDNA-provtagning.

Vattenhastigheten är en faktor som påverkar möjligheten att upptäcka eDNA. Vid låga flöden är träffsäkerheten störst närmast källan varefter träffsäkerheten avtar relativt snabbt

(Bohman, 2018; Jane et al. 2015). Vattennivåerna i de provtagna vattnen har under säsongen 2022 nästan uteslutande varit låga till medelhöga, så om kräftor funnits i vattnet kan flödet ha påverkat detektion av DNA negativt. I rinnande vatten kan även möjligheten att finna spår av DNA försvinna snabbare än i sjöar (Bohman, 2018; Barnes & Turner, 2016; Seymour et al, 2018; Pillipod et al, 2014) och många av de provtagna lokalerna var belägna i just vattendrag.

Det finns alltid en risk för kontaminering vid provtagning av eDNA. Detta undviks genom att desinficera utrustning noggrant och genom att använda engångshandskar vid varje moment (Bohman, 2018). Det är även viktigt att tänka på hur prover tas. Exempelvis ska inte prover tas nedströms person som står i vattnet eller liknande.

Den frysning som sker av proverna kan ge en sämre kvalitet på DNA-kedjorna (Takahara et al, 2015), vilket i sin tur ger en sämre träffsäkerhet. Om proverna fryses och tinas upp flera gånger ger även detta en sämre träffsäkerhet då kvaliteten på DNA-kedjorna försämras ytterligare (Takahara et al, 2015; Shao et al, 2012; Spens et al, 2016). Det är mycket möjligt att de frysta proverna tinas då de skickas med post till labbet för analys, och sedan stoppas de i frys igen innan analys kan genomföras. För att öka träffsäkerheten är förvaring av proverna i buffert eller etanol ett bättre alternativ för konservering av DNA än frysning (Spens et al. 2016).

Det finns mycket förbättringspotential inom metodiken för eDNA-provtagning för att kunna öka träffsäkerheten och därmed skapa ett tillförlitligt verktyg i framtiden. Att se över kontamineringsrisken är alltid av stor vikt och bör fortsatt vara det. Det skulle vara önskvärt att se över bästa alternativ för hur prover ska hanteras och skickas för analys, till exempel bör prover inte frysas ned utan möjligheten att använda sig av buffert eller etanol bör ses över då detta ska vara ett bättre alternativ för att bevara DNA-kvaliteten (David Strand, muntlig).

För att försöka förhålla sig till flödets påverkan på utfall på eDNA-provtagningen skulle fler replikat kunna tas och/eller fler lokaler inkluderas i provtagningen. Detta för att dels täcka in ett större område vilket kan ge en tydligare bild av utbredning, och även då DNA vid låga flöden inte färdas så långt i vattnet (Bohman, 2018). Med fler replikat går det även att se hur träffsäkert resultatet är, då fler replikat ökar möjligheten att upptäcka DNA och minskar risken för så kallade falskt negativa prover (Bohman, 2018; Jerde & Mahon, 2015; Ficetola et al. 2016). Detta skulle dock kosta mer resurser då det leder både till mer tid i fält och till ökade analyskostnader.

4 Referenser

Bohman, P. 2018. eDNA I en droppe vatten, Vattenprovtagning av eDNA från fisk, kräftor och musslor – en kunskapssammanställning. *Aqua reports*, 2018:18. SLU.

Bohman, P., & Edsman, L. 2013. Marmorkräftan i Märstaån – riskanalys och åtgärdsförslag, *Aqua reports*, 2013: 17, 114 s.

- Burnes, MA., & Turner, CR. 2016. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conserv Genet*, 17: 1-17, doi: 10.1007/s10592-015-0775-4.
- Dunn, N., Priestley, V., Herraiz, A., Arnold, R., & Savolainen, V. 2017. Behavior and season affect crayfish detection and density inference using environmental DNA. *Ecology and Evolution*, 17: 7777-7785.
- Ficetola, GF., Taberlet, P., & Coissac, E. 2016. How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? *Mol. Ecol. Resour*, 16: 604–607.
- Jane, SF., Wilcox, T, M., McKelvey, K, S., Young, M, K., Schwartz, M, K., Lowe, W, H., ... & Whiteley, A, R. 2015. Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources*, 15: 216-227.
- Jansson, T. 2022. *Flodkraftans biologi*. Hushållningssällskapet i Värmland.
- Jerde, C.L. & Mahon, A.R. 2015. Improving confidence in environmental DNA species detection. *Molecular Ecology Resources*, 15: 461–463
- Pillipod, D., et al. 2014. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14(1): 109-116.
- Sakata, M, K., Yamamoto, S., Gotoh, R, O., Miya, M., Yamanaka, H., & Minamoto, T. 2020. Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. *Environmental DNA*, 2020:2: 505-518.
- Shao, W., Khin, S., & Kopp, W, C. 2012. Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. *Biopreservation and Biobanking*, 10(1): 4-11.
- Seymour, M., Durance, I., Cosby, B, J., Ransom-Jones, E., Diener, K., Ormerod, S, J., ... & Creer, S. 2018. Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications Biology*, 1(4), doi:10.1038/s42003-017-0005-3.
- SNIEF, 2022a. Delrapport 8. *Buåa/Högsäterälven och Nordsjön. Genomförda åtgärder samt historik*. Svensk-Norsk innsats for edelkreps/flodkräftor. www.snief.org
- SNIEF, 2022b. Delrapport 2. *Okulärintivering av kräftor – metodik, potential och en framtida standardisering*. Svensk-Norsk innsats for edelkreps/flodkräftor. www.snief.org
- SNIEF, 2022c. Delrapport 3. *Undersökning av flodkräftbestånd i Björnklammens vattensystem*. Svensk-Norsk innsats for edelkreps/flodkräftor. www.snief.org
- Spens, J., Evans, A, R., Halfmaerten, D., Knudsen, S, W., Sengupta, M, E., Mak, S, S., ... & Hellström, M. 2016. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 2016.
- Strand, D, A., Jussila, J., Johnsen, S., Viljamaa-Dirks, S., Edsman, L., Wiik-Nielsen, J., ... & Vrålstad, T. 2014. Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *Journal of Applied Ecology*, 51: 544–553.

Takahara, T., Minamoto, T., & Doi, H. 2015. Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Biol. Conserv*, 183, 64–69.

Wittwer, C., Stoll, S., Strand, D., Vrålstad, T., Nowak, C., & Thines, M. 2017. eDNA-based crayfish plague monitoring is superior to conventional trapbased assessments in year-round detection probability. *Hydrobiologia*, 807(1): 87–97.