

2044

NINA Rapport

DNA-baserte metoder som verktøy i overvåking av invertebrater i innsjøer

Thomas Correll Jensen, Hege Brandsegg, Knut Andreas Eikland Bækkeli, Marie Davey, Frode Fossøy, Elina Lungrin, Markus Majaneva; Ann Kristin Schartau, Gaute Velle, Bjørn Walseng



NINAs publikasjoner

NINA Rapport

Dette er NINAs ordinære rapportering til oppdragsgiver etter gjennomført forsknings-, overvåkings- eller utredningsarbeid. I tillegg vil serien favne mye av instituttets øvrige rapportering, for eksempel fra seminarer og konferanser, resultater av eget forsknings- og utredningsarbeid og litteraturstudier. NINA Rapport kan også utgis på engelsk, som NINA Report.

NINA Temahefte

Heftene utarbeides etter behov og serien favner svært vidt; fra systematiske bestemmelsesnøkler til informasjon om viktige problemstillinger i samfunnet. Heftene har vanligvis en populærvitenskapelig form med vekt på illustrasjoner. NINA Temahefte kan også utgis på engelsk, som NINA Special Report.

NINA Fakta

Faktaarkene har som mål å gjøre NINAs forskningsresultater raskt og enkelt tilgjengelig for et større publikum. Faktaarkene gir en kort framstilling av noen av våre viktigste forskningstema.

Annen publisering

I tillegg til rapporteringen i NINAs egne serier publiserer instituttets ansatte en stor del av sine forskningsresultater i internasjonale vitenskapelige journaler og i populærfaglige bøker og tidsskrifter.

DNA-baserte metoder som verktøy i overvåking av invertebrater i innsjøer

Thomas Correll Jensen, Hege Brandsegg, Knut Andreas Eikland Bækkeli, Marie Davey, Frode Fossøy, Elina Lungrin, Markus Majaneva; Ann Kristin Schartau, Gaute Velle, Bjørn Walseng.

Jensen T.C., Brandsegg H., Bækkelie K.A.E., Davey M., Fossøy F., Lungrin E., Majaneva M.; Schartau A.K., Velle G., Walseng B. 2021. DNA-baserte metoder som verktøy i overvåking av invertebrater i innsjøer. NINA Rapport 2044. Norsk institutt for naturforskning.

Oslo, november, 2021

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-4827-3

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

Åpen

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

KVALITETSSIKRET AV

Annette Taugbøl

ANSVARLIG SIGNATUR

Forskningsjef Jon Museth

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Miljødirektoratet

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

M-2154 I 2021

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Steinar Sandøy

FORSIDEBILDE

Langtjern, © Thomas Correll Jensen, NINA

NØKKEWORD

- Norge (Østlandet)
- Overvåking
- Småkreps, bunndyr
- Metodeuttesting
- DNA-baserte metoder, miljøDNA, DNA-metastrekkoding, konvensjonelle metoder
- Atnsjøen, Breidtjern, Langtjern, Østre Bjonevatnet, Rondvatnet, Stortjønna

KONTAKTOPPLYSNINGER

NINA hovedkontor
Postboks 5685 Torgarden
7485 Trondheim
Tlf: 73 80 14 00

NINA Oslo
Sognsveien 68
0855 Oslo
Tlf: 73 80 14 00

NINA Tromsø
Postboks 6606 Langnes
9296 Tromsø
Tlf: 77 75 04 00

NINA Lillehammer
Vormstuguvegen 40
2624 Lillehammer
Tlf: 73 80 14 00

NINA Bergen
Thormøhlens gate 55
5006 Bergen
Tlf: 73 80 14 00

www.nina.no

Sammendrag

Jensen T.C., Brandsegg H., Bækkelie K.A.E., Davey M., Fossøy F., Lungrin E., Majaneva M.; Schartau A.K., Velle G., Walseng B. 2021. DNA-baserte metoder som verktøy i overvåking av invertebrater i innsjøer. NINA Rapport 2044. Norsk institutt for naturforskning.

DNA-baserte metoder er en type metoder for overvåking og kartlegging av biologiske organismegrupper, og metodene har et stort potensial for anvendelse i ferskvann. Metodene har gjennomgått en rask utvikling, men fokuset har vært på bunndyr og elver. Det har vært forholdsvis lite fokus på bruk av DNA-baserte metoder i innsjøer.

Småkreps og bunndyr er viktige indikatororganismer i overvåkingen av innsjøer i Norge. Formålet med denne pilotstudien var å teste ut DNA-baserte prøvetyper og innsamlingsmetoder til kartlegging av småkreps og bunndyr i overvåkingssammenheng, samt å sammenligne denne metodikken med tradisjonell innsamlings- og bestemmelsesmetodikk.

Seks innsjøer i delprogram Øst av overvåkingssystemet ØKOFERSK inngikk i undersøkelsen. I alle innsjøene ble det tatt litorale og pelagiske småkrepsprøver. I fire av innsjøene ble det tatt bunndyrprøver i litoralsona og i utløpselven. For begge organismegrupper ble det tatt prøver med konvensjonell prøvetakingsmetodikk (planktonhåv og bunndyrhåv) og miljøDNA-prøver (filtrerte vannprøver). For hver stasjon omfattet prøveopparbeidingen for både småkreps og bunndyr: i) en planktonprøve/sparkeprøve opparbeidet med konvensjonell metodikk (stereolupe/mikroskop), ii) to planktonprøver/sparkeprøver for DNA-ekstraksjon/PCR/sekvensering, og iii) to vannprøver for DNA-ekstraksjon/PCR/sekvensering. For småkreps ble DNA-ekstraksjonen gjort på hele småkrepsprøven (bulkprøve). For bunndyr ble DNA-ekstraksjonen gjort på sprit fra bunndyrprøvene (EtOH-prøve). For bunndyrprøvene og de filtrerte vannprøvene ble det brukt en universell eukaryot-markør for det mitokondrielle genet COI. Siden denne markøren ikke er så velegnet til å amplifisere en del vanlige arter av calanoide hoppekreps (Calanoida) modifiserte vi markøren til bruk for småkreps. Det ble brukt to «trenede referansedatabaser» til artsidentifikasjon.

Siden det ble brukt en markør som er utviklet til å fange opp så mange akvatiske småkreps- og bunndyrarter som mulig, resulterte det i at spesifisiteten varierte svært mye mellom bulk/EtOH- og vannprøver. Størstedelen av DNAet i en vannprøve består av bakterier, sopp og encellede alger, som også fanges opp av en generell markør. Ved å bruke en mer spesifikk markør kombinert med ekstraksjon av DNA fra organismer/prøvefiksativ, kan DNA-metastrekkoding bli enda mer anvendbar ved å utelukke artene som ikke er målgruppe. Det ble registrert vesentlig flere arter småkreps med konvensjonelle metoder sammenlignet med DNA-baserte metoder, hvilket

kan forklares med dårlig dekningsgrad for strekkoder i referansebiblioteket (BOLD) for de norske artene. Det var også stor forskjell mellom de to anvendte DNA-metodene for småkreps. Bulkprøver oppnådde større likhet med konvensjonelle prøver enn vannprøver både mht. antall arter registrert og artssammensetningen. For bunndyr var det ikke så stor forskjell i artsantall og artsammensetningen mellom de ulike metodene som det var for småkreps. Dette gjaldt særlig antall arter registrert, der det var liten forskjell mellom etanolprøver og vannprøver i sammenligningen med konvensjonelle prøver.

I et kortere tidsperspektiv vil det være mer hensiktsmessig å satse videre på konvensjonell prøvetakingsmetodikk og bruk av bulkprøver og etanolprøver fremfor innsamling av miljø-DNA fra vannprøver for hhv. småkreps og bunndyr. Inntil videre er anbefalingen imidlertid at man fortsetter med konvensjonelle metoder som brukes i dag inntil ulike utfordringer knyttet til de DNA-baserte metodene er løst og disse metodenes anvendelighet er vurdert nøyere.

Thomas Correll Jensen, Norsk institutt for naturforskning, Songsveien 68, 0855 Oslo
E-post: thomas.jensen@nina.no

Hege Brandsegg, - Norsk institutt for naturforskning, Pb. 5685 Torgarden, 7485 Trondheim
E-post: hege.brandsegg@nina.no

Knut Andreas Eikland Bækkelie, Norsk institutt for naturforskning, Songsveien 68, 0855 Oslo
E-post: knut.bakkelie@nina.no

Marie Davey, - Norsk institutt for naturforskning, Pb. 5685 Torgarden, 7485 Trondheim,
E-post: marie.davey@nina.no

Frode Fossoy, Norsk institutt for naturforskning, Pb. 5685 Torgarden, 7485 Trondheim
E-post: frode.fossoy@nina.no

Elina Lungrin, Norsk institutt for naturforskning, Songsveien 68, 0855 Oslo
E-post: elina.lungrin@nina.no

Markus Majaneva, Norsk institutt for naturforskning, Pb. 5685 Torgarden, 7485 Trondheim
E-post: markus.majaneva@nina.no

Ann Kristin Schartau, , Norsk institutt for naturforskning, Songsveien 68, 0855 Oslo
E-post: ann.schartau@nina.no

Gaute Velle, NORCE LFI, Nygårdsgaten 112, 5008 Bergen
E-post: gvel@norceresearch.no

Bjørn Walseng, Norsk institutt for naturforskning, Songsveien 68, 0855 Oslo
E-post: bjorn.walseng@nina.no

Innhold

Sammendrag	3
Innhold	5
Forord	6
1 Innledning	7
2 Metoder	9
2.1 Prøvetaking.....	9
2.2 Konvensjonelle bestemmelsesmetoder.....	12
2.3 DNA-baserte bestemmelsesmetoder.....	13
2.3.1 Ekstraksjon av DNA.....	13
2.3.2 Oppsett av bibliotek.....	13
2.3.3 Bioinformatiske analyser.....	14
2.4 Dataprosessering og statistiske analyser.....	15
3 Resultater	17
3.1 DNA-baserte metoder.....	17
3.1.1 DNA i Bulkprøvene.....	17
3.1.2 DNA i EtOH-prøvene.....	18
3.1.3 DNA i Vannprøvene.....	18
3.2 Sammenligning av konvensjonelle og DNA-baserte metoder.....	19
3.2.1 Småkreps.....	19
3.2.2 Bunndyr.....	25
4 Diskusjon	30
4.1 DNA-baserte metoder - markører og prøvetyper.....	30
4.2 Konvensjonelle vs. DNA-baserte metoder.....	30
4.3 Økologisk tilstand basert på ulike metoder.....	35
4.4 Konklusjon og anbefalinger.....	36
5 Referanser	38

Forord

Norsk institutt for naturforskning (NINA) har gjennomført en undersøkelse av DNA-baserte metoder for kartlegging av småkreps og bunndyr i overvåkingssammenheng som et pilotstudium. Arbeidet er finansiert med tilskudd fra Miljødirektoratet, men NINA har også selv bidratt med ressurser. Prosjektet kunne gjennomføres til en relativt lav kostnad da prøvetakingen har vært samkjørt med feltarbeidet på delprogram Øst av overvåkingssammenheng ØKOFERSK. Dessuten er resultatene fra konvensjonelle prøver for småkreps og bunndyr fra overvåkingssammenhengmet brukt i undersøkelsen. NINA har stått for gjennomføring av feltarbeidet, opparbeiding av småkrepsprøvene og bunndyrprøver fra en av de undersøkte innsjøene (Østre Bjonevatnet), mens NORCE har tatt bunndyrprøvene fra de tre andre innsjøene der bunndyrfaunaen er undersøkt. De genetiske analysene er gjennomført på NINAs genetikklab i Trondheim. Vi vil gjerne få takke Ruth Halldis Rustad og Knut Rustad for lån av båt i Atnsjøen, Thoralf Grøtting for lån av båt og hjelp til feltarbeid i Stortjønna, Ole Kristian Sørli for lån av båt i Østre Bjonevatnet, Norsk institutt for vannforskning for lån av båt i Langtjern. Alle bidragsytere samt Miljødirektoratets kontaktperson Steinar Sandøy takkes for godt samarbeid.

Oslo, november 2021

Thomas Correll Jensen

1 Innledning

I forbindelse med gjennomføringen av vannforskriften i Norge er det et behov for å utvikle effektiv overvåkingsmetodikk. Dette inkluderer et behov for å vurdere ny teknologi for å sikre effektiv og tilfredsstillende innsamling av informasjon om de biologiske kvalitetselementene som inngår i klassifiseringssystemene for vannforekomstene (Miljødirektoratet 2016). DNA-baserte metoder er en ny familie av metoder for overvåking og kartlegging av biologiske organismegrupper, og metodene har et stort potensial for anvendelse i ferskvann. Nyere studier viser at metodikkene er sammenlignbare med konvensjonelle metoder som anvendes i tilknytning til vanddirektivet (Elbrecht mfl. 2017). Metodene har gjennomgått en rask utvikling, men fokuset har vært på bunndyr og elver. Det har vært forholdsvis lite fokus på bruk av DNA-baserte metoder i innsjøer. F.eks. har miljø-DNA erstattet konvensjonelle overvåkingsmetoder i forbindelse med overvåkingen av krepsepest i Norge (Johnsen mfl. 2020). Det er imidlertid fremdeles langt igjen før DNA-baserte metoder vil kunne anvendes i overvåking som omfatter artsrike organismegrupper (Thomsen og Willerslev 2015, Deiner mfl. 2017).

Småkreps og bunndyr inngår som to av organismegruppene/kvalitetselementene (KE-er) i den nasjonale overvåkingen av innsjøer i Norge (Veileder 02:2018, Klassifisering av miljøtilstand i vann, Direktoratgruppen for vanddirektivet). Disse KE-ene er velegnet til bruk i forbindelse med overvåking/tilstandsvurdering av ferskvann, da de er representert i de fleste vannforekomster og kan samles inn til en lav kostnad. I tillegg er det vist at de er følsomme for ulike typer av påvirkninger, som for eksempel forsuring og eutrofiering. Datagrunnlaget for begge grupper er dessuten godt mht. geografisk dekning i Norge.

DNA-basert identifisering kan i hovedsak gjøres på to ulike måter: Enten ved å ekstrahere DNA fra organismene i en bulkprøve¹, eller ved å ekstrahere DNA fra miljøet (livsmediet) organismene lever i. Førstnevnte benytter seg av tradisjonell prøvetakingsmetodikk, mens ekstraksjon av miljø-DNA skjer ved filtrering av vann eller ekstraksjon av DNA fra sediment. Etter ekstraksjon kan DNA fra vannprøver og bulkprøver brukes til å identifisere enkeltarter (med artsspesifikke primere og DNA-strekkoding) eller hele samfunn (med artsgenerelle primere og DNA-metastrekkoding). DNA-metastrekkoding gjøres ved å sammenligne DNA-sekvensene i prøven med et referansebibliotek. Referansebiblioteket består av DNA sekvenser fra individer som er identifisert av taksonomiske eksperter og er kvalitetssikret, for eksempel ved å bruke Barcode of Life Data Systems (BOLD, Ratnasingham og Hebert 2007).

¹ For eksempel en komplett prøve tatt med planktonhåv eller bunndyrhåv.

Miljø-DNA er spor av arvestoff (DNA) hentet fra miljøprøver uten noen åpenbare tegn på biologisk kildemateriale (Thomsen og Willerslev 2015). Miljø-DNA er altså alt DNA vi kan finne i en spesifikk miljøprøve. DNA i miljøet kan stamme fra hud- og hårceller, spytt og avføring o.l. fra levende eller nylig døde organismer (Pietramellara mfl. 2009). Miljø-DNA representerer derfor ideelt sett alle arter i et gitt økosystem. I praksis er imidlertid tilstedeværelse av DNA i miljøprøven avhengig av kroppsstørrelsen til organismen, morfologi, aktivitetsnivå og habitatvalg for de ulike artene (Taberlet mfl. 2018). Tilstedeværelse av miljø-DNA kan også variere over tid i en gitt lokalitet, selv om det biologiske samfunnet er uendret. Det er fordi nedbrytingen av DNA ikke er konstant og påvirkes av miljøforholdene, og spesielt temperatur og næringsinnhold (Eichmiller mfl. 2016).

Innsamling av enkle vannprøver og analyser basert på miljø-DNA har vist seg å gi større sannsynlighet for å finne sjeldne arter enn konvensjonelle metoder (Thomsen mfl. 2012; Biggs mfl. 2015; Valentini mfl. 2016). Miljø-DNA kan derfor være velegnet for å registrere arter som forekommer i lave tettheter. Både med tanke på å kartlegge rødlistede- og fremmede arter vil dette derfor kunne være en nyttig metode. I tillegg kan miljø-DNA også benyttes til å kartlegge hele eller deler av et artssamfunn, noe som allerede har vært brukt med godt resultat for planteplankton (Vuorio mfl. 2020). Men miljø-DNA er ikke alltid like godt egnet til å påvise flercellede arter i ferskvann, og derfor kan DNA-metastrekkoding av såkalte bulkprøver være den beste og samtidig mest kostnadseffektive metoden for bestemmelse av artsgrupper, som for eksempel bunndyr (Hajibabaei mfl. 2019).

Formålet med denne pilotstudien var å teste ut DNA-baserte metoder (DNA-metastrekkoding) til kartlegging av småkreps og bunndyr i innsjøer i overvåkingssammenheng. Vi ønsket å sammenligne DNA-metastrekkoding med tradisjonell innsamlings- og bestemmelsesmetodikk i et utvalg av norske innsjøer tilhørende ulike vanntyper og med ulike påvirkninger.

2 Metoder

2.1 Prøvetaking

Denne undersøkelsen inkluderer data fra seks innsjøer (figur 2.1). Alle innsjøene er med i delprogram Øst av overvåkingsprogrammet ØKOFERSK (Schartau mfl. 2021). Innsjøene Atnsjøen, Østre Bjonevatnet, Rondvatnet og Stortjønna er forholdsvis lite påvirket av menneskelig aktivitet (god økologisk tilstand i 2020), mens både Breidtjern og Langtjern er påvirket av forurengning (moderat økologisk tilstand i 2020). Innsjøkarakteristika er gitt i tabell 2.1, og hver innsjø er presentert med bilder i figur 2.1.

Tabell 2.1 Innsjøer som inngår i undersøkelsen. Data i tabellen er hentet fra Schartau mfl. (2021, tabell 1 s. 13).

Innsjø	Vannfore-komst-ID (NVE nr)	Kommune	Fylke	Vanntype (Vann-Nett) ¹	Vanntype beskrivelse	h.o.h. (m)	Innsjøareal (km ²)	maks-dyp (m)	Kalsium (mg Ca/L)	Alkalitet (mekv/L)	Farge (mg Pt/L)	TOC (mg/L)
Atnsjøen	002-126-L	Stor Elvdal/Sør-Fron	Innlandet (Hedmark/Oppland)	LEM31113 LEM32413	Skog, svært kalkfattig, svært klar, dyp	701	5.1	80	0.75	0.044	9.87	1.57
Breidtjern	001-3555-L	Aremark	Viken (Østfold)	-	Lavland, svært kalkfattig, humøs, grunn	190	0.30	32.4	0.51	0.013	37.78	8.58
Langtjern	012-3125-R	Flå	Viken (Buskerud)	-	Skog, svært kalkfattig, humøs, grunn	516	0.22	12	0.81	0.005	-	10.39
Østre Bjonevatnet	012-605-L	Gran	Innlandet (Oppland)	LEM22212	Skog, kalkfattig, humøs, grunn	204	2.3	≈40	1.97	0.075	47.31	7.25
Rondvatnet	002-231-L	Sel	Innlandet (Oppland)	LEH21113 LEH21413	Fjell, svært kalkfattig, svært klar, dyp	1167	1.0	55	0.26	0.013	4.63	0.40
Stortjønna	002-32130-L	Alvdal	Innlandet (Hedmark)	LEM18112 LEH18412	Fjell, svært kalkfattig, svært klar, grunn	868	0.26	15	0.77	0.046	10.67	2.07

I fire av innsjøene (Atnsjøen, Breidtjern, Langtjern og Østre Bjonevatnet) ble det ved ett besøk (tabell 2.2) i 2020 tatt prøver av både småkreps og bunndyr i tillegg til filtrerte vannprøver (se under for detaljer). I Rondvatnet og Stortjønna ble det ikke tatt prøver av bunndyr. Resultatene fra de DNA-baserte metodene er presentert i avsnitt 3.1 under og baserer seg på prøver fra alle seks innsjøer. Sammenligningen av konvensjonelle og DNA-baserte metoder presentert i avsnitt 3.2 under er basert på data fra Atnsjøen, Breidtjern, Langtjern og Østre Bjonevatnet, der det er data for begge organismegrupper og alle prøvetyper.

a)

b)



c)



d)



e)



f)



Figur 2.1 Innsjøene som inngår i denne undersøkelsen: Atnsjøen (a), Breidtjern (b), Langtjern (c), Østre Bjonevatnet (d), Rondvatnet (e), Stortjønna (f). Foto: Thomas Correll Jensen, NINA.

Prøver av litorale og pelagiske småkreps ble tatt med en planktonhåv (maskevidde 90 µm) etter prosedyre beskrevet i NS-EN 15110 og klassifiseringsveilederen (Veileder 02:2018) (figur 2.2). I strandsonen (litoralen) ble prøvene tatt som to horisontale trekk i ulikt substrat dersom mulig. I de åpne vannmasser (pelagialen) ble vertikale håvtrekk tatt over innsjøens dypeste punkt; fra en halv meter over bunnen og opp til overflaten. Det ble alltid tatt tre prøver; en ble fiksert med lugol

for senere opparbeiding ved hjelp av stereolupe (konvensjonelle prøver, heretter benevnt «morfologi» eller «konvensjonell prøve»), to ble fiksert med 96 % etanol til en sluttkonsentrasjon > 70 % for senere DNA-ekstraksjon på lab (heretter benevnt «bulk» eller bulkprøve).

Tabell 2.2 Innsamlingstidspunkt i 2020 for småkreps og bunndyr i de undersøkte innsjøene

Innsjø	Småkreps	Bunndyr
Atnsjøen	17. august	5. oktober
Breidtjern	10. september	10. september
Langtjern	8. september	8. september
Østre Bjonevatnet	13. august	13. oktober
Rondvatnet*	1. september	-
Stortjønna*	3. september	-

*I Rondvatnet og Stortjønna ble det bare tatt litorale småkrepsprøver

For innsamling av bunndyr ble sparkemetoden (kvalitativ) benyttet i henhold til norsk standard (NS-ENISO10870) og klassifiseringsveilederen (Veileder 02:2018) (figur 2.2). Prøvene ble tatt med håndholdt håv (maskevidde 500 µm) og det ble sparket tre minutter per prøve. Det ble tatt tre prøver i litoralsonen og tre i utløpselven/-bekken fra innsjøen. Etter at mesteparten av vannet var fjernet ble alle prøvene konservert med 96 % etanol (sluttkonsentrasjon > 70 %). En av prøvene ble opparbeidet ved hjelp av stereolupe på lab (konvensjonelle prøver, heretter benevnt «morfologi» eller «konvensjonell prøve»), de to andre ble brukt for senere DNA-ekstraksjon på lab (heretter benevnt «EtOH» eller «etanolprøve»).

a)



b)



Figur 2.2 Prøvetaking av småkreps i litoralsonen (a) og i utløpselv (b) fra en innsjø. Foto: Knut Andreas Eikland Bækkeli, NINA.

For de prøvene som skulle brukes til DNA-ekstraksjon ble etanolen forsiktig byttet ut samme kveld som prøvene var tatt for å sikre tilstrekkelig høy etanolkonsentrasjon.

I tillegg til småkrepsprøver og bunndyrprøver tatt med håv ble det også filtrert vannprøver (med miljø-DNA) for senere DNA-ekstraksjon på lab (heretter benevnt «vann» eller «vannprøve»). Vannprøvene ble tatt som blandprøver fra rett under overflaten. Hver vannprøve ble så filtrert igjennom et NatureMetrics GF 5.0/PES 0.8 µm-filtrer ved hjelp av en batteridrevet peristaltisk pumpe (Bürkle Vampire) (figur 2.3). Filtrene ble lagret i ATL-buffer (Qiagen) frem til videre analyser i lab. Det ble alltid tatt to paralleller, og det ble filtrert mellom 2 til 4 liter per prøve.



Figur 2.3 Filtrering av eDNA-prøve. Foto: Juliet Landrø, NINA.

2.2 Konvensjonelle bestemmelsesmetoder

Alle småkreps (Cladocera, Calanoida og Cyclopoida), med unntak av små stadier av hoppekreps (copepoditter og nauplier), er bestemt til art. Anvendt bestemmelseslitteratur er gitt i Solheim mfl. (2018 og 2019). Prøver med mange individer (anslagsvis > 200 ind.) er fraksjonert (subsamlet) før artsbestemmelse, men hele prøven er gjennomgått for registrering av arter med få individer i prøven.

Bunndyrprøvene ble også subsamlet, mens hele prøven ble gjennomgått for registrering av arter med få individer i prøven. Bunndyrartene er identifisert etter standard bestemmelseslitteratur og taksonomisk oppløsning gitt i Petrin mfl. (2016).

2.3 DNA-baserte bestemmelsesmetoder

2.3.1 Ekstraksjon av DNA

Vi ekstraherte DNA fra tre ulike prøvetyper:

- 1) Miljø-DNA fra vann filtrert på NatureMetrics GF 5.0/PES 0.8 µm-filter, heretter kalt «vann»
- 2) Bulkprøver av småkreps (bulkprøver)
- 3) Filtrert etanol fra bunndyr bulkprøver (etanolprøver)

Vannprøvene ble inkubert over natten med 2000 µl buffer ATL (Qiagen) og 130 µL proteinase K (1:10 fortyning, Qiagen). DNA ekstraksjonen ble gjort med Nucleospin Plant II Midi-kit uten forfilter og med 1000 µL buffer AL (Qiagen) og 1000 µL EtOH. Det ble brukt 1000 µL vaskebuffer AW1 (Qiagen) og 3000 µl vaskebuffer AW2 (Qiagen). DNA ble re-eluert i 200 µl av buffer AE (Qiagen).

I den andre ekstraksjonen (bulk), ble hele småkrepsprøver overført til 50 ml Matrix D rør (MP Biomedicals). Prøvene ble tørket i varmeskap, og ristet på FastSPIN ved 4.0 i 20 sek. Prøvene ble så inkubert over natten med 4500 µl buffer ATL og 500 µl proteinase-K. Prøvene ble deretter overført til forfilterkolonne og videre protokoll var den samme som for vannprøvene, men DNA ble re-eluert i 300 µl av buffer AE.

DNA fra EtOH-prøvene ble ekstrahert ved at sprit fra sparkeprøvene først ble filtrert gjennom 500 µm filterduk, deretter gjennom 2.0 µm glassfiberfilter (Merck Millipore), før DNA ble isolert på samme måte som vannprøvene.

2.3.2 Oppsett av bibliotek

Vi brukte en universell eukaryot-markør for det mitokondrielle genet COI, BF3BR2 (Elbrecht og Leese 2017, Elbrecht mfl. 2019). Siden denne markøren ikke er så velegnet til å amplifisere en del vanlige arter av calanoide hoppekreps (Calanoida) modifiserte vi den slik at markøren ble mer universell (Tabell 2.3). Denne modBF3BR2-markøren ble bare brukt for å amplifisere bulkprøver av småkreps. De to genetiske markørene ble amplifisert i en standard to-trinns Illumina-protokoll. En første PCR inkluderte primere med «overhang adaptor»-sekvenser, etterfulgt av en andre PCR for å tilsette Illumina-indekser. PCR-produktene ble kvalitetssjekket på en Tape Station (Agilent 4200) og renses med magnetiske kuler (MAG-BIND RXN PURE PLUS) etter hver

PCR. Til slutt ble prøvene normalisert til samme mengde DNA og slått sammen til et bibliotek for sekvensering. Markørene ble sekvensert på en Illumina NovaSeq-maskin ved Norwegian Sequencing Centre i Oslo.

Tabell 2.3 Primere som ble brukt for å amplifisere vann-, EtOH (BF3BR2), og bulk (modBF3BR2) prøver. Modifiserte baser er skrevet med fet skrift.

Markør	Fram-over	Sekvens	Referanse	Revers	Sekvens	Referanse
BF3BR2	BF3	CCHGAYATRGCH TTYCCHCG	Elbrecht mfl 2019	BR2	TCDGGRTGNCCR AARAYCA	Elbrecht og Leese 2017
modBF3BR2	modBF3	SC NGAYATRG CN TTY CN CG	Denne studie	modBR2	TC NGGRTGNCCR AARAYCA	Denne studie

2.3.3 Bioinformatiske analyser

Sekvenseringsresultatene ble analysert i programmet dada2 (Callahan mfl. 2016) for å generere Amplicon Sequence Variants (ASV-er). Ved å bruke ASV-er kontrollerer man for usikkerheten i DNA-sekvensen for hver analyse (både innen og mellom sekvenseringsmaskiner) og genererer derfor biologisk meningsfulle DNA-sekvenser (genotyper) med færre amplifiserings- og sekvenseringsfeil (Callahan mfl. 2017). Flere studier har vist at denne tilnærmingen reduserer antall grupper/arter («operational taxonomic units» (OTUs) eller ASV-er) og ikke minst reduserer risikoen for falske genotyper og dermed feilaktig påvisning av arter som ikke finnes i prøven (Caruso mfl. 2019). For å tilegne hver ASV til et taksonomisk nivå benyttet vi RDP-Classifiser (Wang mfl. 2007) og to «trenede referansedatabaser». Den første referansedatabasen er satt sammen av nesten en million COI-sekvenser fra artropoder og chordater (Porter og Hajibabaei 2018). Databasen ble opprinnelig utviklet med fokus på Nord-Amerika, men man har i 2020 gått gjennom norsk navneliste i Artsdatabanken og inkludert strekkoder for 4061 norske arter (Åström mfl. 2020). For småkreps har vi laget en egen referansedatabase ved at vi tok alle offentlig tilgjengelige småkreps-sekvenser fra BOLD som ble vurdert å være gode nok, og la dem til et utvalg av sekvenser fra den første referansedatabasen (alle ikke-Insecta sekvensene + 50 000 tilfeldig valgt Insecta sekvenser). For å sikre resultater fra RDP-Classifiser, tok vi alle arter som ble klassifisert som Metazoa og identifiserte den mest frekvente sekvensen innenfor hvert artsnavn ved hjelp av BOLD sitt identifikasjonssøk, som også inkluderer private sekvenser (ikke tilgjengelige). Hvis RDP-Classifiser og BOLD ga forskjellige artsnavn, brukte vi identiteten fra BOLD. Denne tilnærmingen forutsetter at sekvensene som er tilknyttet det samme artsnavnet i RDP-Classifiser resultatene, stammer fra en og samme art, til tross for at arten mangler i referansebiblioteket. Dette er kanskje ikke sant i noen tilfeller der sekvenslikhet med en sekvens i referansebiblioteket er lav (som vi ser i resultatene for den calanoide hoppekrepsen *Eudiatomus gracilis*). Vi inkluderte bare taksa som ble identifisert til arts-, slekt- eller familienivå.

2.4 Dataprosessering og statistiske analyser

Til sammenligningen av resultater fra konvensjonelle og DNA-baserte metoder har vi brukt den navnsetting som brukes for henholdsvis småkreps og bunndyr i de nasjonale overvåkingsprogrammene. Artsbestemmelse av småkreps skjer her, så sant mulig, til art i henhold til artsnavn registrert i Artsnavnebasen, mens det for bunndyr brukes standardisert taksonomisk oppløsning i henhold til Petrin mfl. (2016). Taksalistene for de DNA-baserte metodene ble gjennomgått slik at disse også fulgte samme standard. For både småkreps og bunndyr ble i tillegg resultatene fra de DNA-baserte metodene sjekket mot den kjente norske faunaen for de to gruppene basert på artskart og ekspertvurdering. Åpenbare feilbestemmelse av arter som ikke finnes i Norge ble fjernet. Taksalistene for småkreps inneholdt noen uspesifikke bestemmelser og disse ble fjernet før sammenligningen med de konvensjonelle prøvene.

Til sammenligningen av resultatene for småkreps og bunndyr beregnet vi ulike proksier for artsantall/diversitet. For småkreps inkluderte vi totalt antall arter av småkreps tilhørende gruppene vannlopper (Cladocera), calanoide hoppekreps (Calanoida) og cyclopoide hoppekreps (Cyclopoida), samt antall arter av hver av disse tre grupper. For bunndyr brukte vi antall arter av døgnfluer (Ephemeroptera), steinfluer (Plecoptera), vårfluer (Trichoptera), antall EPT-taksa i tillegg til totalt antall bunndyrtaksa.

Økologisk tilstandsklassifisering i henhold til vannforskriften baserer seg på ulike indekser for de forskjellige biologiske kvalitetselementene. For å undersøke om variasjon i taksonomisk deteksjonsevne mellom de ulike metodene påvirker indeksverdiene og dermed økologisk tilstand, beregnet vi utvalgte indekser for småkreps og bunndyr for taksalister fra de ulike metodene. For småkreps inkluderte vi indeksen LACI-1 som er utviklet for tilstandsklassifisering av innsjøer i forhold til forurening, og som er inkludert i det norske klassifiseringssystemet (Veileder 02:2018). Indeksen baserer seg på tilstedeværelse av indikatorarter med ulik toleranse for forurening. LACI-1 er utviklet for svært kalkfattige, klare innsjøer. Poenget her er ikke å gjennomføre en tilstandsklassifisering av innsjøene, men å vise hvordan mulig variasjon i taksonomisk bestemmelse grunnet ulike metoder vil påvirke tilstandsklassifiseringen. LACI-1 er utviklet for svært kalkfattige, klare innsjøer. Indeksen er regnet ut for alle tre prøvetyper (morfologiprøver, bulkprøver og vannprøver). Klassegrensene for indeksen er brukt til å illustrere i hvilken utstrekning mulig variasjon i taksonomisk bestemmelse påvirker tilstandsklassifiseringen. For bunndyr regnet vi ut ASPT-indeksen (Average Score per Taxon). Den brukes til å måle effekter av eutrofiering og organisk belastning i norske vassdrag. Denne indeksen er forholdsvis grov og bruker taksa på et høyere taksonomisk nivå. ASPT-indeksen er utviklet for rennende vann, og brukes således ikke

vanligvis for tilstandsklassifisering av innsjøer. Vi har likevel valgt å bruke den her for å undersøke mulig effekt av taksonomisk bestemmelse på indeksverdiene.

Resultatene for de ulike proksiene for artsantall nevnt over ble analysert med generaliserte mikrosede lineære modeller (GLMM) med Poisson-fordeling som link-funksjon. Forklaringsvariablene metode (morfologiprøver, bulkprøver og vannprøver) og stasjon (pelagisk og litoral for småkreps, utløp og litoral for bunndyr) ble lagt til som fikserte variabler og innsjø (Atnsjøen, Breittjern, Langtjern og Østre Bjonevatnet) som tilfeldig variabel.

Graden av overensstemmelse i identifisering av småkreps- og bunndyrtaksa ved sammenligning av metoder ble også fremstilt grafisk som vennediagrammer (VENNY 2.1, Oliveros, 2007).

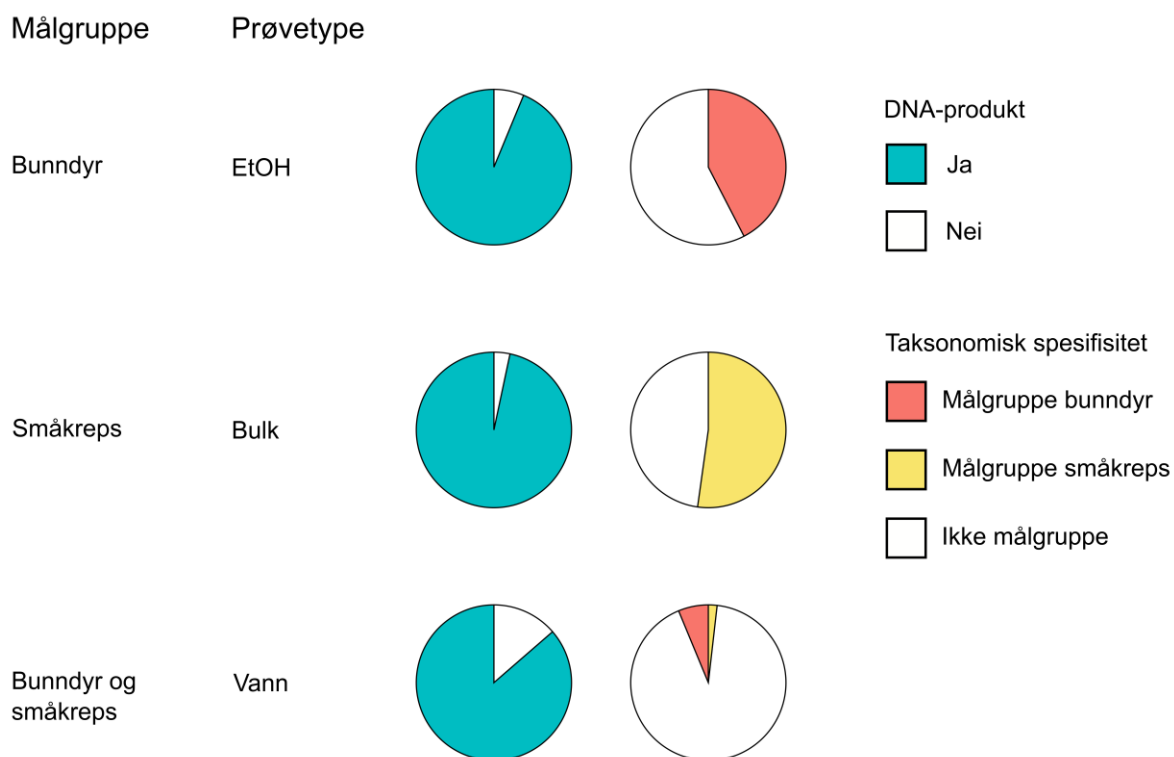
Småkreps- og bunndyrtaksalistene for de ulike metodene ble sammenlignet i en ordinasjonsanalyse kalt Non-metric multidimensional scaling (NMDS) utført i programmet CANOCO (ter Braak og Šmilauer 2012). NMDS arrangerer artslistene slik at de med lik artssammensetning blir liggende nær hverandre når resultatet plottes i et diagram, mens artslistene med ulik artssammensetning blir liggende lengre fra hverandre.

Resultatene for de ulike proksiene for artsantall baserer seg på data for alle prøver. Utrekning av indekser og sammenligning av artssammensetning baserer seg på taksalister akkumulert for de ulike stasjoner i hver innsjø (pelagisk og litoral for småkreps, utløp og litoral for bunndyr) for hver metode. For hver metode er det bare tatt én konvensjonell prøve fra hver stasjon, mens det ble tatt to paralleller for DNA-baserte metoder (se tidligere beskrivelse). For å få samme prøvesamlingsinnsats som for konvensjonelle prøver ble kun den ene av de to parallellene brukt (valgt ut tilfeldig).

3 Resultater

3.1 DNA-baserte metoder

Markørene som ble brukt for å amplifiserte DNA-sekvenser av småkreps og bunndyr ga høy såkalt amplifikasjonssuksess (figur 3.1), det vil si at markørene ga gode DNA-produkter som vi kunne analysere. Det var kun én av de 30 småkrepsprøvene, og én av de 16 bunndyrprøvene som ikke kunne amplifiseres. Når det gjaldt spesifisitet var det ca. 52% i bulkprøvene som tilhørte målgruppen (småkreps), ca. 42 % av sekvensene i etanolprøvene (Arthropoda, Annelida og Mollusca), og ca. 8 % i vannprøvene (ca. 2 % fra småkreps og ca. 6 % fra bunndyr). At en liten andel av det totale DNA-et i vannprøvene kommer fra målgruppene man ønsker å studere er en generell utfordring ved miljøprøver, siden sopp, alger og bakterier ofte utgjør en stor andel av det isolerte DNAet. Også i bulk- og EtOH-prøvene utgjør disse gruppene en stor andel (50-60 %).



Figur 3.1 Oversikt over amplifikasjonssuksess (DNA-produkt) og taksonomisk spesifisitet basert på prøver fra alle de undersøkte innsjøene.

3.1.1 DNA i Bulkprøvene

Totalt ble det påvist 26 arter av calanoide og cyclopoide (Calanoida og Cyclopoida) hoppekreps og 31 arter av vannlopper (Cladocera) i bulkprøvene. Av hoppekrepsene ble 58 % identifisert til art, mens 97 % av vannloppene ble identifisert til art. Vannloppen *Bosmina longispina* ble funnet

i 28 av 29 prøver, mens 45 % av alle arter ble oppdaget i bare 1-2 prøver. De nest mest vanligste artene ble funnet i 20 prøver (vannloppen *Acroperus harpae* og hoppekrepsene *Eudiaptomus gracilis*, *Acanthocyclops vernalis* og Cyclopidae sp. 1).

3.1.2 DNA i EtOH-prøvene

Totalt ble det påvist 235 taksa av insekter (Insecta), 35 leddormer (Annelida), 4 edderkopper (Araneae), 16 vannmidd (Hydrachnidia), 6 bløtdyr (Mollusca), 2 mosdyr (Bryozoa), 8 hydrozoer (Hydrozoa), 1 svamp (Porifera), samt edelkreps (*Astacus astacus*) i EtOH prøvene. Hele 86 % av totalmaterialet ble bestemt til art, mens resten ble identifisert til slekt eller familie (tabell 3.1). Rundormer (Nematoda) og flatormer (Platyhelminthes) ble påvist på arts-, slekt eller familienivå. I påfølgende tekst vil alle taksa for enkelhets skyld bli omtalt som arter. 69 % av alle arter ble oppdaget i bare 1-2 prøver, og bare to leddormer (*Nais communis* og *Vejdovskyella comata*) ble funnet i alle prøver som ble amplifisert.

3.1.3 DNA i Vannprøvene

Til tross for svært lav spesifisitet i vannprøvene ble det påvist 398 taksa av insekter (Insecta), 34 leddormer (Annelida), 2 edderkopper (Araneae), 14 vannmidd (Hydrachnidia), 2 bløtdyr (Mollusca), 2 mosdyr (Bryozoa), 3 hydrozoer (Hydrozoa), og 1 svamp (Porifera), 17 calanoide og cyclopoide (Calanoida og Cyclopoida) og 24 vannlopper (Cladocera). Mellom 50 og 100 % av alle taksa ble identifisert til art (88 % totalt), mens resten, med unntak av rundormer (Nematoda) og flatormer (Platyhelminthes), ble identifisert til slekt eller familie. 67 % av alle arter ble oppdaget i bare 1-2 prøver, og den vanligste arten døgnfluen *Leptophlebia vespertina* ble funnet i alle 29 prøver, mens vannloppene *Acroperus cf. harpae* og *Holopedium gibberum* ble funnet i 25 prøver.

Tabell 3.1 Taksonomisk identifisering av forskjellige arter i ulike prøvetyper. Data presentert baserer seg på prøver fra alle seks undersøkte innsjøer (Atnsjøen, Breidtjern, Langtjern, Østre Bjonevatnet, Stortjønna og Rondvatnet).

Taksonomisk gruppe	Til slekt eller familie	Til art	Sum antall
Bulkprøver			
Hoppekreps (Calanoida og Cyclopoida)	10	14	24
Vannlopper (Cladocera)	1	30	31
Totalt	11	44	55
EtOH-prøver			
Insekter (Insecta)	33	202	235
Leddormer (Annelida)	3	32	35
Edderkopper (Araneae)	0	4	4
Vannmidd (Hydrachnidia)	0	16	16
Bløtdyr (Mollusca)	2	4	6
Mosedyr (Bryozoa)	0	2	2
Hydrozoar (Hydrozoa)	6	2	8
Svamper (Porifera)	0	1	1
Større krepsdyr (Crustacea)	0	1	1
Totalt	44	264	308
Vannprøver			
Insekter (Insecta)	43	355	398
Leddormer (Annelida)	4	30	34
Edderkopper (Araneae)	0	2	2
Vannmidd (Hydrachnidia)	0	14	14
Bløtdyr (Mollusca)	1	1	2
Mosedyr (Bryozoa)	0	2	2
Hydrozoar (Hydrozoa)	1	2	3
Svamper (Porifera)	0	1	1
Større krepsdyr (Crustacea)	0	0	0
Hoppekreps (Calanoida og Cyclopoida)	4	13	17
Vannlopper (Cladocera)	3	21	24
Totalt	56	436	492

3.2 Sammenligning av konvensjonelle og DNA-baserte metoder

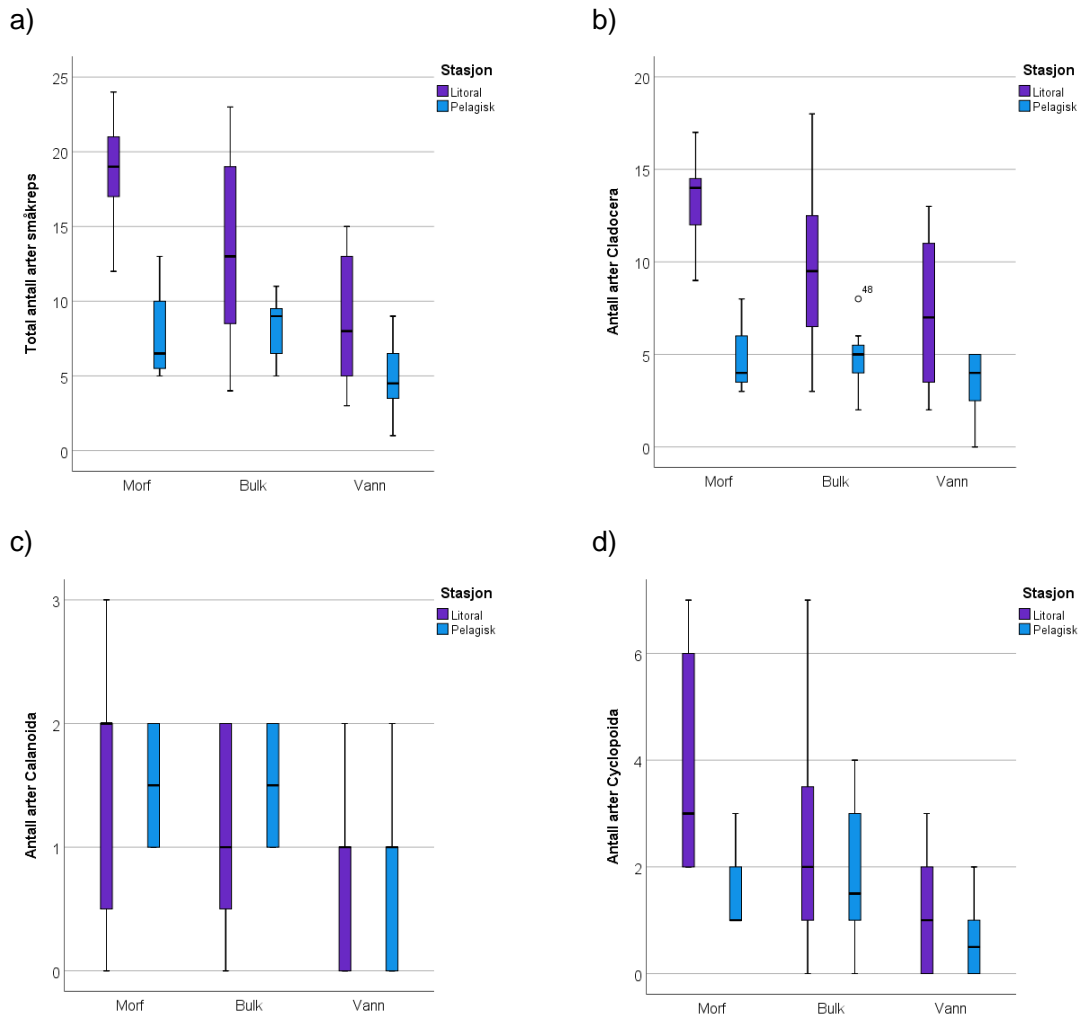
3.2.1 Småkreps

For totalt antall arter av småkreps, og spesielt for vannlopper, var det relativt store forskjeller mellom de tre bestemmelsesmetodene (morfologi, etanol og vann) i antall registrerte arter (figur 3.2). Både metode, (prøvetakings)stasjon, og interaksjonen mellom de to hadde signifikant effekt på de to parameterne (tabell 3.2). Det betyr at det var en markant forskjell mellom metoder for den ene type (prøvetakings)stasjon men ikke for den andre; forskjellene var større for litorale

prøver enn for pelagiske. Videre ble det funnet flest arter, både totalt antall og antall arter av vannlopper, i de konvensjonelle prøvene, og færrest i vannprøvene. For calanoide hoppekreps ble det funnet en signifikant effekt av metode; ved at det ble funnet flest arter i de konvensjonelle prøvene og bulkprøvene og færrest arter i vannprøvene (tabell 3.2, figur 3.2). For cyclopoide hoppekreps hadde både metode og stasjon signifikant effekt (tabell 3.2). I prøver tatt i litoralen ble det funnet flest arter i de konvensjonelle prøvene, og færrest i vannprøvene (figur 3.2). I prøver tatt i pelagialen ble det påvist flere arter i konvensjonelle prøver og bulkprøver, enn i vannprøver.

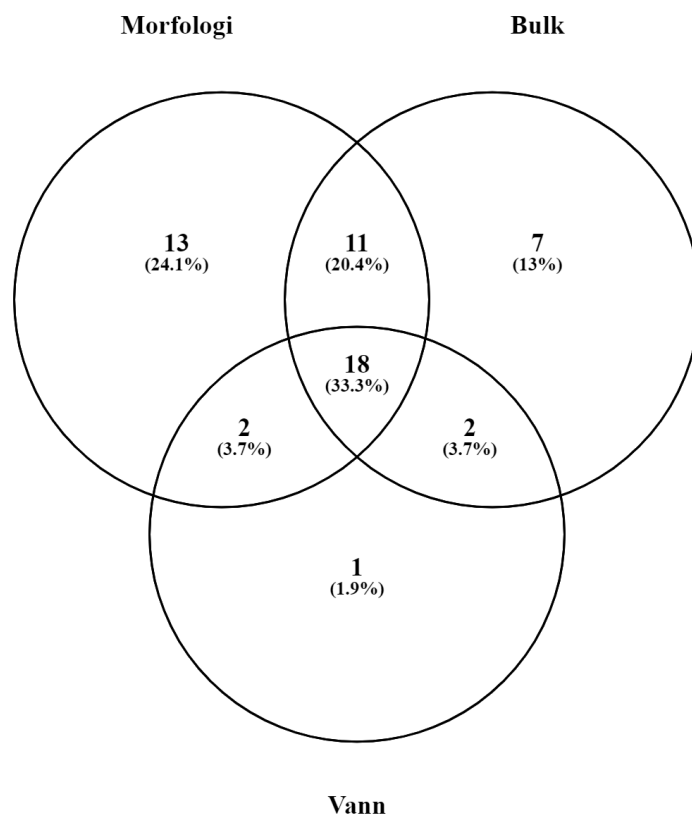
Tabell 3.2 Resultater av regresjonsanalysene av totalt antall arter småkreps, antall arter vannlopper (Cladocera), antall arter calanoide hoppekreps (Calanoida) og antall arter cyclopoide hoppekreps (Cyclopoida).

	Source	F	df1	df2	Sig.
Totalt antall arter småkreps	Korrigert modell	24.177	5	53	0.000
	Metode	34.363	2	53	0.000
	Stasjon	57.232	1	53	0.000
	Stasjon * Metode	9.684	2	53	0.000
Antall arter Cladocera	Korrigert modell	18.250	5	53	0.000
	Metode	17.193	2	53	0.000
	Stasjon	65.826	1	53	0.000
	Stasjon * Metode	10.122	2	53	0.000
Antall arter Calanoida	Korrigert modell	3.173	5	53	0.014
	Metode	6.229	2	53	0.004
	Stasjon	0.462	1	53	0.500
	Stasjon * Metode	0.049	2	53	0.952
Antall arter Cyclopoida	Korrigert modell	5.981	5	47	0.000
	Metode	11.415	2	47	0.000
	Stasjon	4.650	1	47	0.036
	Stasjon * Metode	1.581	2	47	0.216



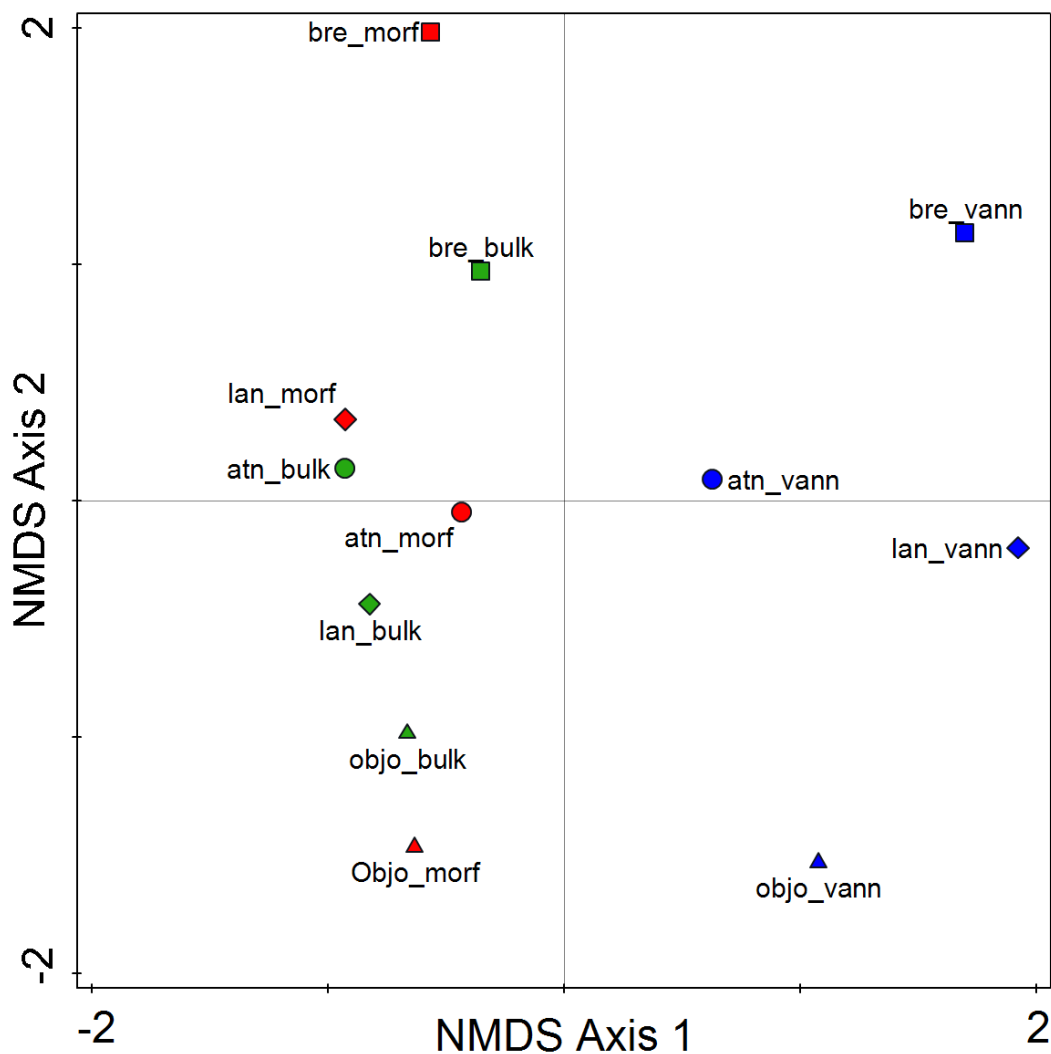
Figur 3.2 Bokplott av det totale antall arter småkreps (a), antall arter vannlopper (Cladocera)(b), antall arter calanoide hoppekreps (Calanoida) (c) og antall arter cyclopoide hoppekreps (Cyclopoida) (d) i prøvene fra Atnsjøen, Breidtjern, Langtjern og Østre Bjonevatnet bestemt med ulike metoder.

Sammenligningen av de ulike prøvetypene viser at det totalt sett ble funnet flest arter i konvensjonelle prøver (44) fulgt av bulkprøvene (38), og færrest arter i vannprøvene (23). Til sammen 18 arter var felles for alle metodene (figur 3.3). De konvensjonelle prøvene og bulkprøvene hadde 11 arter til felles. To arter var felles for bulkprøver og vannprøver, og det samme antall var felles for konvensjonelle prøver og vannprøver. 13 arter ble bare funnet i de konvensjonelle prøvene. Syv ble bare funnet i bulkprøvene, og en art ble bare funnet i vannprøvene.



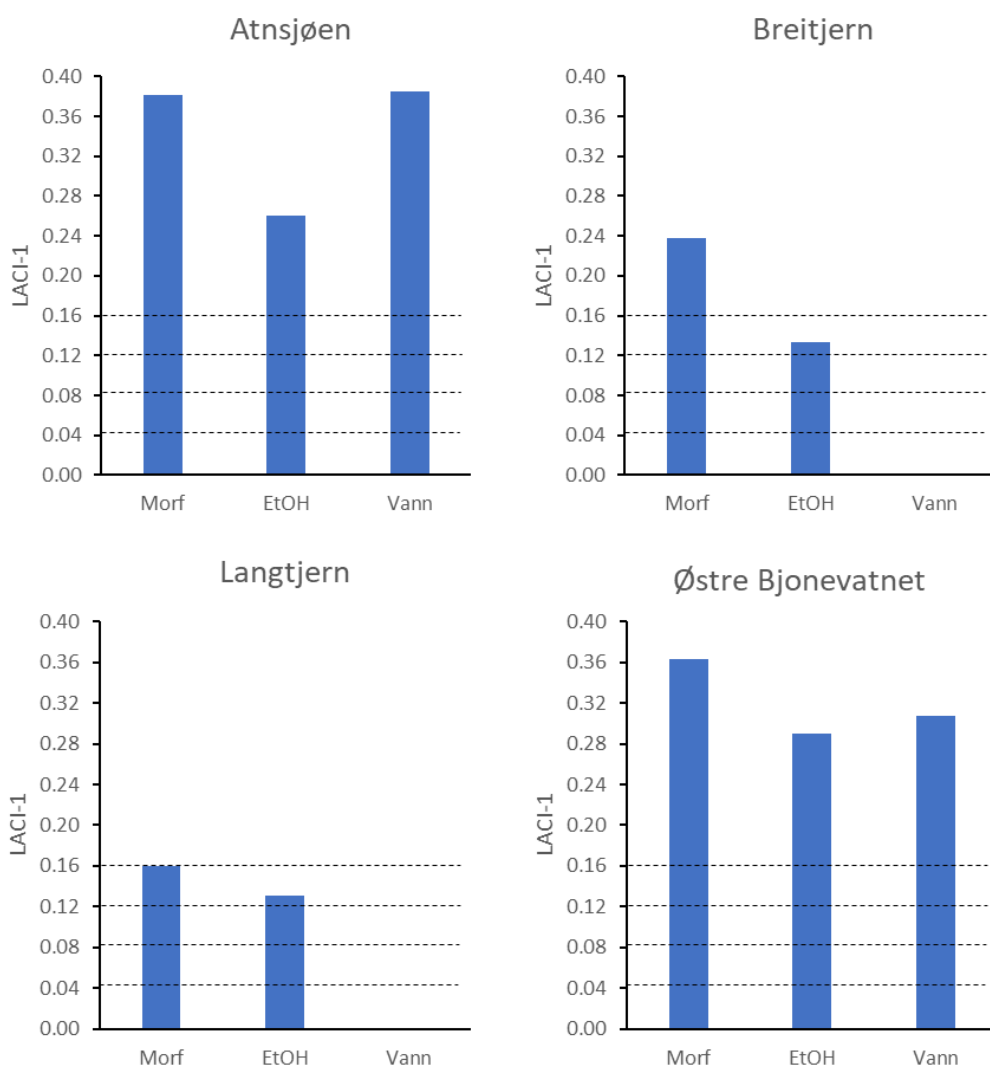
Figur 3.3 Venndiagram som viser antall småkrepsarter detektert ved bruk av de ulike metodene, angitt som felles for to eller tre metoder og spesifikt for den enkelte metode.

Artslistene basert på de ulike metodene ble sammenlignet i en NMDS-ordinasjon (figur 3.4). Førsteaksen forklarer størstedelen av variasjonen i artssammensetningen (43,7 %) og avspeiler de ulike prøvetypene som ligger til grunn. De konvensjonelle prøvene og bulkprøvene ligger til venstre på førsteaksen, mens vannprøvene plasserer seg i motsatt ende av aksene. Andreaksen bidrar til å forklare en mindre del av variasjonen (30,6 %), og ser ut til å avspeile lokalitet ved at Breidtjern og Østre Bjonevatnet legger seg i hver sin ende av aksene med Atnsjøen og Langtjern imellom.



Figur 3.4 NMDS sample-plott av artssammensetningen av småkreps i de tre prøvetypene i de undersøkte innsjøene (Atnsjøen = atn, Breidtjern = bre, Langtjern = lan, Østre Bjonevatnet = objo).

Artslistene generert med grunnlag i de ulike metodene ble brukt til utregning av forsuringsindeksen LACI-1 for de fire innsjøene. Forskjeller mellom metoder i artsbestemmelse av krepsdyr påvirket klassifiseringen av den enkelte innsjø (figur 3.5). I Breijtjern varierte økologisk tilstand med fire tilstandsklasser fra *svært god* basert på konvensjonelle prøver til *svært dårlig* basert på vannprøver. I Langtjern varierte økologisk tilstand med tre tilstandsklasser fra *god* basert på konvensjonelle prøver til *svært dårlig* basert på vannprøver. For Atnsjøen og Østre Bjonevatnet var økologisk tilstand basert på LACI-1 *svært god* for alle tre metoder. Det skyldes å gjøre oppmerksom på at klassegrensene for LACI-1 er satt for svært kalkfattige, klare og svært klare innsjøer med Ca-innhold >0,5 mg/l, og gjelder derfor ikke for noen av de fire innsjøene i denne undersøkelsen.



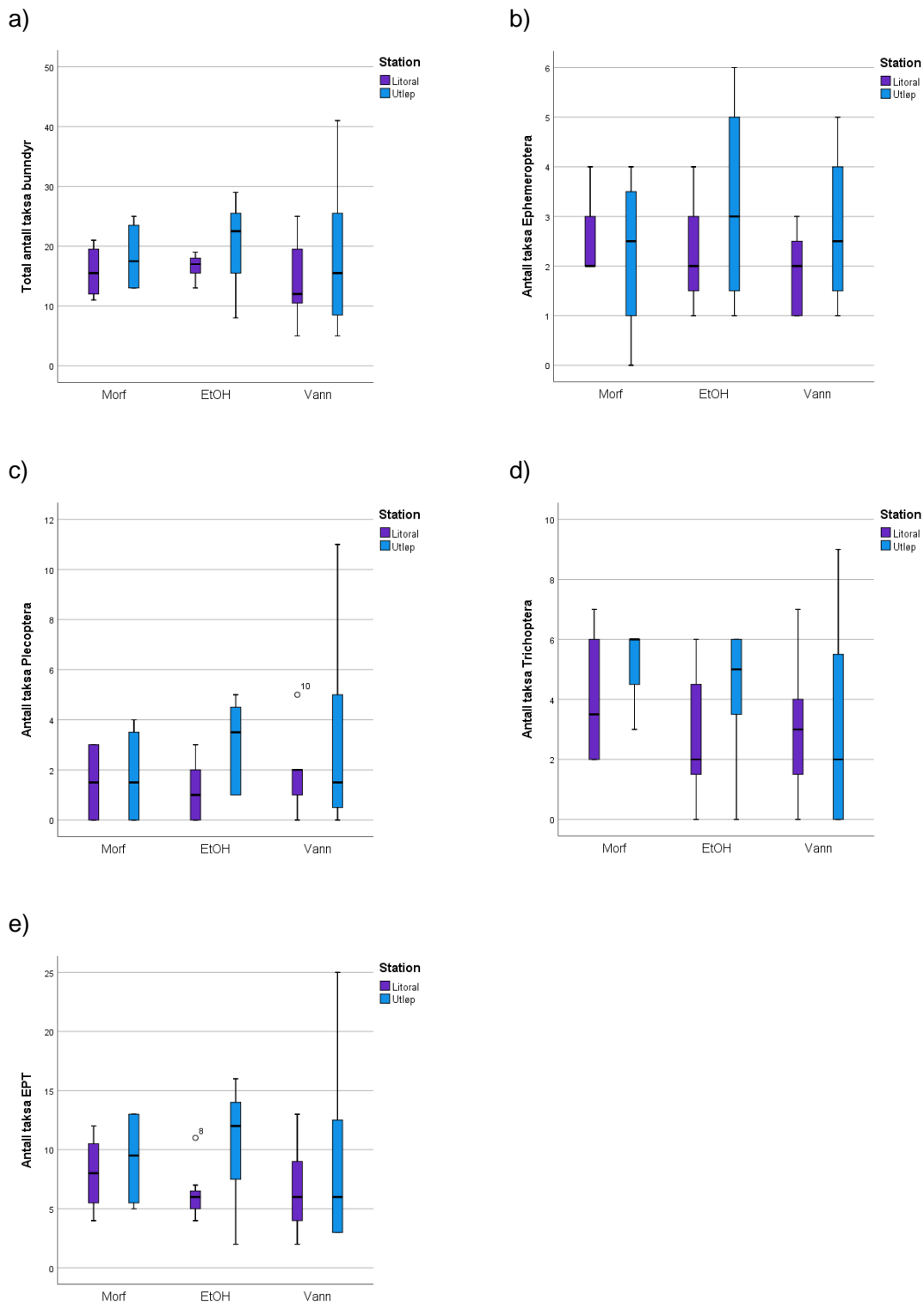
Figur 3.5 LACI-1 indeksen for forsurening i Atnsjøen, Breijtjern, Langtjern og Østre Bjonevatnet basert på de ulike metodene. De stiplede linjene angir klassegrensene fra *svært god* til *svært dårlig*.

3.2.2 Bunndyr

Det var ingen signifikante forskjeller mellom ulike metoder eller stasjoner, hverken for totalt antall bunndyrtaksa eller for antall døgnfluearter (Ephemeroptera) (figur 3.6, tabell 3.3). For steinfluer (Plecoptera) var det både signifikante forskjeller i antall arter mellom ulike metoder og stasjoner. Metode og interaksjonen mellom metode og stasjon hadde en signifikant effekt på antall vårfluearter (Trichoptera). Stasjon hadde en signifikant effekt på antall EPT-taksa (Ephemeroptera, Plecoptera og Trichoptera).

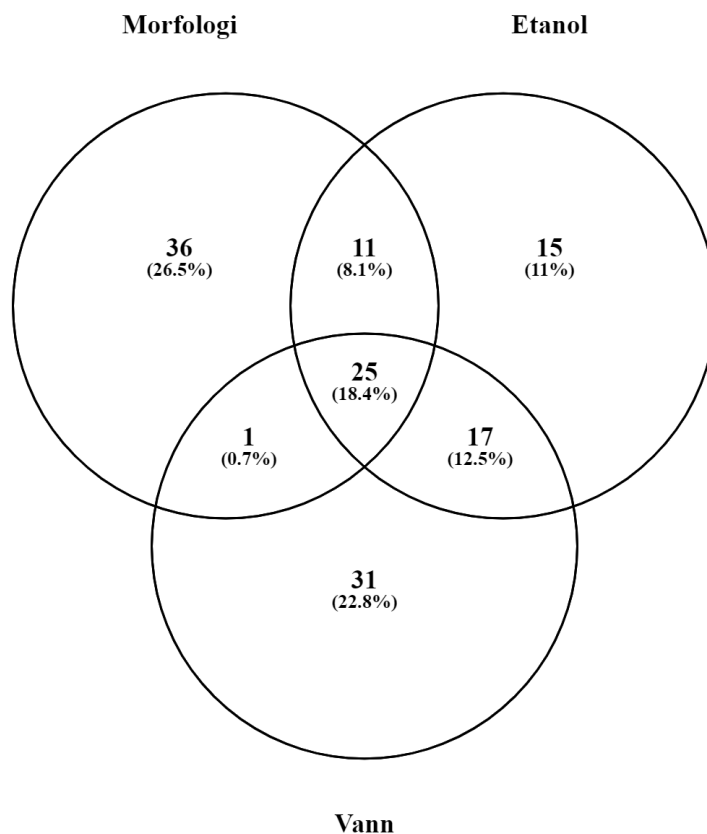
Tabell 3.3 Resultater av regresjonsanalyser av totalt antall bunndyrtaksa, døgnfluer (Ephemeroptera), steinfluer (Plecoptera), vårfluer (Trichoptera), og EPT samlet.

	Source	F	df1	df2	Sig.
Totalt antall taksa bunndyr	Korrigert modell	2.048	5	32	0.098
	Metode	2.419	2	32	0.105
	Stasjon	4.018	1	32	0.054
	Stasjon * Metode	0.148	2	32	0.863
Antall taksa av Ephemeroptera	Korrigert modell	0.562	5	32	0.728
	Metode	0.178	2	32	0.838
	Stasjon	0.025	1	32	0.875
	Stasjon * Metode	0.981	2	32	0.386
Antall taksa Plecoptera	Korrigert modell	3.400	5	26	0.017
	Metode	3.961	2	26	0.032
	Stasjon	6.319	1	26	0.018
	Stasjon * Metode	2.889	2	26	0.074
Antall taksa Trichoptera	Korrigert modell	4.858	5	32	0.002
	Metode	7.357	2	32	0.002
	Stasjon	3.331	1	32	0.077
	Stasjon * Metode	4.133	2	32	0.025
Antall taksa av EPT	Korrigert modell	2.183	5	32	0.081
	Metode	1.416	2	32	0.258
	Stasjon	4.667	1	32	0.038
	Stasjon * Metode	1.422	2	32	0.256



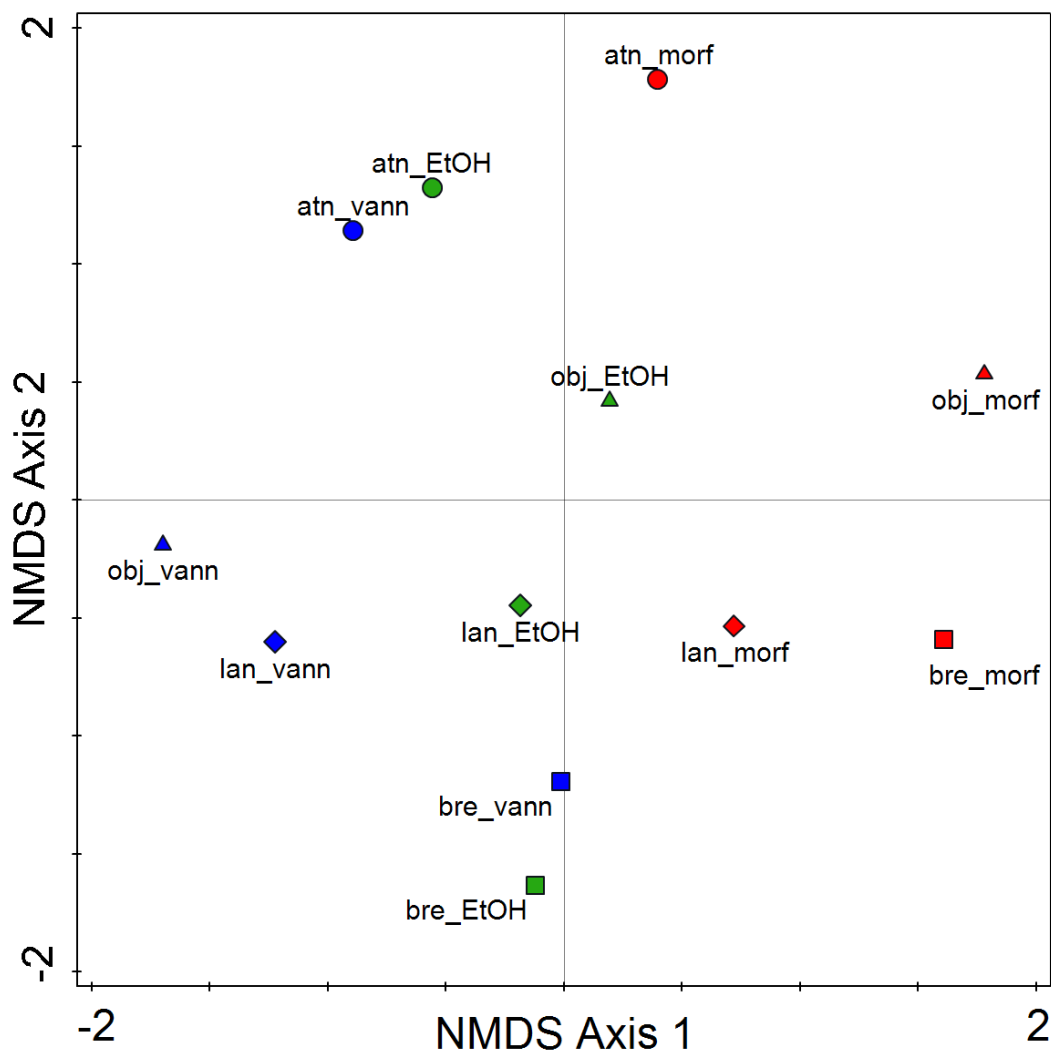
Figur 3.6 Bokplott av totalt antall taksa av bunndyr (a), døgnfluer (Ephemeroptera) (b), steinfluer (Plecoptera) (c), vårfluer (Trichoptera) (d) og EPT (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera) (e) i prøvene fra Atnsjøen, Breid tjern, Langtjern og Østre Bjonevatnet bestemt med ulike metoder.

Sammenligningen av de ulike metodene viste at det ble registrert flest arter i vannprøver (74), tett fulgt av konvensjonelle prøver (73), og færrest arter i etanolprøvene (68). De tre anvendte metodene resulterte i 25 arter som var felles (figur 3.7). Ytterligere 17 arter ble funnet i både vannprøver og etanolprøver. Konvensjonelle prøver og etanolprøver hadde 11 arter felles. Konvensjonelle prøver og vannprøver hadde kun én felles art.



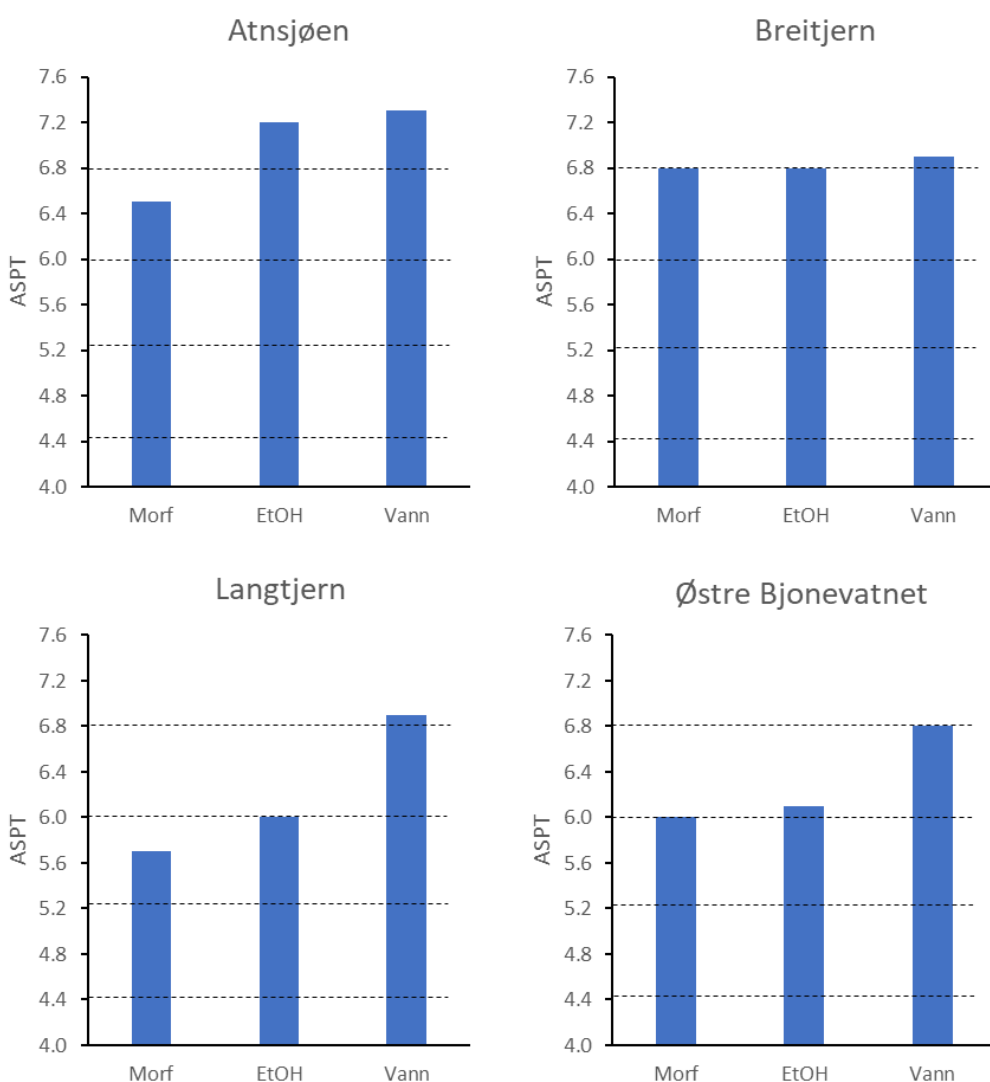
Figur 3.7 Venndiagram som viser antall bunndyrarter detektert ved bruk av de ulike metodene, angitt som felles for to eller tre metoder, og spesifikt for den enkelte metode.

Artslistene ble også sammenlignet med ordinasjonsmetoden NMDS (figur 3.8) der førsteaksen forklarer 45,8 % av variasjonen i materialet, og avspeiler forskjeller i hvilken metode som ble brukt og da med de konvensjonelle prøvene til høyre på førsteaksen. Etanolprøvene befinner seg i midten, med noe overlapp med vannprøvene som i hovedsak plasserer seg lengst til venstre langs førsteaksen. Andreaksen forklarer 35,5 % av variasjonen, og avspeiler forskjeller mellom innsjøene, noe som også var tilfellet for sammensetningen av småkrepsarter. Atnsjøen legger seg øverst langs andreaksen med Breitjern i den motsatte enden.



Figur 3.8 Figur 3.4 NMDS sample-plott av artssammensetningen av bunndyr i de tre metoder i de undersøkte innsjøer (Atnsjøen = atn, Breitjern = bre, Langtjern = lan, Østre Bjonevatnet = objo).

Artslistene for de ulike metodene ble brukt for å beregne ASPT-indeksen. Liksom for krepsdyr påvirket forskjeller mellom metoder klassifiseringen av alle innsjøene (figur 3.9). For Langtjern varierte tilstanden med to tilstandsklasser fra *moderat* for konvensjonelle prøver og etanolprøver til *svært god* for vannprøver. For Atnsjøen, Breitjern og Østre Bjonevatnet varierte indeksen med en tilstandsklasse. I Atnsjøen ga konvensjonelle prøver *god* tilstand mens etanolprøver og vannprøver ga *svært god* tilstand. I Breitjern ga konvensjonelle prøver og etanolprøver *god* tilstand og vannprøver *svært god* tilstand. I Østre Bjonevatnet indikerte konvensjonelle prøver *moderat* tilstand, og etanolprøver og vannprøver *god* tilstand.



Figur 3.9 ASPT -indeksen i de fire innsjøene (Atnsjøen, Breitjern, Langtjern og Østre Bjonevatnet) for de ulike metodene. De stiplede linjene angir klassegrensene fra svært god til svært dårlig.

4 Diskusjon

4.1 DNA-baserte metoder - markører og prøvetyper

Til analyse av vannprøvene brukte vi en genetisk markør som er utviklet for å fange opp så mange akvatiske bunndyrarter som mulig (Elbrecht og Leese 2017, Elbrecht mfl. 2019), men som også fanger opp andre organismegrupper. Derfor varierer spesifisiteten svært mye mellom bulk/EtOH-prøver på den ene siden og vannprøver på den andre siden. Mye av DNAet i vannprøver består av bakterier, sopp og encellede alger, og med en generell markør vil størstedelen av påviste arter tilhøre disse gruppene. Dette er en generell utfordring for alle miljøprøver, og kan løses på to alternative måter. Ved bruk av mer spesifikke markører kan man utelukke artene som ikke tilhører målgruppen. Nylig har en slik markør blitt utviklet for bunndyr (Leese mfl. 2021), og liknende markører for småkreps er under utvikling i NINA (SATS-ph.d. prosjekt S. A. Casas). Med disse nye markørene vil andelen målgruppesekvenser i vannprøver øke, opp til 95 % ifølge Leese mfl. (2021), og egnetheten av vannprøver vil sannsynligvis øke i overvåkingssammenheng. En annen metode til å løse uspesifikk amplifisering i DNA metastrekkoding er å ekstrahere DNA fra selve organismene (bulkprøver av småkreps i denne studien) eller fra fiksativ brukt på konvensjonelle prøver (her EtOH-prøver av bunndyr). Krepsdyr avgir lite DNA til vannet, og en planktonprøve (håvtrekk) vil derfor bidra med mer materiale til en DNA-analyse enn en vannprøve (Bui mfl. 2021). Til tross for at vi ekstraherte DNA fra organismer eller fra fiksativ, var bare omtrent halvparten av sekvensene fra målgruppen. Dette kan skyldes at vi har brukt en generell markør som har amplifisert bakterier, sopp og alger som ble med i prøvene. Hvis man kombinerer disse to tilnærmingene, altså bruker en mer spesifikk markør og ekstraherer DNA fra organismer/prøvefiksativ, kan DNA metastrekkoding gi enda bedre resultater. Som et eksempel er taksonomisk bestemmelse av artsrike bunndyrgrupper, slik som fjærmygg, ikke mulig i overvåking på en nasjonal skala ved bruk av konvensjonelle bestemmelsesmetoder.

4.2 Konvensjonelle vs. DNA-baserte metoder

Sammenligningen av konvensjonelle metoder med de DNA-baserte metodene viste at det totalt sett ble registrert flere småkrepsarter i konvensjonelle prøver sammenlignet med DNA-baserte metoder, der det ble funnet færrest arter i vannprøvene. Dette skyldtes særlig at det ble registrert flere vannloppearter (Cladocera) og cyclopoide hoppekreps (Cyclopoida) i de konvensjonelle prøvene. Ordinasjonsanalysen viste at metoden som ble brukt var viktigere enn innsjøen der prøven ble tatt mht. til å forklare forskjeller i artssammensetning av småkreps. Som forventet var det vannprøvene som skilte seg ut fra bulkprøvene og de konvensjonelle prøvene. Forskjellene i antall registrerte bunndyrarter varierte mindre med hvilken metode som ble brukt. Det ble funnet

omtrent like mange bunndyrtaksa i vannprøvene og i de konvensjonelle prøvene, med noe færre taksa i etanolprøvene. Som for småkreps, var metode viktigere for å forklare forskjellene i bunndyrtassammensetningen enn innsjø. I motsetning til småkreps skilte alle de tre metodene seg mer fra hverandre hos bunndyr, der de konvensjonelle prøvene og vannprøvene var mest forskjellig, mens etanolprøvene hadde likheter med begge disse. Dette var forventet, siden vannprøver i praksis representerer et langt større areal/volum av elva eller innsjøen enn både den morfologiske prøven og den spritfikserte prøven som er avgrenset til individer og DNA-fragmenter fra området som er prøvetatt. Generelt kan vi si at vannprøver i større grad vil representere arter som lever i vannsøylen, eller på toppen av eller i den delen av substratet med utveksling til vannet. Bunndyr som lever nedgravd i substratet vil være mindre i kontakt med miljøet som prøvetas. De fysiske egenskapene til lokalitetene er viktige faktorer isolert sett, men også samlet. Vi forventer for eksempel høyere vanngjennomstrømning der det er grovere substrat med mye hullrom, enn i lokaliteter med kompakt substrat. I grunne elver og bekker, og i bølgesonen i innsjøer forventer vi en høyere vanngjennomstrømning i substratet enn i dypere områder av både innsjøer og elver. Nedbrytning av miljø-DNA påvirkes videre av en rekke fysisk-kjemiske faktorer, inkludert mekanisk slitasje av sollys, temperatur, vannkemi. (Strickler mfl. 2015).

Den viktigste forklaringen på forskjellene i antall arter og artsammensetning av småkreps er at mange av de norske artene mangler eller har dårlig dekningsgrad i referansebiblioteket (BOLD). En gjennomgang av de tre gruppene vannlopper, calanoide- og cyclopoide hoppekreps viser at hhv. 23 %, 29 % og 32 % av arter registrert i Norge ikke er registrert med strekkoder i BOLD (Sara Atienza Casas, personlig meddelelse) og at henholdsvis 42 %, 57 % og 53 % har færre enn fem strekkoder. Av 13 småkrepsarter som bare ble funnet i konvensjonelle prøver, er fire ikke blitt registrert med strekkoder i BOLD og fire har færre enn fem strekkoder. Det er fordelaktig med god regional representasjon i BOLD for riktig identifikasjon med DNA-strekkoding, spesielt når man skal skille nært beslektede arter (Bergsten mfl. 2012). For småkrepsarter som har DNA-strekkoder fra Norge er dekningsgraden enda lavere enn nevnt over. Grunnen til at det er mindre forskjeller i antall registrerte arter mellom de ulike metodene for bunndyr sammenlignet med småkreps er antakelig at dekningsgraden i BOLD er vesentlig høyere for de gruppene som bestemmes til art i bunndyropparbeidingen. For eksempel er det bare hhv. 10,4 %, 5,7 % og 7,5 % av de norske artene av døgnfluer (Ephemeroptera), steinfluer (Plecoptera) og vårfluer (Trichoptera) som ikke er registrert i BOLD (Åström mfl. 2018), altså vesentlig lavere enn for småkreps.

Forskjeller mellom metoder kan skyldes at noen arter/grupper er omgitt av et hardt skall/eksoskjelett som medfører at de utskiller mindre DNA til omgivelsene enn dyr som ikke har et slik hardt ytre (Carew mfl. 2018). Både insekter og småkreps er omgitt av et hardt eksoskjelett bestående av kitin, som kan bidra til lavere detekterbarhet, i hvert fall for noen arter (Walsh mfl. 2019). Biller

er eksempler på insekter med hard skal. I denne undersøkelsen er f.eks. vannkalver (Dytiscidae) bare funnet i de konvensjonelle prøvene. Det harde skallet som omgir muslinger og snegler (*Sphaeriidae*, *Gyraulus* sp. *Gyraulus acronicus* og *Radix balthica*) kan også ha bidratt til lavere detekterbarhet med DNA-baserte metoder for arter som tilhører disse gruppene (Beentjes mfl. 2019).

To ulike prøvetyper ble testet ut med DNA-baserte metoder for småkreps (bulkprøver og vannprøver) og bunndyr (etanolprøver og vannprøver). Forskjeller mellom disse prøvenes karakter/beskaffenhet kan også ha påvirket deres evne til å detektere målgruppene. For eksempel ble det registrert flere småkrepsarter i bulkprøvene sammenlignet med vannprøvene. I bulkprøvene detekteres i all hovedsak DNA fra individer i prøvene. I vannprøvene detekteres i hovedsak DNA som er avstøtt fra individer til vannet. Det betyr at konsentrasjonen av DNA fra målgruppene er langt høyere i bulkprøvene enn i vannprøvene. I denne sammenheng vil selvsagt prøvestørrelsen på vannprøven ha betydning. I denne undersøkelse varierte filtrert volum mellom 2 og 4 liter. Med et større filtrert volum ville antall registrerte arter antakelig vært høyere. For bunndyrene ble det registrert noen familier av tovinger i vannprøvene som i hovedsak regnes som terrestriske. Blant disse var hårmugg (Bibionidae), stråfluer (Chloropidae), styltefluer (Dolichopodidae), fruktfluer (Drosophilidae), takmugg (Fanniidae) og soppmugg (Mycetophilidae). I flere av disse familiene er det norske arter som finnes i eller nært ferskvann i deler av deres livssyklus, uten at de bestemmes morfologisk lengre enn til tovinger, og de vil sannsynligvis i liten grad fanges opp i prøver tatt med sparkehåv. DNA fra disse terrestriske artene havner i innsjøene mer eller mindre tilfeldig, antakelig hovedsakelig ved at voksen individer blir fanget på vannoverflaten. Det er en kjent sak at terrestriske insekter er en viktig fødekilde for fisk for eksempel for ørret (Saksgård og Hesthagen 2004). For å undersøke om bruken av ulike markører mellom de molekylære metodene, nemlig bruken av markøren modBF3BR2 for bulkprøvene og BF3BR2 brukt for vannprøvene, sjekket vi om de småkrepsarter vi fant i bulkprøvene (modBF3BR2) også hadde match med BF3BR2 primere. Testen viste at alle arter detektert i bulkprøvene også ville ha blitt amplifisert i vannprøvene med BF3BR2 -primere. Bruk av ulik markør i bulkprøvene og vannprøvene skal derfor ikke ha bidratt til forskjeller mellom de to prøvetyper.

For å kunne bestemme artssamfunnet morfologisk gjennomføres det vanligvis gjentatt prøvetaking med tradisjonelle metoder flere ganger per år for å ta hensyn til ulike arters livshistorie. Eksempelvis tas prøver av småkreps tre ganger i løpet av vekstsesongen i innsjøer, mens bunndyr prøvetas to ganger, tidlig på våren og sent på høsten. Et fortrinn ved å bruke DNA-baserte metoder framfor konvensjonelle metoder er at sannsynligheten for å registrere arter der juvenile stadier er vanskelig å bestemme basert på morfologi øker. Hvilke grupper som er utfordrende å bestemme morfologisk varierer med tid på året, spesielt for bunndyr. For småkreps gjelder det eksempelvis små larvestadier av hoppekreps. I løpet av livssyklus gjennomgår hoppekreps først

seks små larvestadier (nauplie-stadier), etterfulgt av fem noe større larvestadier (copepodit-stadier), før de når voksen-stadiet. Nauplier og de mindre copepodit-stadiene er vanskelig å artsbestemme ved bruk av stereolupe/mikroskop. En småkrepsprøve kan derfor inneholde nauplie- eller små copepoditlarver som ikke blir bestemt med konvensjonelle metoder. På den annen side vil forekomst av slike små larvestadier av en gitt art kunne detekteres med DNA-baserte metoder. Den cyclopoide hoppekrepsen *Acanthocyclops capillatus* er bare registrert i bulkprøvene i tre av innsjøene, men ikke i de konvensjonelle prøvene i denne undersøkelse, mens tidligere års undersøkelser viser at arten finnes i disse innsjøene. På samme måte vil DNA-baserte metoder kunne gi økt taksonomisk oppløsning for grupper som i dag sjeldent bestemmes til slekt eller art. For bunndyr gjelder det eksempelvis mange tovinger, inkludert fjærmygg, der artsdiversiteten i en lokalitet kan være betydelig.

Denne undersøkelsen ble lagt opp med parallelle prøver tatt på hver stasjon som deretter ble bestemt med de ulike metodene. Det betyr at sjeldne arter som forekommer naturlig i lavt antall vil kunne bidra til forskjeller. For eksempel var det noen, om enn få, småkrepsarter som bare ble registrert med DNA-baserte metoder. Disse artene er imidlertid registrert i innsjøene i konvensjonelle prøver enten tidligere eller senere i 2020, eller evt. tidligere år. Dette gjelder for eksempel vannloppene *Scapholeberis mucronata*, *Acroperus angustatus*, *Pleuroxus truncatus* og den cyclopoide hoppekrepsen *Acanthocyclops cappilatus*. For bunndyr gjaldt det eksempelvis flere arter i Limnephilidae-familien. Et annet eksempel på en bunndyrart som ble registrert med molekylære metoder, og som ikke ble funnet med konvensjonell metodikk, er vannnymfen Nordmetallvannnymfe (*Lestes sponsa*). Alle disse artene har høyst sannsynlig vært til stede i innsjøene, men i lave tettheter, eller med klumpvis fordeling da prøvene ble tatt, slik at de ikke nødvendigvis blir fanget opp i de konvensjonelle prøvene og/eller forekommer sporadisk i disse.

I noen tilfeller der signalet var forholdsvis kraftig (mange DNA-kopier) med DNA-baserte metoder ble cyclopoide hoppekreps bestemt til art/arter som ikke skulle forekomme i henhold til konvensjonell metodikk. Dette kan skyldes feilidentifisering siden referansebiblioteket ikke inneholdt referansesekvenser for de gjeldende artene, som derfor har blitt bestemt til nært beslektede arter som ikke forekommer i Norge. Dette bidro til uoverensstemmelser mellom DNA-baserte og konvensjonelle metoder. *Diacyclops nanus* ble for eksempel funnet i de konvensjonelle prøver i Atnsjøen, mens DNA-baserte metoder tilsa at det er *D. bicuspidatus* i innsjøen. *Diacyclops bicuspidatus* er forholdsvis vanlig på Øst-, Sør- og Vestlandet, ofte i små dammer, men den er aldri registrert med konvensjonelle metoder i Atnsjøen (1997 - 2020). Individene av *D. nanus* som er strekkodet og registrert i BOLD er fra Nord-Amerika. Disse kan være genetisk forskjellige fra de europeiske formene og vil i så fall ikke gi treff på sekvensene fra Atnsjøen. Et annet eksempel er hoppekrepsen, *Thermocyclops crassus*, registrert med kraftig DNA-signal i Østre Bjo-nevatnet. Det er en art med veldig få observasjoner i Norge, hovedsakelig fra Østlandet. Det

finnes to andre cyclopoide hoppekreps i samme slekt i Norge, *T. oithonoides*, som er veldig vanlig på Øst- og Sørlandet og *T. dybowskii*, der det finnes forholdsvis få registreringer fra Sørøstlandet. Ingen av disse to artene er tidligere (2010, 2012, 2014, 2016, 2018) registrert i Østre Bjonevatnet med konvensjonelle metoder. *T. crassus* kan være genetisk feilbestemt. Arten som sannsynligvis er feilaktig registret er *Mesocyclops leukarti*, som er vanlig forekommende i innsjøen og registrert både ved bruk av konvensjonelle og DNA-baserte metoder. Årsaken til at det tilsynelatende finnes to ulike former av *M. leukarti* i Østre Bjonevatnet kan muligens forklares med at to populasjoner av arten i innsjøen blir tilskrevet til to forskjellige BINs av BOLD.

For de tre calanoide hoppekrepsene *Acanthodiptomus denticornis*, *Arctodiptomus laticeps* og *Eudiaptomus gracilis* var det oftest god overenstemmelse mellom registrering med konvensjonelle og DNA-baserte metoder. Uoverensstemmelser forekom imidlertid også for disse tre artene, hvilket umiddelbart var påfallende siden det var 100 % likhet mellom DNA-sekvensene for disse arter i prøvene og referansesekvensene i BOLD. Et eksempel er *E. gracilis* i Atnsjøen, Langtjern og Østre Bjonevatnet, i Atnsjøen til og med registrert med et kraftig signal, hvilket står i kontrast til konvensjonelle metoder som aldri har registrert arten i disse innsjøene. Alle innsjøene er godt undersøkt med konvensjonell metodikk. Atnsjøen er den best undersøkte innsjøen i Norge og har vært årlig overvåket siden 1985, fra 1997 også med litorale prøver. Funn av *A. denticornis* i bulkprøver fra Breidtjern og *A. laticeps* fra Østre Bjonevatnet, om enn med svakt signal, støttes heller ikke av de konvensjonelle prøvene. Slike svake signaler er et tegn på bakgrunnsforurensning på lavt nivå (Bohmann mfl. 2021), og de kan filtreres bort ved å bruke en abundansterskel før videre databearbeiding. Bruk av en slik terskel ville antakelig ha resultert i litt lavere antall registrerte arter per prøve for de DNA-baserte metodene, men ville økt sikkerheten av resultatene. Det er mer komplisert å forklare det sterke *E. gracilis*-signalet. En grundig gjennomgang av de ulike stegene i metodikken i undersøkelsen avdekket at den, stort sett, automatiske taksonomiske tildelingsmetode vi hadde brukt hadde feilbestemt *E. gracilis* sekvenser fra Atnsjøen, Langtjern og Østre Bjonevatnet. *E. gracilis* referanser i BOLD er private og var derfor ikke med i vår trenede referansedatabase. Vi sjekket alle *E. gracilis* ASV-er på nytt og fant at de tre ASV-ene som var tilstede i Atnsjøen, Langtjern og Østre Bjonevatnet ikke var tilstede i Breidtjern. Ved videre bruk av BOLD og BLAST² identifikasjonssøk viste det seg at de tre *E. gracilis* ASV-ene i de tre innsjøene var nærmere knyttet til *A. laticeps* enn *E. gracilis* (likevel med lav 85 %-identitet). Derfor mistenker vi at det er COI-sekvensvarianter av *A. laticeps* som finnes i Atnsjøen, der arten er den altdominerende calanoide hoppekrepsen. Registreringene av svake *E. gracilis* signaler (i.e. = «*A. laticeps* variant») i Langtjern og Østre Bjonevatnet er bakgrunnsforurensning fra Atnsjøen. Dette problemet kan løses ved å komplementere referansebiblioteket.

² BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) er en rekke programmer som brukes til analyse av biologiske sekvensdata. Det blir brukt for å sammenligne DNA-sekvenser med data fra store databaser.

Noen nærstående arter har svært likt utseende og kan være spesielt utfordrende å bestemme basert på morfologi. De cyclopoide hoppekrepsene *Acanthocyclops robustus* og *A. vernalis* er slike nærstående arter, der også høy intraspesifikk morfologisk variasjon (stor plastisitet innen arten) kompliserer morfologisk basert bestemmelse. *A. robustus* ble funnet i konvensjonelle prøver fra Langtjern. I Østre Bjonevatnet ble *A. robustus* funnet på en senere prøvedato i 2020. Under de tidligere undersøkelser i overvåkingen (1997/1998 og mot nåtid) er begge arter registrert i Atnsjøen, Langtjern og Breidtjern. Med DNA-baserte metoder ble *A. vernalis* funnet i alle innsjøene, med kraftig signal i Langtjern og Østre Bjonevatnet og svakt signal i Atnsjøen og Breidtjern. *A. robustus* er ikke funnet i prøvene med DNA-baserte metoder. Her trengs det en avklaring i forhold til artsstatus. Inntil dette foreligger kan vi alternativt slå sammen de to artene hvis de skal brukes som indikatorarter. Blant de registrerte bunndyrarter er det også eksempler på beslektede arter som er vanskelige å skille morfologisk, og der dette kan ha bidratt til forskjeller mellom konvensjonelle metoder og DNA-baserte metoder. Dette inkluderer blant annet to døgnfluearter fra slekten *Baetis*: Sandsmådøgnflue (*Baetis muticus*) ble identifisert med konvensjonell metodikk mens seksgjeldet smådøgnflue (*Baetis digitatus*) ble registrert genetisk. Dette er to beslektede arter som kan være utfordrende å skille fra hverandre morfologisk, og som ofte rapporteres som *B. muticus/digitatus*. Artene kan også være tilstede i de samme lokalitetene.

Sammenligningen mellom konvensjonelle- og DNA-baserte metoder for bunndyr ble gjort på basis av den taksonomiske oppløsning som brukes i ferskvannsovervåkingen i Norge knyttet til vannforskriften (Petrin mfl 2016). Her bestemmes enkelte grupper til et overordnet taksonomisk nivå, i hovedsak fordi artsbestemmelse er svært krevende og krever ekspertkompetanse. Dette gjelder bl.a. fjærmygg (Chironomidae), som i konvensjonelle prøver registreres til familie. DNA-baserte metoder resulterte i 177 fjærmyggarter (Chironomidae) i vår undersøkelse, noe som er en vesentlig del av alle taksa som ble bestemt til art med DNA-baserte metoder. Dette eksempelet illustrerer at DNA-baserte metoder gir mulighet for vesentlig høyere taksonomisk oppløsning enn det som er vanlig for konvensjonelle metoder for noen grupper. Fjærmygg kan brukes som miljøindikatorer i ferskvann (Nicacio og Juen 2015, Doric mfl. 2021), men brukes bare i ganske få europeiske land knyttet til overvåkingen under vanddirektivet (Poikane mfl. 2016).

4.3 Økologisk tilstand basert på ulike metoder

For elver er det allerede gjort en del undersøkelser av DNA-baserte metoder for klassifisering av økologisk tilstand i henhold til vanddirektivet, og det er vist at bunndyrindekser basert på molekylære data på tilstedeværelse/fravær av arter korresponderer relativt godt med konvensjonelle metoder (Elbrecht mfl. 2018). DNA-baserte metoder har imidlertid i liten grad vært brukt i overvåking av ulike biologiske kvalitetslementer og til økologisk tilstandsvurdering av innsjøer. En nyere undersøkelse fra innsjøer basert på DNA-basert deteksjon av zooplankton (Rotatoria,

Cladocera og Copepoda) viste at zooplanktonindeksen «zooplankton integrity index» var korrelert med vannkvaliteten og avspeilet økologisk tilstand (Yang og Zhang 2020).

LACI-1 indeksen (planktoniske og litorale småkreps), som ble benyttet i vår undersøkelse, kunne variere med flere tilstandsklasser avhengig av hvilken metode som ble brukt. Til tross for at bunndyrindeksen ASPT tar utgangspunkt i en grovere taksonomisk oppløsning enn LACI-1 for småkreps, var det likevel en variasjon på inntil to tilstandsklasser avhengig av metode, hvor tilstanden ble vurdert bedre med DNA-baserte metoder sammenlignet med konvensjonelle metoder. Det siste kan forklares ved spesielt to forhold. Taksalisten for vannprøvene er basert på blandprøver som ikke bare inneholder DNA-fragmenter fra bunndyrsamfunnet på stasjonen, men heller fra samfunnet i hele, eller større deler av innsjøen, og kan dermed inneholde flere arter, eller andre arter enn de lokalt tilstedeværende (se kap. 4.2 for feilkilder og svakheter ved representativiteten til molekylære metoder). Videre krever morfologisk bestemmelse av bunndyr i en del tilfeller at en har hele dyr for å kunne gjøre en sikker bestemmelse, det vil si at eksempelvis bein, gjeller og haletråder samlet på et individ er nødvendig for å kunne bestemme dyrene til slekt og artsnivå. For molekylære metoder er det derimot tilstrekkelig at prøven inneholder et fragment av et individ for at arten skal registreres. Dette øker sannsynligheten for å oppdage spesielt sjeldne arter, småvokste arter og arter med individer på tidlige utviklingsstadier som er tilstede i prøven, og som enten oversees ved grovsortering av prøven, eller som ikke er tilstede med individer som lar seg bestemme morfologisk.

Hvordan forskjellene mellom prøvetyper i artssammensetning for henholdsvis småkreps og bunndyr slår ut på tilstandsvurderingen avhenger av hvilke indikatorarter som registreres, samt vektningen mellom følsomme og tolerante arter. Det er altså ikke trivielt at ulik artssammensetning mellom prøvetyper både kan lede til ganske lik eller forskjellig indeksverdi. Antallet innsjøer i denne undersøkelse er imidlertid begrenset, og det trengs et større erfaringsgrunnlag for å belyse disse aspekter ytterligere.

4.4 Konklusjon og anbefalinger.

Hering mfl. (2018) diskuterer den fremtidige implementeringen av molekylære metoder knyttet til vanddirektivet og ser for seg to ulike muligheter for bruken av molekylære metoder. I den første, med det korteste tidsperspektivet, avløser DNA-baserte metoder tradisjonelle bestemmelsesmetoder. I dette tilfellet vil antakelig mye av rammeverket som er utviklet i tilknytning til vanddirektivet, slik som indekser med klassifiseringssystemer, kunne brukes med eller uten modifikasjoner. Det andre alternativet vil være å dra nytte av den høyere taksonomiske oppløsningen som er mulig med molekylære metoder og vil også kunne inkludere aspekter av økologisk funksjon f.eks.

ved måling av funksjonelle gener (miljø-RNA) (Yates mfl. 2021). Dette alternativet ligger imidlertid lengre frem i tid, og vil inkludere videre utvikling av rammeverket som brukes for tilstandsklassifisering. Vår undersøkelse er en av de første som har brukt det første alternativet, der vi for bunndyr og krepsdyr har sammenlignet tradisjonelle metoder med DNA-baserte metoder i innsjøer. Undersøkelsen inkluderer en begrenset datamengde, og det er bruk for ytterligere undersøkelser for å utvide erfaringsgrunnlaget for de molekylære metodene. Undersøkelsen belyser likevel mulige fordeler og ulemper knyttet til de ulike metodene. Undersøkelsen peker også ut noen mulige retninger med tanke på forbedring av de molekylære metodene. Resultatene viste bl.a. at:

- Ved å bruke en mer spesifikk markør kombinert med ekstraksjon av DNA fra organismer/prøvefiksativ, kan DNA metastrekkoding bli enda mer anvendbar ved å utelukke artene som ikke er målgruppe. Vi brukte en markør som er utviklet til å fange opp så mange akvatiske bunndyrarter som mulig, noe som resulterte i at spesifisiteten varierte svært mye mellom bulk/EtOH- og vannprøver. Størstedelen av DNAet i en vannprøve består av bakterier, sopp og encellede alger, som også fanges opp av en generell markør.
- Det er dårlig dekningsgrad for strekkoder i referansebiblioteket (BOLD) for de norske artene. Dette resulterte i at det ble registrert vesentlig flere arter småkreps med konvensjonelle metoder sammenlignet med DNA-baserte metoder. Til sammenligning var det ikke så stor forskjell mellom de ulike metoder for bunndyr. En viktig forutsetning for bruken av molekylære metoder til overvåking av småkreps er derfor at referansebibliotekene både mht dekningsgrad og kvalitet blir forbedret.
- Vi har vist at for småkreps var det stor forskjell mellom to anvendte DNA-metodene. Bulkprøver oppnådde større likhet med konvensjonelle prøver enn vannprøver både mht antall arter registrert og artssammensetningen. For bunndyr var det mindre forskjell mellom etanolprøver og vannprøver i sammenligningen med konvensjonelle prøver for antall arter. I et kortere tidsperspektiv er det mer hensiktsmessig å satse videre på bruk av bulkprøver og etanolprøver sammenlignet med vannprøver for hhv. småkreps og bunndyr.
- Vi anbefaler at man fortsetter med konvensjonelle metoder inntil ulike utfordringer knyttet til de DNA-baserte metodene er løst og disse metodenes anvendelighet, slik som pålitelighet, feilkilder, kostnader, påkrevet kompetanse og merverdi sammenlignet med konvensjonelle metoder er vurdert nøyere.

5 Referanser

- Beentjes K.K., Speksnijder A.G.C.L., Schilthuizen M., Hoogeveen M., Pastoor R. og van der Hoorn B.B. 2019. Increased performance of DNA metabarcoding of macroinvertebrates by taxonomic sorting. *PLoS ONE* 14: e0226527. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226527>
- Bergsten, J., Bilton, D.T., Fujisawa, T., Elliott, M., Monaghan, M.T., Balke, M., Hendrich, L., Geijer, J., Herrmann, J., Foster, G.N., Ribera, I., Nilsson, A.N., Barraclough, T.G. og Vogler, A.P. 2012. The Effect of Geographical Scale of Sampling on DNA Barcoding. *Syst Biol* 61(5):851–869.
- Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R. A., ... og Dunn, F. 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*, 183, 19-28.
- Bohmann K, Elbrecht V., Carøe C., Bista I., Leese F., Bunce M., Yu D. W., Seymour M., Dumbrell A. and Creer S. Strategies for sample labelling and library preparation in DNA metabarcoding studies. *Authorea*. 2021. DOI: 10.22541/au.162141261.10649593/v1
- Bui, S., Dalvin, S., Vågseth, T., Oppedal, F., Fossøy, F., Brandsegg, H., Jacobsen, Á., á Norði, G., Fordyce, M.J., Michelsen, H.K., Finstad, B. and Skern-Mauritzen, R. 2021, Finding the needle in the haystack: Comparison of methods for salmon louse enumeration in plankton samples. *Aquaculture Research*, 52: 3591-3604. <https://doi.org/10.1111/are.15202>
- 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.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Holmes, S.P. 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 11: 2639.
- Carew M.E., Coleman R.A. og Hoffmann A.A. 2018. Can non-destructive DNA extraction of bulk invertebrate samples be used for metabarcoding? *PeerJ* 6:e4980 <https://doi.org/10.7717/peerj.4980>
- Caruso, V., Song, X., Asquith, M., Karstens, L. 2019. Performance of microbiome sequence inference methods in environments with varying biomass. *mSystems* 4(1): e00163-18.
- Deiner, K., Bik, H. M., Machler, E., Seymour, M., Lacoursiere-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., de Vere, N., Pfrender, M. E. og Bernatchez, L. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. - *Molecular Ecology* 26 (21): 5872-5895.
- Direktoratsgruppen vanndirektivet 2018. Veileder 02:2018. Klassifisering av miljøtilstand i vann.
- Dorić V., Pozojević I., Vučković N., Ivković M. og Mihaljević Z. 2021. Lentic chironomid performance in species-based bioassessment proving: High-level taxonomy is not a dead end in monitoring. *Ecological indicators*, 121, 107041.
- Eichmiller, J. J., Best S. E. and Sorensen P. W. 2016. *Environmental Science og Technology* 50 (4), 1859-1867 DOI: 10.1021/acs.est.5b05672
- Elbrecht, V. og Leese, F. 2017. Validation and development of COI metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment. *Front. Environ. Sci.* 5: 11.

- Elbrecht V, Vamos EE, Steinke D og Leese F. 2018. Estimating intraspecific genetic diversity from community DNA metabarcoding data. *PeerJ* 6:e4644 <https://doi.org/10.7717/peerj.4644>
- Elbrecht, V., Braukmann, T.W.A., Ivanova, N.V., Prosser, S.W.J., Hajibabaei, M., Wright, M., Zakharov, E.V., Hebert, P.D.N. og Steinke, D. 2019. Validation of COI metabarcoding primers for terrestrial arthropods. *PeerJ* 7: e7745.
- Hajibabaei, M., Porter, T. M., Robinson, C. V., Baird, D. J., Shokralla, S., og Wright, M. T. 2019. Watered-down biodiversity? A comparison of metabarcoding results from DNA extracted from matched water and bulk tissue biomonitoring samples. *PloS one*, 14(12), e0225409.
- Hering D., Borja A., Jones J. I., Pont D., Boets P., Bouchez A., Bruce K., Drakare S., Hänfling B., Kahlert M., Leese F., Meissner K., Mergen P., Reyjol Y., Segurado P., Vogler A., og M. Kelly 2018 Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water research*. <https://doi.org/10.1016/j.wares.2018.03.003>
- Johnsen, S.I., Strand, D.A., Rusch, J. og Vrålstad, T. 2020. Nasjonal overvåking av edelkreps og spredning av signalkreps - presentasjon av overvåkingsdata og bestandsstatus – oppdatert 2020. NINA Rapport 1905. Norsk institutt for naturforskning.
- Leese, F, Sander, M, Buchner, D, Elbrecht, V, Haase, P, Zizka, VMA. Improved freshwater macroinvertebrate detection from environmental DNA through minimized nontarget amplification. *Environmental DNA*. 2021; 3: 261– 276. <https://doi.org/10.1002/edn3.177>
- Miljødirektoratet. 2016. Miljødirektoratets prioriterte forskningsbehov 2016 - 2021. Innspill til Klima- og miljødepartementetM-591. Miljødirektoratet. 67 s.
- Nicacio G., Juen L.J.I.C. og Diversity. 2015. Chironomids as indicators in freshwater ecosystems: an assessment of the literature. 8, 393-403.
- Oliveros, J.C. 2007. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- Petrin, Z., Bækkeli, K. A. E.; Bongard, T., Bremnes, Trond, Eriksen, T. E.; Kjærstad, G.; Saltveit, S. J., Schartau, A. K.; Velle, G.. 2016. Innsamling og bearbeiding av bunndyrprøver – hva vi kan enes om. 2016. ISBN 978-82-426-2937-1. NINA rapport (1276).
- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G., og Nannipieri, P. 2009. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45(3), 219-235.
- Poikane, S., Johnson, R.K., Sandin, L., Schartau, A.K., Solimini, A., Urbanič, G., Arbačiauskas, Arovi-ita, J., Gabriels, W., Miler, O., Pusch, M.T, Henn, T. og Böhmer, J. 2016. Benthic macroinvertebrates in lake ecological assessment: A review of methods, intercalibration and practical recommendations. - *Sci. Total Environ*. 543: 123-134.
- Porter, T. M., og Hajibabaei, M. 2018. Automated high throughput animal CO1 metabarcoding classification. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.
- Ratnasingham, S., og Hebert, P. D. 2007. bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, 7(3), 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>

Saksgård R, Hesthagen T (2004) A 14-year study of habitat use and diet of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) in Lake Atnsjøen, a subalpine Norwegian lake. *Hydrobiologia* 521:187–199.

Schartau, A.K., Skjelbred, B., Bækkelie, K.A.E., Demars, B., Dokk, J.G., Jensen, T.C., Jenssen, M.T.S., Lungrin, E., Mjelde, M., Saksgård, R., Velle, G., Walseng, B. 2021. ØKOFERSK – delprogram ØST: Basisovervåking av utvalgte innsjøer i 2020. Overvåking og klassifisering av økologisk tilstand. Overvåkningsrapport M-2055|2021. 68 s.

Solheim, A. L., Schartau, A. K., Bongard, T., Bækkelie, K. A. E., Dokk, J. G., Edvardsen, H., Moe, T. F., Gjelland, K. Ø., Hobæk, A., Håvardstun, J., Jensen, T. C., Mjelde, M., Persson, J., Sandlund, O. T., Skjelbred, B. og Walseng, B. 2018. ØKOSTOR 2017: Basisovervåking av store innsjøer. Utprøving av metodikk for overvåking og klassifisering av økologisk tilstand i henhold til vannforskriften. - Overvåkningsrapport. M-1086. Miljødirektoratet. 193 s.

Solheim, A. L., Schartau, A. K., Bongard, T., Bækkelie, K. A. E., Dahl-Hansen, G., Demars, B., Dokk, J. G., Gjelland, K. Ø., Hammenstig, D., Jensen, T. C., Mjelde, M., Persson, J., Sandlund, O. T., Skjelbred, B., Solhaug Jenssen, M. T. og Walseng, B. 2019. ØKOSTOR 2018: Basisovervåking av store innsjøer. Utprøving av metodikk for overvåking og klassifisering av økologisk tilstand i henhold til vannforskriften. - Overvåkningsrapport. M-1464. Miljødirektoratet. 177 s.

Strickler, K. M., Fremier, A. K., og Goldberg, C. S. 2015. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85-92.

Taberlet, P, Bonin, A, Zinger, L og Coissac, E. 2018. Environmental DNA: for biodiversity research and monitoring. Oxford University Press, Oxford.

ter Braak, C. J. F., og Šmilauer, P. 2012. CANOCO Reference Manual and User's Guide: Software for Ordination (version 5.0). Wageningen, the Netherlands: Biometris

Thomsen, P. F. og Willerslev, E. 2015. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. - *Biological Conservation* 183: 4-18.

Thomsen, P. F., Kielgast, J. O. S., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., ... og Willerslev, E. 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology*, 21(11), 2565-2573.

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., ... og Dejean, T. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular ecology*, 25(4), 929-942.

Vuorio, K., Mäki, A., Salmi, P., Aalto, S. L., og Tirola, M. 2020. Consistency of targeted meta-transcriptomics and morphological characterization of phytoplankton communities. *Frontiers in microbiology*, 11, 96.

Walsh J.R., Spear M.J., Shannon T.P., Krysan P.J. og Vander Zanden M.J.J.B.I. 2019 Using eDNA, sediment subfossils, and zooplankton nets to detect invasive spiny water flea (*Bythotrephes longimanus*). 21, 377-389.

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. og Cole, J.R. 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 73(16):5261-7.

Yang J. og Zhang X. 2020. eDNA metabarcoding in zooplankton improves the ecological status assessment of aquatic ecosystems. *Environment international*, 134, 105230.

Yates, MC, Derry, AM og Cristescu, ME. 2021. Environmental RNA: A Revolution in Ecological Resolution? Trends in Ecology og Evolution.

Åström, J., Birkemoe, T., Ekrem, Endrestøl, A., T., Fossøy, F., Sverdrup-Thygeson, A., Ødegaard, F. 2019. Nasjonal overvåking av insekter. Behovsanalyse og forslag til overvåkingsprogram. NINA Rapport 1549. Norsk institutt for naturforskning. 75 s.

Åström, J., Birkemoe, Dahle, S., T., Davey, M., Ekrem, T., Endrestøl, A., Fossøy, F., Nystad Handberg, Ø., Hanssen, O., Magnussen, K., Majaneva, M.A.M., Navrud, S., Staverløkk, A., Sverdrup-Thygeson, A., Ødegaard, F. 2020. Forslag til nasjonal insektovervåking - Erfaringer fra et pilotforsøk samt en nytte-kostnadsanalyse. NINA rapport 1725. Norsk institutt for naturforskning.

Norsk institutt for naturforskning, NINA, er en uavhengig stiftelse som forsker på natur og samspillet natur–samfunn.

NINA ble etablert i 1988. Hovedkontoret er i Trondheim, med avdelingskontorer i Tromsø, Lillehammer, Bergen og Oslo. I tillegg driver NINA Sæterfjellet avlsstasjon for fjellrev på Oppdal, og forskningsstasjonen for vill laksefisk på lms i Rogaland.

NINAs virksomhet omfatter både forskning og utredning, miljøovervåking, rådgivning og evaluering. NINA har stor bredde i kompetanse og erfaring med både naturvitere og samfunnsvitere i staben. Vi har kunnskap om artene, naturtypene, samfunnets bruk av naturen og sammenhenger med de store drivkreftene i naturen.

ISSN:1504-3312
ISBN: 978-82-426-4827-3

Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim

Besøks-/leveringsadresse: Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim

Telefon: 73 80 14 00, Telefaks: 73 80 14 01

E-post: firmapost@nina.no

Organisasjonsnummer 9500 37 687

<http://www.nina.no>



Samarbeid og kunnskap for framtidens miljøløsninger