

Utvärdering av ny övervakning av främmande arter

Metodjämförelse mellan traditionell och DNA-baserad identifiering



Rapporten har tagits fram på uppdrag av Havs- och vattenmyndigheten. Rapportförfattarna ansvarar för innehållet och slutsatserna i rapporten. Rapportens innehåll innebär inte något ställningstagande från Havs- och vattenmyndighetens sida.

Havs- och vattenmyndigheten
Datum: 2018-08-22

Omslagsfoto: Johanna Bergkvist, Marine Monitoring AB.
ISBN 978-91-88727-15-2

Havs- och vattenmyndigheten
Box 11 930, 404 39 Göteborg
www.havochvatten.se

Utvärdering av ny övervakning av främmande arter

Metodjämförelse mellan traditionell och DNA-baserad identifiering

Per Sundberg, Matthias Obst, Sarah J. Bourlat (SeAnalytics AB)
&
Johanna Bergkvist, Marina Magnusson (Marine Monitoring AB)

Havs- och vattenmyndighetens rapport 2018:24

Förord

Denna rapport redovisar resultat från en studie där vi undersökt artförekomst och speciellt förekomst av invasiva främmande arter i kustmiljö. Syftet har varit att utvärdera konventionell undersökningsmetodik för att identifiera arter genom taxonomisk artbestämning genetisk identifiering genom DNA-metabarkodning, i hamnmiljöer. Genom att övervaka miljön med nya genetiska metoder får vi möjligheter att upptäcka spår av organismers förekomst, något som annars är svårt med sortering av organismer från vatten-/planktonprov, bottenhugg eller fiskeredskap.

Utvecklingen av DNA-tekniker går fort och det ser lovande ut att tillämpa dessa i jakten på invasiva främmande arter och patogener som är skadliga för den biologiska mångfalden, människors och djurs hälsa samt orsakar stora samhällskostnader, alltså organismer som vi anser är invasiva och främmande. Det finns idag inga miljöövervakningsprogram som baseras på DNA. Samtidigt blir det allt svårare att hitta experter, s.k. taxonomer som kan identifiera arter och som oftast är specialiserade på en eller några artgrupper. Dessutom kommer många arter hit som larver eller juveniler som kanske inte alls liknar det vuxna djuret, eller algen, och därmed är svåra att artbestämma. Detta innebär att många arter kan komma hit utan att upptäckas förrän de är etablerade, och då har vi vanligtvis nått en situation då den invasiva främmande arten i fråga etablerat sig i en ny miljö, och därmed inte går att åtgärda.

Såväl EU:s förordning om invasiva främmande arter som havsmiljödirektivet ställer krav på nationell övervakning av främmande arter. Och inom havsmiljöförvaltningen finns även behoven för att fullfölja arbetet med främmande arter inom Helcoms och Ospar.

För att snabbt kunna utrota eller begränsa nyetableringar av invasiva främmande arter behöver vi utveckla metoder som är effektiva på att tidigt upptäcka nya introduktioner. Övervakning med hjälp av DNA-baserade metoder som metabarkodning är en lämplig väg att gå. Eftersom det är nya metoder för övervakning så bör även nya indikatorer tas fram som lämpar sig för genetiska metoder. Genetiska metoder bör ses som ett komplement till de traditionella – inte minst under en övergångsfas och om så möjligt ersätta traditionella.

Uppdraget är beställt av Havs- och vattenmyndigheten. För granskning och redaktionellt arbetet av denna rapport har Azote AB och Erland Lettevall deltagit. I den slutliga granskningen har även deltagit utredarna Sofia Brockmark, Lars Gamfeldt och Karl Norling.

Göteborg 2018-06-18 Mikael Krysell, enhetschef

INNEHÅLL

SAMMANFATTNING.....	8
SUMMARY	10
BAKGRUND.....	12
Främmande, och invasiva främmande arter	12
Uppdraget.....	12
Inledning	12
METOD	17
Provtagningsområden	17
Provtagning och analys.....	18
Djurplankton	19
Mjukbottenlevande makrofauna	19
Påväxtorganismer	19
DNA-metabarkodning.....	20
RESULTAT	21
Traditionell metodik	21
Djurplankton	21
Mjukbottenlevande fauna	21
Påväxtorganismer	21
DNA-baserad analys	22
Tidsåtgång – provtagning, identifiering	24
UTVÄRDERING	26
DISKUSSION OCH REKOMMENDATIONER	29
Hamnövervakning – vad är syftet?	29
Statistisk analys	29
DNA eller traditionell metodik.....	30
SLUTSATSER	34
Sammanfattning	35
FRAMTIDA BEHOV	37
REFERENSER	38
BILAGOR	42
BILAGA I. POSITIONER OCH DJUP FÖR PROVTAGNINGEN.....	43
BILAGA II. METODBESKRIVNING DNA-METABARKODNING.....	44
BILAGA III. FRÄMMANDE ARTER FUNNA INOM UNDERSÖKNINGEN	45
BILAGA IV. ARTLISTA DJURPLANKTON	46

BILAGA V. ARTLISTA MJUKBOTTENFAUNA.....	49
BILAGA VI. ARTLISTA SETTLINGSPANELER.....	53
BILAGA VII. KOSTNAD DNA-ANALYS.....	55

Sammanfattning

Den globala sjöfarten transporterar över 90 procent av världens gods och förväntas spela en allt större roll i framtiden när det gäller global handel. Sjöfarten påverkar miljön på olika sätt, där transport och utsläpp av skadliga vattenlevande organismer och patogener i barlastvattnet är en sådan påverkan. Den växande insikten om betydelsen av barlastvatten som en vektor för främmande och invasiva främmande arter (IAS) ledde så småningom fram till antagandet av FN:s internationella barlastvattenkonvention. Konventionen trädde i kraft i september 2017 och innebär att spridningen av skadliga (invasiva) arter med fartygs barlastvatten och sediment skall förebyggas, och på sikt elimineras. Konventionen kräver att fartyg i internationell trafik installerar anläggningar för hantering av barlastvatten, men det är möjligt att ansöka om undantag från att behandla barlasten givet vissa förutsättningar. För att ansöka om undantag måste listade främmande arter som riskerar spridas genom fartygstransporter undersökas i de hamnar som trafikeras. Undersökningar av IAS i hamnar är även av betydelse för förvaltningen.

I denna rapport jämförs traditionella med nya metoder för att övervaka fauna i hamnområden. Plankton- och bottenprover togs och sorterades manuellt för att identifiera alla exemplar till art eller högre taxonomisk nivå (släkte, familj eller fylum). Samtidigt bearbetades prover som tagits parallellt med en genomisk metod, där DNA extraherades från provet utan föregående sortering och arter identifierades med DNA-metabarkodning. DNA sekvenserades med användning av nästa generations sekvenseringstekniker (Illumina) och sekvenserna matchades mot publicerade sekvenser från publika arkiv och databaser med målarter.

Med den traditionella metoden hittades 212 taxa, och av dessa kunde 131 (62 procent) bestämmas till art. Fyra av dessa arter är listade som främmande eller invasiva främmande arter (IAS). Av dessa fyra är två på "target species list" för Helcom/Ospar-området; amerikansk kammanet (*Mnemiopsis leydi*) och japanskt jätteostron (*Crassostrea gigas*). Med DNA-metoden hittades 153 taxa varav 119 (77 procent) kunde bestämmas till art genom matchning mot olika databaser. Den DNA-baserade metoden upptäckte fem IAS, varav alla fanns på Helcom/Ospar-listan: hoppkräftan *Acartia tonsa*, japanskt jätteostron (*Crassostrea gigas*), ostronpest (*Crepidula fornicata*), slät havstulpan (*Amphibalanus improvisus*), och märkräftan "luden spökräka" (*Caprella mutica*). Amerikansk kammanet hade plockats ur planktonproverna innan de fixerades för DNA. På EU:s unionsförteckning över IAS där endast en art är marin så erhöles ingen matchning.

Fler arter identifierades på påväxtplattor (75 procent) och bland bottenfaunan (82 procent) med den traditionella metoden, jämfört med den DNA-baserade (56 respektive 64 procent). När det gäller djurplankton kunde 66 procent av arterna identifieras med DNA, men bara 9 procent med den traditionella metoden. Här hittade också DNA-metoden fyra IAS, medan den traditionella metoden inte fann någon. DNA-metoden fann tre IAS i bottenprover, jämfört med inga funna arter med den traditionella metoden.

En slutsats av jämförelsen mellan de två metoderna visar att den traditionella metoden upptäckte och identifierade fler arter i allmänhet. Men genom den DNA-baserade metoden (i) upptäcktes fler IAS (högre taxonomisk specificitet), (ii) hittades IAS oftare (högre känslighet) och (iii) gick det att upptäcka IAS i planktonprover (tidig varning).

Summary

Global shipping carries over 90 percent of world goods and is expected to play an increasing role in the future in terms of global trade. Shipping affects the environment in various ways, one being the transfer of harmful aquatic organisms and pathogens with ballast water releases. The significance of ballast water as a vector for foreign and invasive alien species (IAS) eventually led to the adoption of the UN International Convention for the Control and Management of Ship's Ballast Water and Sediments. The Convention entered into force in September 2017, and states that the spread of harmful (invasive) species with ships' ballast water and sediment shall be prevented and ultimately eliminated. It is the responsibility of ships in international traffic to install facilities for the management of ballast water, although it is possible to apply for exemption subject to certain conditions. In order to apply for exemption, listed IAS which are likely to be spread by ship transport must be investigated in current ports. Port surveys are also important for management purposes.

In this report, traditional methods are compared with novel approaches of conducting fauna surveys in port areas. To this end, plankton and benthos samples were taken and then manually sorted to identify all specimens to species or higher taxonomic level (genus, family, phylum). At the same time, parallel samples were processed with a genomic approach where DNA was extracted from bulk samples without previous sorting, and species were identified based on DNA metabarcoding. DNA was sequenced using next generation sequencing techniques (Illumina), and the resulting sequences were matched against taxonomic reference sequences from public archives and target species databases.

The traditional method found 212 taxa overall, of which 131 taxa (62 percent) could be identified to species level. Four of these are listed as non-indigenous/invasive alien, and two of them are on the target species list of the HELCOM/OSPAR area: *Mnemiopsis leydi* och *Crassostrea gigas*. The DNA method recognized 153 taxa, of which 119 taxa (77 percent) could be determined to species level. This approach found five invasive alien species, all on the target species list : *Acartia tonsa*, *Crassostrea gigas*, *Crepidula fornicata*, *Amphibalanus improvisus* and *Caprella mutica*. *Mnemiopsis leydi* had been excluded from the plankton samples before they were put into ethanol and prepared for DNA extractions. Of the EU list of IAS where only one marine species exists, no match was made.

More species were identified from the settling plates (75 percent) and the benthic samples (82 percent), using the manual method compared to the DNA-based (56 percent and 64 percent respectively). However, when it comes to the zooplankton, the DNA based method identified more species (66 percent), compared to the traditional approach (9 percent) and found four invasive alien species, compared to none in the case of the traditional method. The DNA

based method found three invasive species in the benthic sample, compared to none analysed by the traditional method.

A conclusion of the comparison between the two methods is that the traditional method found, and identified, more species in general. However, the DNA based method found (i) more invasive alien species (higher specificity); (ii) found invasive alien species more often (higher taxonomic sensitivity); and (iii) could detect invasive alien species in the plankton samples (early warning).

Bakgrund

Främmande, och invasiva främmande arter

Främmande arter är arter som med någon form av mänsklig aktivitet har förts utanför sitt naturliga utbredningsområde. Detta kan ha skett avsiktlig som till exempel för signalkräfta och fasan, eller oavsiktligt som till exempel spridningen av spansk skogssnigel. Bara för att en art är främmande arter behöver den inte påverka vårt ekosystem negativt – en del kan även medföra positiva effekter, eller så har de inga effekter alls. Invasiva främmande arter (IAS) kallas de arter som har negativ effekt på:

- biologisk mångfald
- hälsa
- socio-ekonomi

Vad som menas med invasiv blir en definitionsfråga och det finns flera olika nationella listor på vad som bedöms som IAS. När det kommer till ansökan om undantag från IMO:s barlastvattenkonvention så definieras IAS utifrån s.k. målarter som finns på olika (angivna) listor.

Uppdraget

På uppdrag av Havs- och vattenmyndigheten har Marine Monitoring och SeAnalytics testat och utvärderat metoder för övervakning av invasiva främmande arter (IAS) i hamnar och farleder. Uppdraget är ett pilotprojekt som syftar till att utvärdera DNA-baserade metoder för att identifiera arter och jämföra detta med traditionella metoder. Utvärderingen görs genom att ta parallella prover från ett antal provpunkter (provtagningsmetodik enligt Granhag 2016 och HELCOM 2014a) varav ett prov har analyserats med traditionell teknik inom projektet *Test och utvärdering av ny övervakning av främmande arter i hamnar* (Bergkvist *et al.* 2017), och ett prov har analyserats genom s.k. DNA-metabarkodning (metastreckkodning).

Inledning

Det har varit känt i över 100 år att arter kan spridas med fartyg i deras barlastvatten, eller som påväxt, men det var först på 1970-talet som biologer undersökte vilka arter som kunde finnas i barlastvattnet. Uppskattningar finns på att mellan 3 000–7 000 arter varje dag färdas runt i fartygs barlastvatten (Gollasch *et al.* 2015), bakterier och virus inte inräknade. Det är huvudsakligen frilevande former som plankton och larver som kommer med i barlastvattnet, men även fiskar upp till 15 centimeter har påträffats i barlasttankar (Gollasch *et al.* 2002). Miljön i ballasttankar är ogynnsam för de flesta organismer och

merparten av organismerna dör inom 3–5 dygn (McCollin *et al.* 2008). Trots det finns exempel på organismer som har överlevt flera månader i den här miljön, och även exempel på små kräftdjur som har förökat sig i tankarna (Gollasch *et al.* 2000). De allra flesta överlever inte resan eller klarar sig inte i den nya miljö de kommer till. De som däremot etablerar sig kan i vissa fall bli så pass framgångsrika att de tränger undan den inhemska florán och faunan. I den nya miljön saknas ofta naturliga kontrollmekanismer, t.ex. bakterier, virus, parasiter, rovdjur och betare, som finns i artens ursprungsområde, vilket kan leda till att arten sprids snabbt och får stora effekter på ekosystemet. Vissa främmande arter för också med sig sjukdomar (bakterier, svamp, virus) som är nya för inhemska arter och som dessa inte har kunnat bygga upp ett skydd emot. På så sätt kan en främmande art fungera som vektor och ta med sig andra främmande, skadliga eller smittsamma organismer. Främmande, introducerade, arter som har en negativ inverkan på ekosystem och hälsa benämns *invasiva*.

När en främmande art blivit etablerad är det näst intill omöjligt att få bukt med den. I de fall där en främmande art har utrotats från ett område beror det på att den upptäckts tidigt och att snabba insatser för att få bort den har satts in (Williams & Grosholz 2008). Det är därför viktigt att det finns en kontinuerlig övervakning av främmande arter både på land och i vatten, men kanske ännu viktigare är att förhindra ytterligare spridning av arter. FN:s internationella sjöfartsorgan beslutade 2004 om den internationella konventionen för kontroll och hantering av fartygs barlastvatten och sediment (IMO 2004). Konventionen trädde i kraft den 7 september 2017 och innebär att alla fartyg ska hantera sitt barlastvatten efter specifika kriterier. De flesta fartyg kommer att behöva installera ett system för behandling av barlastvattnet för att bli av med oönskade organismer. För existerande fartyg kommer kraven på behandling av barlastvatten fasas in gradvis vilket i realiteten innebär en övergångsperiod på sju år. För påväxt på båtskrov finns ingen konvention än, men det finns riktlinjer att följa för att minska risken att sprida främmande arter via påväxt (IMO 2011).



Figur 1. Blåskrabba (*Hemigrapsus sanguineus*) har hittats på några lokaler utmed svenska västkusten (bl.a. Hönö och Lysekil). Den utkonkurrerar inhemska arter och kan finnas i stora mängder, upp till över etthundra individer på en yta av en kvadratmeter. Med tanke på att den har upptäckts runt hamnar finns det anledning att tro att den kommit hit med barlastvatten (foto P. Sundberg).

Det finns möjligheter för fartyg att ansöka om undantag från kravet att behandla sitt barlastvatten. Det gäller framförallt de som seglar på en bestämd rutt, som till exempel färjor som går mellan två hamnar. Som underlag för en ansökan om undantag måste det finnas uppgifter om vilka IAS som eventuellt redan finns i de aktuella hamnarna, och om inte samma (invasiva) organismer är närvarande i bägge hamnar krävs en analys av risken av spridning mellan hamnarna. Undantag kan beviljas om samma fauna finns i bägge hamnar, och/eller om ingen risk för spridning mellan de aktuella hamnarna föreligger.

Havsmiljökonventionerna Helcom för Östersjön och Ospar för Nordsjön har satt upp gemensamma riktlinjer (Joint harmonized procedure) för på vilka grunder undantag kan beviljas, och vilket förarbete som krävs (HELCOM 2015). Grundläggande är att aktuella hamnar undersöks med avseende på de s.k. målarter (target species) som finns listade. Dessa listor uppdateras kontinuerligt och idag finns ett drygt 60-tal arter listade. Till detta kommer arter på EU-listan som tar upp ytterligare IAS som ska övervakas. Arter på unionsförteckningen regleras genom EU:s förordning (1143/2014) om invasiva främmande arter och arterna får exempelvis inte importeras eller föras in, avsiktligt födas upp eller släppas ut i miljön. När det gäller övervakningen av IAS är identifiering till art en helt avgörande faktor. I andra typer av

övervakning och analys av biodiversitet kan det ibland räcka med att identifiera organismer till mer inklusiva taxa som släkte, familj eller kanske bara djurstam, men det fungerar av naturliga skäl inte för IAS. Det kan få stora konsekvenser om organismer identifieras till fel art. Exempel på detta är sjöstjärnearten *Asterias amurensis* som troligen kom till Australien i början av 1980-talet, men felidentifierades som den inhemska arten *Uniophora granifera*. Det var inte förrän 1992 (Zeidler 1992) som misstaget upptäcktes, men då var arten så vanlig och väl etablerad att den inte gick att få bort. När det gäller IAS är ett annat potentiellt problem att de per definition kommer från geografiska områden som den lokala taxonomiska expertisen inte är bekant med. Risken är då att invasiva främmande arter döljs under arter identifierade som okänd art (sp.).

Det framstod tidigt att DNA-tekniken kunde användas för att identifiera individer till art, att det går att hitta delar av den genetiska koden (en molekylär markör eller fingeravtryck) som är tillräckligt konservativ inom en art, men ändå skild från andra arter, så att denna markör kan kopplas till ett artnamn. Begreppet DNA-barkodning (streckkods-taxonomi – även den engelska benämningen "barcoding" används i svensk text) myntades på 2000-talet och i början handlade det om att utifrån en databas med referenssekvenser kopplade till säkert identifierade artnamn kunna bestämma en okänd organism genom sekvensering av en överenskommen molekylär markör. DNA-baserad identifiering av en individ innebär att DNA extraheras från organismen, sekvenseras och att sekvensen sedan matchas mot en *referensdatabas*. I denna databas finns DNA-sekvenser kopplade till namn på arter. Dessa sekvenser är baserade på vävnad (eller annan DNA-källa) från individer som experter inom taxonomi har identifierat till namn med den säkerhet som går att erhålla. För flercelliga djur föreslogs från början att sekvenser från mitokondriellt DNA (för den specifika genen som kodar för cytokrom c oxidase I, eller COI mtDNA) skulle användas, vilket har visat sig fungera för de flesta djurgrupper (Hebert *et al.* 2003). Men COI fungerar inte för alla grupper, och det är ett pågående utvecklingsarbete när det gäller vilken, eller vilka, markörer som kommer att användas i framtiden. Själva sekvenseringen i de här fallen är billig – kostnaden ligger i insamlingen och sorteringen. Den bioinformatiska analysen, d.v.s. matchningen av sekvenser mot databasen, är förhållandevis enkel.

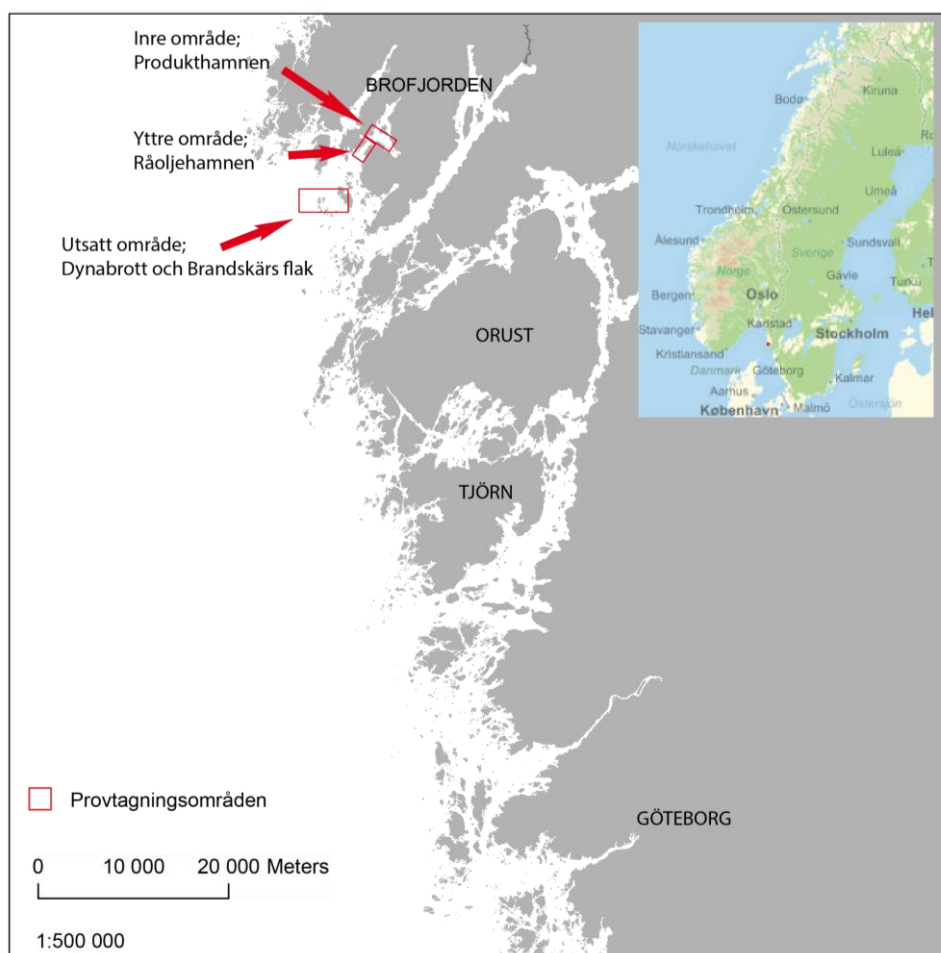
Övervakningsprogram går normalt till så att de insamlade organismerna först sorteras och därefter bestäms varje individ till art, eller den taxonnivå som är möjlig. I det här fallet kan DNA-barcoding användas för att ge artnamn på organismer som är svåra att bestämma. För att komma ifrån sorteringsmomentet går det att som alternativ slå samman hela provet och extrahera DNA ur provet utan föregående sortering. Därefter amplifieras DNA med konservativa, mer generella primers, och sekvenseras. Dessa sekvenser kan sedan matchas mot databaser för att hitta specifika arter, om de finns i biblioteket, eller för att få en översikt av den systematiska/taxonomiska sammansättningen i provet. I Bourlat (2016) återfinns olika protokoll för DNA-metabarkodning, och exempel från akvatiska miljöer är Bourlat *et al.* (2016) samt Leray *et al.* (2016).

I den här studien jämförs den traditionella metoden (sortering och identifiering av de funna organismerna) med DNA-metabarkodning. Syftet är att undersöka vilken metod som har bättre taxonomisk upplösning alternativt vilken som är mer kostnadseffektiv. I tillägg diskuteras även eDNA som ett alternativ till den i studien använda tekniken och förutsättningarna för andra DNA-baserade metoder. Se även Sundberg *et al.* (2016) för en genomgång och belysning av olika DNA-baserade metoder för övervakning av IAS.

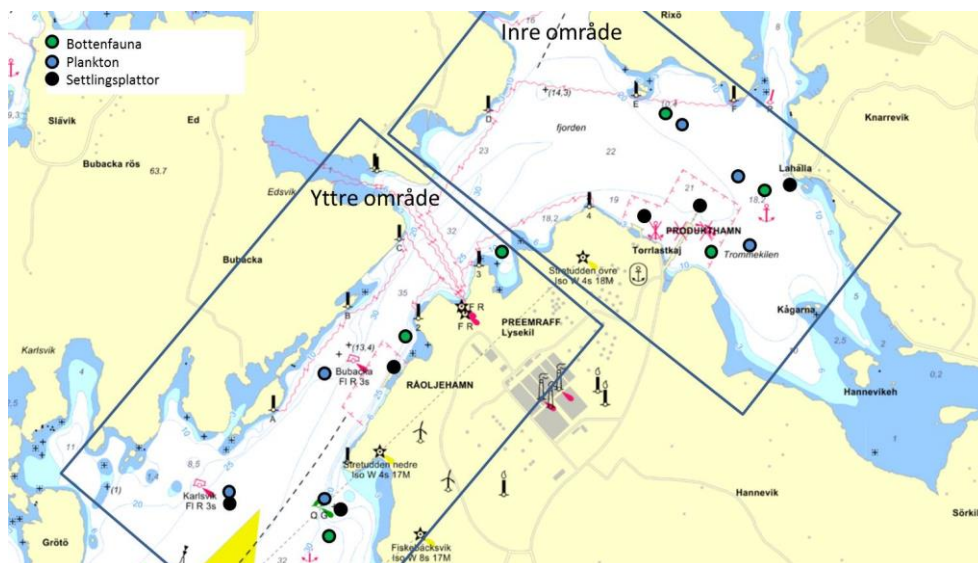
Metod

Provtagningsområden

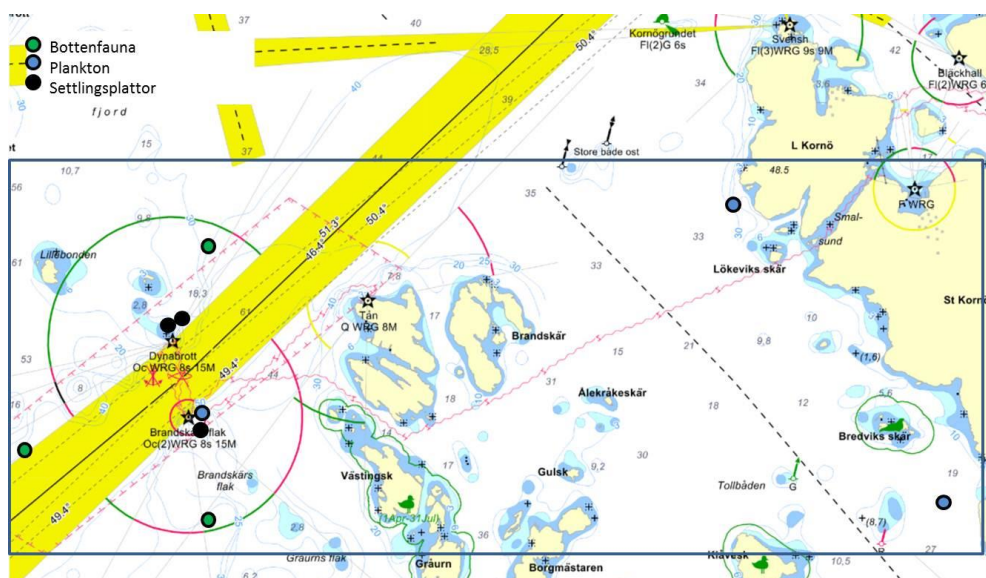
Som provtagningsområde valdes Preems hamn i Brofjorden norr om Lysekil (Figur 2). Hamnen är, sedd till hanterad godsmängd, den näst största hamnen i Sverige och har Skandinavien största raffinaderi som anlöps av cirka 1700 fartyg varje år. Inom hamnområdet undersöktes två områden, ett inre vid Produkthamnen och ett yttre vid Råoljehamnen (Figur 3). Som utsatt område för främmande arter, eller *hotspot*, valdes Dynabrott och Brandskärs flak vilka markerar inloppet till Brofjorden (Figur 4). Inom varje område utfördes provtagning på tre stationer, positionen varierade med typ av prov (Bilaga I). Båt (längd ca 6 m) användes till all provtagning förutom utplacering och upplockning av settlingspaneler vid Produkthamnen och Råoljehamnen.



Figur 2. Karta över provtagningsområden i Brofjorden och farleden utanför.



Figur 3. Karta över det inre området vid Produkthamnen och det yttre vid Råoljehamnen. Stationer för de olika provtagningarna är utmärkta med cirklar.



Figur 4. Karta över området vid Dynabrott och Brandskärs flak. Stationer för de olika provtagningarna är utmärkta med cirklar.

Provtagning och analys

Provtagning utfördes i huvudsak enligt *Metoder för övervakning av främmande arter. Protokoll för provtagning i hamnar och farleder* (Granhag 2016) samt Havs- och vattenmyndighetens förslag på *undersökningstyp: Främmande arter* och beskrivs kortfattat nedan (Havs- och vattenmyndigheten utkast). Analys med traditionell metodik av mjukbottenlevande fauna och påväxtorganismer på settlingspaneler utfördes av personal på Marine Monitoring. Djurplanktonproverna analyserades av National marine fisheries research institute, Plankton sorting and

identification centre, i Szczecin, Polen. Samma sorteringsmetod ansträngning för taxonomisk specificitet har använts som i miljöövervakningens programområden Kust & Hav (HELCOM 2014c). De prover som togs sammanfattas i tabell 1. För bottenfauna, settlingspaneler och djurplankton togs vid samma tillfällen parallella prover som fixerades i 96 procent alkohol för senare DNA-extraktion och genomisk analys vilken utfördes av SeAnalytics. Alkoholen i dessa prover byttes ut en gång efter provtagning för att undvika utspädningseffekter och risken för att proverna skulle brytas ner av bakterieaktivitet. Proverna förvarades i -20 °C frys fram till extraktion.

Tabell 1. Den planerade provtagningen.

Provtyp	Områden	Stationer	Antal prov	Totalt
djurplankton	3	3	1	9
mjukbottenlevande fauna	3	3	1	9
påväxtorganismer (settlingspaneler)	3	3	1	9
Totalt				27

Djurplankton

För djurplankton användes två nät med maskstorlek på 90 µm respektive 500 µm. På varje station drogs tre drag med respektive håv, som slogs ihop till ett prov per håv. Proverna fixerades i fyraprocentig formalin, med undantag för gelatinösa arter (som maneter, Scyphozoa) som plockades ut och identifierades direkt. För DNA-analys gjordes ett drag med respektive håv som slogs ihop till ett prov per station. Prover för DNA-analys fixerades i 96-procentig etanol och förvarades i -20 °C fram till analys. Djurplanktonproverna analyserades enligt *Helcom Combine manual Annex C7 Mesozooplankton* (HELCOM 2014b).

Mjukbottenlevande makrofauna

Prover på mjukbottenlevande makrofauna togs med Ponar-huggare från båt. Stationerna fördelades för att täcka in områdena med avseende på sedimenttyp och djup. På varje station togs fyra prover, tre för analys med traditionell metodik och ett för DNA-analys. Proverna sållades i 1 mm såll och fixerades i 70-procentig etanol med tillsats av fyra procent glycerin. Prover till DNA-analys fixerades i 96-procentig etanol och förvarades i -20 °C fram till analys. Analys av proverna utfördes enligt *Undersökningstyp Mjukbottenlevande makrofauna, trend- och områdesövervakning* (Havs- och vattenmyndigheten 2016) och *Helcom Combine manual Annex C8* (HELCOM 2014c).

Påväxtorganismer

Settlingspaneler i pvc (polyvinylklorid) användes för att fånga 3–4 månader gammal påväxt (Figur 5). Panelenheterna hängdes från pirar, bryggor och farledsbojar inom de tre områdena. Varje panelenhet bestod av ett polypropenrep (diameter 5 mm) med fyra rektangulära pvc-plattor, satta på 1, 3, 4 och 7 m djup, med en tegelsten eller ankare som tyngd. Plattan på 4 m djup användes till DNA-analys. I den aktuella undersökningen förstärktes panelenheterna med en 8 mm polysteel-lina med en brottstyrka på 1200 kg. Plattorna sandpapprades tre gånger vertikalt och tre gånger horisontellt för att få ett ruttmönster som underlättar settling. Panelerna sattes ut i juni och togs

upp i september/oktober 2017. Vid upptagning klipptes repet av och plattorna placerades i individuella plastpåsar med havsvatten för att organismerna inte skulle förstöras. Vid analys noterades täckningsgrad av organismer på hela plattan (över- och undersida) samt tre delprov per sida.

Flora och fauna som ansågs vara påväxtorganismer analyserades ingående, och associerad fauna gick igenom översiktligt.

DNA-metabarkodning

Vid analys genom DNA-metabarkodning mixades hela provet och DNA extraherades ur provet utan föregående taxonomisk sortering. Därefter amplifierades DNA med konservativa, mer generella genetiska markörer, s.k. primers, för att slutligen sekvenseras. Dessa sekvenser matchades mot befintliga databaser (GenBank, BOLD) för att hitta specifika arter, eller för att få en översikt av den systematiska/taxonomiska sammansättningen i provet. Den använda metoden för DNA-metabarkodning är beskriven i Bilaga II.

Resultat

Traditionell metodik

I proverna från djurplankton, mjukbottenlevande fauna och påväxtplattor hittades totalt 212 taxa, varav ungefär 131 taxa (62 procent) kunde identifieras till art (Tabell 2). Fyra arter (1,9 procent) påträffades som anses främmande i svenska vatten (Bilaga III). Dessa var amerikansk kammanet (*Mnemiopsis leidyi*), japanplym (*Dasysiphonia japonica*), japanskt jätteostron (*Crassostrea gigas*) och slät havstulpan (*Amphibalanus improvisus*). Listor på identifierade taxa för de olika provtagningarna finns i Bilaga IV–VI. Två av arterna, *M. leidyi* och *C. gigas* finns med på Helcoms och Ospars ”Target species list” vilken listar de arter som är av speciell betydelse i samband med konventionen för kontroll och hantering av ballastvatten (HELCOM 2017). I flera fall, framför allt inom djurplankton, gick det inte att bestämma ned till art.

Djurplankton

Bland de cirka 61 taxa av djurplankton som registrerades var den enda främmande arten amerikanska kammanet *M. leidyi* (Tabell 2 och Bilaga IV). Denna art är en av de mer beryktade IAS då den orsakade en närmast total kollaps av ansjovisfisket i Svarta havet i början på 1990-talet. I svenska vatten observerades den för första gången i Kosterfjorden 2006. Den största delen av djurplanktonen, ca 50 taxa, kunde inte bestämmas till art. En del av de oidentifierade taxa var larver av bland annat fisk, tagghudingar och snäckor. Många hoppkräftor (Copepoda) i olika utvecklingsstadier identifierades enbart till släkte.

Mjukbottenlevande fauna

Inga främmande arter hittades bland de 123 taxa av mjukbottenlevande fauna som identifierades inom undersökningen (Tabell 2 och Bilaga V). De vanligast förekommande arterna sett till antal var ormstjärnorna *Amphiura filiformis* och *A. chiajei*, musslan *Myrella bidentata* samt havsborstmasken *Melinna albicincta*. Av 123 taxa kunde 18 inte identifieras till art (Tabell 2).

Påväxtorganismer

Av de settlingspaneler som sattes ut i juni 2017 fanns bara enheten vid Råoljekajen och den västra av de två panelerna i Produkthamnen kvar vid upptagandet i september/oktober. De övriga hade troligen slitits loss på grund av påverkan från hårt väder. På de paneler som fanns kvar hittades tre främmande arter: japanplym *D. japonica*, japanskt jätteostron *C. gigas* och slät havstulpan *A. improvisus*. Påväxten varierade med djup och station, totalt hittades 28 taxa på panelerna varav 7 inte kunde identifieras till art (Tabell 2). På plattorna från Produkthamnen var tarmsjöpfung (*Ciona intestinalis*) vanlig och dominerade helt på 7 meters djup (Figur 5A). Tarmsjöpfung är inhemsk här, men den är en beryktad invasiv art på andra ställen i världen. Vid Råoljekajen var slät havstulpan (*A. improvisus*), blåmussla (*Mytilus edulis*) och mossdjur (*Bryozoa*) dominerande (Figur 5B) (Bilaga VI).



Figur 5. Påväxt på settlingspaneler som hängt ute i tre till fyra månader. På bild A dominerar tarmsjöpfung (*Ciona intestinalis*) helt. I bild B är flera olika arter representerade, till exempel havstulpaner, mossdjur och sjöpungr.

DNA-baserad analys

I proverna från djurplankton, mjukbottenlevande fauna och påväxtplattor hittades totalt 153 taxa, varav 119 taxa (77 procent) kunde identifieras till art (Tabell 3). Fem arter påträffades som anses främmande i svenska vatten (Bilaga III), tre av dessa (hoppkräftan *Acartia tonsa*, ostronpest *Crepidula fornicata*, spökräkan *Caprella mutica*) kunde inte identifieras manuellt. Dessa tre arter finns med på Helcoms och Ospars "Target species list".

Tabell 2 och 3 är sammanställningar av antalet taxa som hittades i de olika proven med de olika metoderna. De två metoderna kunde tillsammans identifiera 368 taxa, varav 250 kunde bestämmas till art. Av dessa är det bara 20 arter som båda metoderna har identifierat, så antalet "unika" arter är 230. Strand (2017) fann samma förhållande mellan traditionell och DNA-baserad identifikation av taxon. Att de två metoderna inte hittar samma arter kan delvis förklaras med att DNA-metoden kräver att arten måste finnas ett referensbibliotek för att en funnen sekvens ska kunna matchas mot ett artnamn (se Sundberg *et al.* 2016 för en fördjupad diskussion). En annan förklaring är att det största antalet taxa hittades bland zooplankton (Tabell 3), där den traditionella metoden har störst problem med identifieringen. Det större antalet taxa hos den mjukbottenlevande faunan som hittades med traditionella metoder beror sannolikt på att prover togs i triplikat för den analysen, medan endast ett prov per station togs för DNA-analys. Vid jämförelse med ett replikat per station blir antalet funna taxa nästan detsamma för de båda metoderna, men andelen identifierade till art är fortfarande större med traditionella metoder (82 procent) än med DNA-analys (64 procent). Samtidigt hittades flera arter med DNA-analys som inte kan anses vara bottenfauna och som därför inte noterades med den traditionella metoden. Med DNA-analys hittades även fler arter på settlingsplattorna, trots att bara en platta per station

analyserades jämfört med tre plattor för den traditionella metoden. Skillnaden här beror sannolikt på att den traditionella metoden på grund av oklarheter i metodbeskrivningen fokuserade på påväxtorganismer och endast översiktligt analyserade associerad fauna.

En ytterligare faktor som bidrar till skillnaden i dels antalet arter dels vilka arter som hittas i proverna är att de traditionella metoderna bortser från arter som inte ingår i metodbeskrivningen medan DNA-metoden analyserar allt som finns i proverna. Detta leder till att det i listan för arter hittade i bottenfaunaproverna med DNA-metoden bland annat finns flera fiskarter, hoppkräftor och människa (bilaga V). Dessutom påträffades med DNA-metoden tre främmande arter i bottenfaunan, ingen av dessa är dock arter som räknas som infauna vilket kan vara anledningen till att de inte bestämts till art med den traditionella metoden. Även i analysen av settlingsplattorna förekommer flera skillnader i artförekomst då den traditionella analysen bara tittat på arter som kan klassas som påväxt medan DNA-metoden analyserat även organismer som inte är påväxt samt att DNA-analysen inte använde markörer för alger (bilaga VI).

Tabell 2. Sammanställning av antalet taxa funna med traditionell metod för taxonomisk identifikation, samt andel som har kunnat identifieras till art.

Traditionell identifikation				
	zooplankton	mjukbotten	settlingsplatta	Totalt
antal taxa	61	123	28	212
identifierade till art	9	101	21	131
andel identifierade	15 %	82 %	75 %	62 %
främmande/invasiva	1	0	3	4

Tabell 3. Sammanställning av antalet taxa funna med DNA-baserad metod för taxonomisk identifikation, samt andel som har kunnat identifieras till art.

DNA-identifikation				
	zooplankton	mjukbotten	settlingsplatta	Totalt
antal taxa	143	72	52	153
identifierade till art	95	46	29	119
andel identifierade	66 %	64 %	56 %	77 %
främmande/invasiva	4	3	2	6

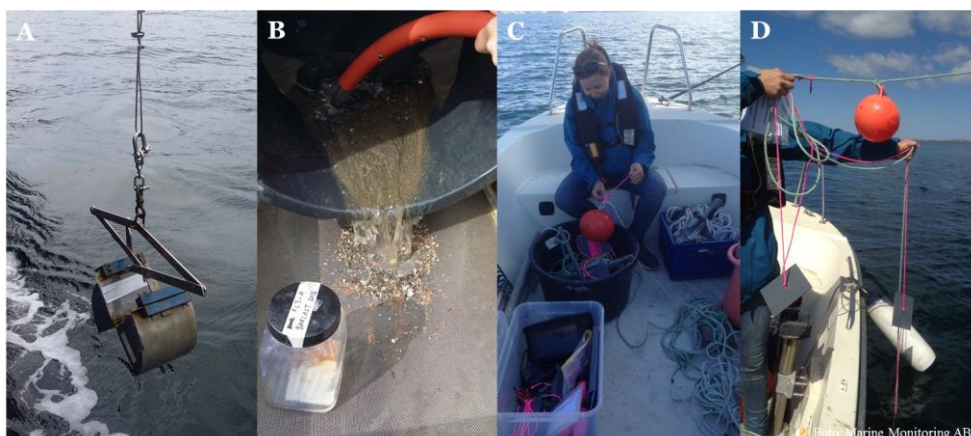
Tidsåtgång – provtagning, identifiering

För det antal prover som togs för DNA-analys var provtagningstiden 49 timmar och motsvarande analysid 119 timmar. I provtagningstiden är båttid och även moment som förberedelser och sällning av prover inräknad (Tabell 4).

Artbestämning av djurplankton utfördes på externt laboratorium, analysiden uppskattades till sex timmar per prov.

Tabell 4. Tidsåtgång i timmar för de olika momenten utförda av Marine Monitoring. Antal prov avser antal prov per station. Analys av djurplankton utfördes av externt laboratorium, tidsåtgång för denna analys är ungefärlig och anges inom parentes.

Moment	Stationer	Antal prov (per station)	Provtagning (timmar)	Analysid (timmar)	Totalt (timmar)
djurplankton	9	1	12	(54)	66
bottenfauna	9	1	19	60	79
plattor	2	1	18	5	23
Totalt (timmar)			49	119	168



Figur 6. Provtagning av bottenfauna (A och B) och utplacering av settlingsplattor (C och D).

Sju av de planerade proverna (settlingsplattor) återfanns inte (ovan); en av plattorna hade så mycket påväxt att den delades upp i delprover för DNA-analys. Totalt 24 prover analyserades med avseende på DNA.

Tabell 5. Tidsåtgång för de olika analysmomenten för DNA-baserad identifiering utförda av SeAnalytics AB, baserat på 24 prover. Kostnader för reagenser och sekvensering specificeras i Bilaga VI.

Moment	Timmar
manuell sortering	48
DNA-extraktion	36
PCR, uppbyggnad av DNA-markörbibliotek	8
bioinformatik, tabeller	40
Totalt	132

Kommentar: Eftersom detta är ett pilotprojekt inkluderar antalet redovisade timmar även utvecklingstid för hur proverna bästa skall hanteras, sällas, extraheras, m.m. Antalet timmar kan reduceras i det fallet detta skulle bli en rutinmetod för övervakning när arbetsrutinerna är upparbetade, och det finns moment som med fördel skulle kunna automatiseras. Till exempel så visade det sig att det var mycket organismer (till exempel många sjöpungar på tillväxtplattorna) i många av proverna och dessa fick sorteras och sällas innan DNA extraktion. Momentet manuell sortering kan därför reduceras avsevärt med mer utarbetade rutiner vid själva provtagningen. Likaså kan momentet DNA-extraktion kortas i tid med mer automation och fler instrument. Kostnaderna ökar inte linjärt med antalet prover. Exempelvis skulle tiden för den bioinformatiska delen bara påverkas marginellt med ett ökat antal prover.

I studien *Metodutveckling: Artbestämning av bottenfauna inom marin miljöövervakning* (Strand 2017) där traditionell och DNA-baserad artidentifiering (med samma metoder) jämförs beräknas framtida tidsåtgång (10 prover) till i storleksordningen 56 timmar. I den beräkningen finns inte momentet "manuell sortering" inräknat.

Utvärdering

Alla förordningar, och allt regelverk, rörande främmande arter och IAS är baserade på att arter anges som de Linneanska namnen. I övervakningen av IAS är det därför avgörande att kunna bestämma individer till art – i andra övervakningsprogram kan det räcka med att rapportera individer till högre taxa (som släkte, familj, eller fylum). Men per definition innebär övervakning av IAS att det är av stor betydelse kunna identifiera individer till art. Detta kan leda till tidig upptäckt av nya introduktioner och undvika sammanblandning av arter med lägre taxonomisk upplösning som leder till att arter identifieras som inhemsk, eller främmande men inte invasiv. Det finns dock många hinder i den processen. Organismer kan till exempel bli skadade i själva provtagningen på ett sätt så att de blir omöjliga att bestämma till art. Metodbeskrivningarna för analys av proverna kan minska sannolikheten att hitta främmande arter. Vid analys av mjukbottenfauna tas till exempel inte organismer som sitter på stenar och liknande med, vilket kan vara en av anledningarna till att havstulpanen *Amphibalanus improvisus* hittades i mjukbottenproverna med hjälp av DNA-analys men ej med traditionella metoder. Vidare är juveniler och vissa djurgrupper, till exempel fåborstmaskar (Oligochaeta) och slemmaskar (Nemertea) svårbestämda. Det största hindret är dock förmodligen brist på den taxonomiska kompetens som lyfts fram som nödvändig i *Metoder för övervakning av främmande arter. Protokoll för provtagning i hamnar och farleder* (Granhag 2016) samt Havs- och vattenmyndighetens förslag på *undersökningstyp: Främmande arter*. Traditionella metoder för att identifiera arter bygger huvudsakligen på yttre så kallade morfologiska karaktärer. I havet finns representanter för alla djurstammar och det finns ingen möjlighet för någon att kunna identifiera alla arter. Taxonomer är oftast experter på en eller högst några djurstammar, och när det gäller artrika grupper kan de flesta inte hela gruppen, utan har specialiserat sig på undergrupper. Taxonomer blir alltså helt beroende av bestämningslitteratur när de stöter på organismer som de inte direkt känner igen sedan tidigare.

Ett problem med bestämningslitteratur är att den ofta är regional, och IAS per definition kommer från andra områden. Det är svårt att hålla sig med en uppdaterad uppsättning litteratur som täcker olika områden i världen. De listor på målarter som finns upprättade inom Helcom, Ospar och EU är därför viktiga för att kunna kontrollera att arter som inte känns igen inte är IAS. Dessutom visar modern DNA-baserad taxonomisk forskning att kryptiska arter är vanliga i alla undersökta grupper. Dessa arter är morfologiskt identiska men behöver inte vara nära släkt. Detta är ett fenomen som uppmärksammas alltmer, och ställer också mycket morfologibaserad identifikation på ända.

I den här studien gick det att med traditionella metoder artbestämma en stor del av organismerna, men de som är bestämda till högre nivå kan potentiellt innefatta arter som är främmande för svenska vatten. Den grupp där flest taxa inte kunde bestämmas till art var djurplankton, där 85 procent endast bestämdes till släkte eller högre nivå. Men även bland organismer från settlingsplattor och bottenfaunaprover förekom flera organismer som inte kunde bestämmas till art.

DNA-baserad identifiering av en individ innebär att DNA extraheras från djuret/växten, sekvenseras, som sedan matchas mot sekvenser i en referensdatabas. Den här ansatsen är användbar när en organism som inte kan bestämmas påträffas, och som kan misstänkas vara en av de invasiva målarter som ska speciellt övervakas. Men det är inte en teknik som passar för mer övergripande övervakning. Den metod som användes i den här studien, DNA-metabarkodning, tar bort momentet med att sortera och identifiera enskilda organismer. Istället kan DNA extraheras ur det hela, mixade provet, sekvenseras och sekvenserna matchas sedan mot olika databaser. För att detta ska fungera måste det finnas ett referensbibliotek där sekvenser på ett entydigt sätt är kopplade till Linneanska artnamn. Detta är en svaghet med tekniken. Finns inte arten i databasen hittas den inte heller, men precis som i fallet med traditionella metoder så går det ändå oftast att få besked om vilket släkte, eller kanske bara i alla fall vilken djurstam, det rör sig om.

DNA-metoden identifierade färre taxa än manuell identifiering, men graden av hur många som kunde identifieras till art är ungefär samma för båda metoderna, även om det skiljer sig åt mellan de olika typerna av prov. För zooplankton fanns det en markant skillnad mellan metoderna. Inte bara hittas fler taxa i proverna med DNA-metoden, utan en mycket större andel (66 procent jämfört med 15 procent) kunde också bestämmas till art. Detta är speciellt intressant eftersom det är inom denna grupp som det är svårast att använda morfologiska karaktärer för att identifiera arter – plankton är små och inom många grupper är plankton och larvstadier omöjliga att skilja åt. Samtidigt är det i denna grupp av organismer som många IAS kan förväntas hittas redan i etableringsstadiet. Till exempel så indikerade DNA att det fanns mycket larver av *Crassostrea gigas* i vattnet. Den här arten är nu väletablerad i Sverige, och det är möjligt att det varit i ett planktonprov som dess larver först kunde ha upptäckts. DNA tekniken kunde identifiera ytterligare tre arter på Helcom/Ospar-målartslistan som den traditionella tekniken inte kunde identifiera.

En svårighet vid jämförelsen mellan traditionell och DNA-baserad identifiering är skillnaden i vilka organismer som identifieras med de olika metoderna. Metodbeskrivningarna som följts för den traditionella identifieringen innebär att vissa organismer inte bestäms till art då de inte anses tillhöra det som efterfrågas med metoden. För analys med DNA-baserade metoder görs ingen sådan avskiljning, därför hittas med DNA-metoden t.ex. arter i bottenfaunaproverna som traditionellt inte räknas som bottenfauna. I syfte att identifiera främmande arter är det dock en fördel att dessa arter upptäcks, men det bidrar till vissa problem i jämförelsen mellan metoderna. Även bestämningsintensiteten kan påverka antalet arter som identifieras med de olika metoderna, för den traditionella metoden gäller det hur mycket tid som läggs på att bestämma ned till art och för DNA-metoden hur många och vilka markörer som används.

Havs- och vattenmyndighetens alertlista och lista på främmande arter i svenska vatten samt Helcoms ”*Joint decision tool on alien species*”

introductions via Ballast Water” innehåller information om vilka arter som kan påträffas och som skall övervakas speciellt (Havs- och vattenmyndigheten, HELCOM 2017). I alertlistan finns arter som riskerar att sprida sig till svenska vatten och i listan på främmande arter finns arter som dokumenterats i svenska vatten. Om en undersökning har som syfte att identifiera förekomsten av just dessa arter, kan DNA-baserade metoder designas som på ett effektivt sätt skulle kunna avgöra förekomst. I det här sammanhanget bör det nämnas utvecklingen av s.k. eDNA -tekniker. Vi tar upp det i *DNA eller traditionell metodik* nedan.

Diskussion och rekommendationer

Hamnövervakning – vad är syftet?

Det är viktigt att klargöra vilket syfte övervakning av hamnar och farleder har, och vilket/vilka behov de skall uppfylla. Uppdraget från Havs- och Vattenmyndigheten uttrycks som "testa och utvärdera DNA-analyser av prover för framtida övervakning av *invasiva främmande arter*" (vår kursivering). Det är viktigt att myndigheten klargör vad som menas med detta, och vilka arter som skall övervakas. Det finns både nationella och internationella listor över IAS och det är viktigt att veta vad som skall letas efter. Det kan ju också vara så att alla främmande arter skall övervakas? Skall övervakningen ge en samlad bild av den biologiska mångfalden, som ett redskap för andra bedömningar kopplade till havsmiljödirektivet?

Svaret på de här frågorna påverkar speciellt om, och hur, DNA-baserade tekniker skall användas. Med den traditionella metodiken i Granhag (2016) kan alla dessa frågor beaktas i samma undersökning, men det är inte fallet med DNA-baserade metoder med samma självklarhet. Se nedan under "DNA eller traditionell metodik"

Statistisk analys

En avgörande fråga när en undersökning av IAS planeras är hur stor sannolikheten är att träffa på en art? Sannolikheten (prob) beror på hur många individer (N) det finns i hamnens area/alternativt volym (A), vilket kan uttryckas som täthet Q ($Q=N/A$). Vidare beror sannolikheten på hur stor area, eller volym (planktonprov) (Area) som samplas, antalet provpunkter (n) och hur effektiv (E) samplingen är. Med effektivitet menas hur bra identifieringen av arten fungerar, och hur bra insamlingsmetoden är på att fånga upp organismer.

För en kontinuerlig provtagning (som ett drag med planktonhäv) kan sannolikheten att träffa/upptäcka en art beskrivas med en Poisson-fördelning:

$$\text{prob} = 1 - e^{-(Q \times \text{Area} \times E \times n)}$$

För icke-kontinuerlig provtagning (t.ex. hugg) beskrivs sannolikheten bättre med en binomialfördelning, men den kan approximeras med Poissonfördelningen och därför är ekvationen ovan tillämplig för de aktuella typerna av provtagning.

Det är alltså tydligt att ju större insats vad gäller insamlingen (provpunkter, area) desto mer ökar sannolikheten att träffa på arten, men också effektiviteten

(E) att upptäcka arten är viktig. Se Hayes *et al.* (2005) för en diskussion om denna faktor för olika typer av substrat/insamlingsmetoder.

När det kommer till sannolikheten att upptäcka en invasiv art får även betydelsen av att begå s.k. Typ I- eller Typ II-fel läggas till. Typ I-fel i det här sammanhanget innebär att det felaktigt tros att en invasiv art har upptäckts. Detta kan leda till felaktiga beslut vad gäller till exempel risker för spridning. Å andra sidan kan det sägas att ett fel av den här typen skulle följa en försiktighetsprincip, medan ett Typ II-fel där det felaktigt tros att arten inte finns har större konsekvenser.

Detta kan också kopplas till vad som kan anses vara en "acceptabel risknivå". I övervakningssammanhang skulle det kunna betyda "hur stor insamlingsinsats skall sättas in för att minimera risken att inte hitta en art" även om den risken aldrig kan bli noll. Detta är en mer komplex analys, men det bör på något sätt beaktas när insamlingsinsatsen planeras in. Detta är också kopplat till insamlingens statistiska styrka eller power (kopplat till Typ II-felet ovan), alltså när det har bestämt på vilken nivå ett typ II-fel kan accepteras, d.v.s. att en invasiv art inte hittas, trots att den finns i området.

Hewitt & Martin (2001), i ett av de arbeten som ligger till grund för föreslagna protokollet i Granhag (2016), betonar vikten av hur provtagningen planeras för att maximera sannolikheten att hitta IAS. De skriver (Hewitt & Martin, 2001): "The baseline surveys should be designed to maximise the likelihood that target species in the port will be detected by concentrating sampling on habitats and sites in the port and adjacent areas that are most likely to have been colonised by these species. It is assumed that non-indigenous species with limited distributions are most likely to be detected near the point of inoculation. Knowledge of local conditions, activities and port-specific shipping patterns will strongly influence the sampling effort that is applied to any area of the port". Hewitt & Martin (2001) utvecklar också i samma arbete hur många prover som måste tas under olika tänkbara tätheter av den art man letar efter.

DNA eller traditionell metodik

Desto större volym eller area som provet tas från, desto större är sannolikheten att hitta en ovanlig art. Den teknik som enklast kan hantera stora volymer, och därmed täcka en större area än skrap, hugg och påväxtplattor, är planktonprovtagning. Dock kan påväxtplattor även ses som en provtagning över tid, och därmed täcker en större volym provtaget vatten, förutsatt att arterna av intresse settlar där eller kan leva där. Hayes *et al.* (2005) kommer också fram till att det kan vara kostnadseffektivt att fokusera hamnövervakningen på plankton, och då under perioder av fortplantning. Samtidigt är det tydligt att planktonprover är de mest problematiska att identifiera med traditionella metoder. I planktonproverna från denna undersökning identifierades både fler taxa, och fler arter, med DNA-metoden än med traditionell identifiering. Dessutom hittade DNA-metoden fyra IAS i planktonproven jämfört med en, amerikansk kammanet *Mnemiopsis leydi*, för

den traditionella analysen. Eftersom större gelatinösa organismer plockats bort (se ovan) innan de konserverades i etanol vet vi inte om DNA-metoden hade upptäckt också denna art.

Ytterligare ett alternativ kan vara att använda sig av det som nu har etablerats under akronymen eDNA. Generellt för denna teknik gäller att DNA från vatten (eller jord och luft) extraheras utan att organismerna först har isolerat eller samlats in såsom görs vid traditionell övervakning (se Sundberg *et al.* 2016). Metoden bygger på att alla levande organismer har artspecifik DNA som sprids på olika sätt till omgivningen, och som kan samlas in och analyseras. Det kan gälla både cellulärt och extracellulärt DNA – men i analyserna kan också hela organismer (som bakterier och encelliga djur) samlas in. DNA sprids i omgivningen via flera källor: urin, faeces, hudceller, kroppsekret, blod från sår, etc. Med eDNA barkodning kan vi leta efter namngivna arter (målarter) genom att använda artspecifika gensekvenser, s.k. primers (och prober) för att ”plocka” upp dessa arters DNA som sedan amplifieras med metoden *digital droplet polymerase chain reaction* (ddPCR) för att se om de finns i provet, vilket innebär att arten är närvarande. eDNA barkodning är nu ett etablerat och effektivt sätt att upptäcka arter av fisk, amfibier, och reptiler (t.ex. Goldberg *et al.* 2011; Thomsen *et al.* 2012 a,b). Lance & Carr (2012) använde eDNA för att upptäcka var zebramusslor hade etablerat sig i olika vattendrag. Thomsen *et al.* (2012a) kunde också visa att eDNA-tekniken var mer tillförlitlig när det gäller att hitta en grodort på platser där arten ansågs vara utdöd. Thomsen *et al.* (2012b) visade att eDNA även kunde användas i den marina miljön så den är inte begränsad till limniska habitat, även om det är i den miljön metoden hitintills har använts. Den här tekniken användes i Sundberg *et al.* (2017) bl. a. för att påvisa förekomsten av svartmunnad smörbult i Göteborgs hamn.

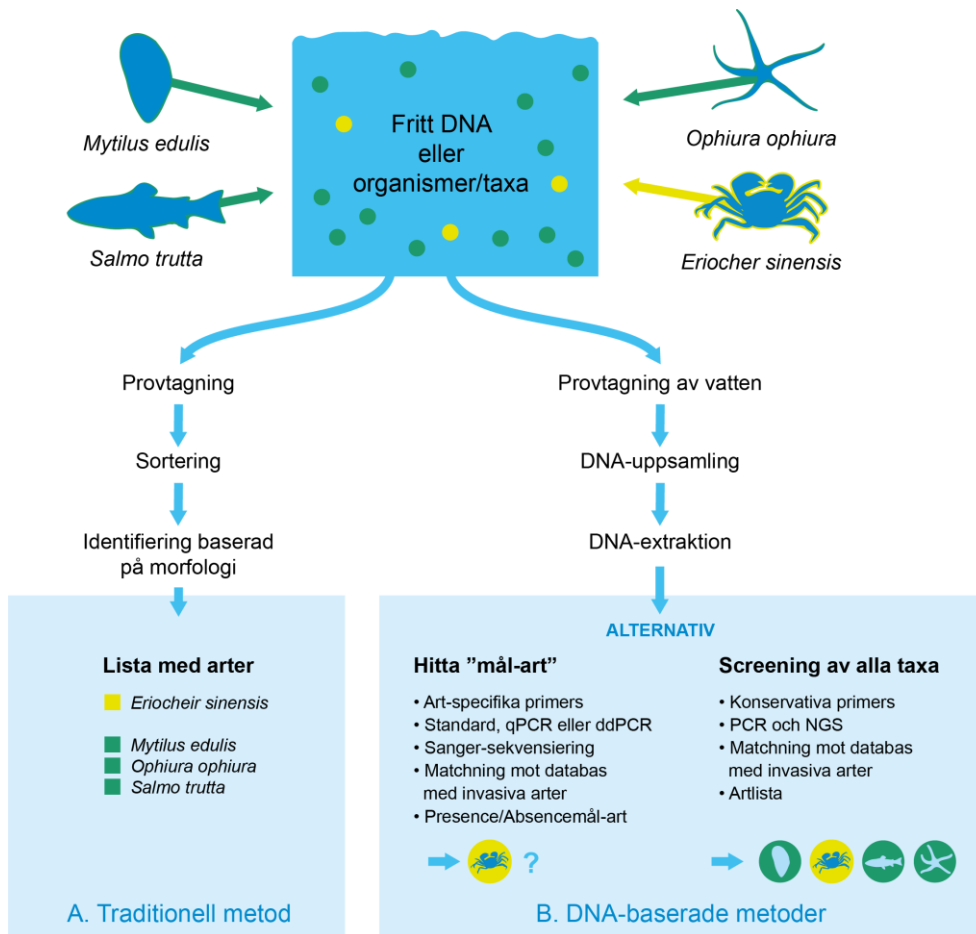
Med eDNA barkodning för att leta efter specifika målarter behövs ingen sekvensering och analysen kan vara klar på en dag. Provtagningen blir också enklare genom att bara ett vattenprov (1 liter) tas och filtreras i nära anslutning till provtagningstillfället. Kostnaden för tekniken ligger främst i design av primers och prober, möjligheten att testa dessa (positiva kontroller på vävnad av aktuell art), utreda hur länge DNA kan finnas i vattnet och risken för falska positiva resultat. Nedan är ett citat ur Sundberg *et al.* (2017) vad gäller kostnaden (det skall betonas att detta är dagsaktuella siffror 2017 som kommer att justeras kopplat till teknikutvecklingen):

”Sammantaget, för förbrukningsmaterial, kostar ett prov cirka 270 kronor om man analyserar i endast 1 brunn, eller som i vårt fall med fyra brunnar blir kostnaden cirka 450 kronor. Tid för extraktion och PCR-körning beräknar vi till 45 minuter per prov, men den kostnaden minskar om flera prover körs samtidigt. Själva provtagningen och filtreringen av varje prov tar runt 20 minuter, men då är inte inräknat reskostnader till provlokal.

Notera att flera arter kan analyseras utifrån ett prov/en extraktion, så det går inte att bara multiplicera 450 kronor med antalet arter som man vill leta efter. Om man till exempel vill leta efter fem arter utifrån ett prov skulle kostnaden bli $(270 + 5 \times 240 \text{ (fyra brunnar)})/5 = 282$ kronor per art i kemikaliekostnader.”

Noteras skall också att Biorad (ledande företag när det gäller ddPCR) nu har tagit fram en teknik som kan analysera 12+ arter i varje brunn. Även om kemikaliekostnaden är högre kommer detta sänka kostnaden räknat per analyserad art.

Figur 7 nedan är en grafisk sammanfattning av de olika teknikerna för att identifiera arter som har diskuterats i texten.



Figur 7. En schematisk framställning av skillnaden mellan traditionella metoder inom övervakning, och de två olika formerna av DNA-baserade metoder som diskuteras i texten (från Sundberg *et al.* 2016).

Flödet till vänster visar på en traditionell metod där individer av de fyra arterna på bilden har samlats in, sorterats, och bestämts utifrån morfologiska karaktärer. Flödet till höger visar på hur proverna i vattnet tagits och hur utifrån det DNA som påträffats det antingen kan göras en analys av hela samhället ("whole community analysis") eller sökas efter specifika arter (hitta målart). I analysen av hela samhället kan IAS som är av intresse påträffas, men det ges också mer information och detta kräver bioinformatisk analys. I fallet med hitta mål-arter har primers designats som specifikt "plockar upp" de arter man är intresserad av. I det fallet fås alltså ingen helhetsbild av de taxa som det finns DNA från. Den tekniken kräver ingen bioinformatisk analys och ger svar inom några timmar om en specifik art finns eller inte.

Slutsatser

Övervakning av hamnar och farleder är viktigt för att tidigt upptäcka nya främmande arter och hindra deras spridning. Det måste framgå tydligt vad som ska ingå i ett program för hamnövervakning och vilka frågor som ska besvaras. Om övervakningen samordnas med annan nationell provtagning kan det ge många fördelar. Dels reduceras kostnaden om provtagningen för främmande arter ingår i redan existerande provtagning, dels utnyttjas den taxonomiska expertisen inom de olika områdena effektivt. I nuläget saknas dock nationell provtagning för flera av organismgrupperna. När ett övervakningsprogram för främmande arter driftsätts kan det vara fördelaktigt att anordna kalibreringstillfällen för inblandade aktörer med syfte att utbyta erfarenheter samt att säkerställa att provtagningen utförs standardiserat.

I jämförelsen mellan traditionell och DNA-baserad övervakning, och utifrån uppdraget, kan det konstateras att:

1. Den traditionella metoden hittar fler arter och är därför bättre i det avseendet om syftet är att få en överblick av florans och faunas i området. För att DNA-baserade metoder skall fungera på samma sätt måste det finnas ett mer komplett referensbibliotek av aktuella arter. Vi ser inte att det är möjligt med tanke på den insats som skulle behövas när det gäller insamling och identifiering av arter av taxonomisk expertis.
2. Den DNA-baserade metoden fungerar bättre för att hitta de IAS som finns på Oskar/Helcom/unionslistan, speciellt arter i gruppen djurplankton som är svåra att artbestämma. Dessutom finns det anledning att utgå ifrån att det är bland plankton som det är störst chans att hitta nyligen introducerade IAS.
3. Protokoll för övervakning av IAS bör optimeras för att bli mer kostnadseffektiva. Viktiga faktorer är provernas spridning i tid och rum, vilka habitat som skall ingå i provtagningen, och vilken/vilka identifieringsmetod(er), eller kombinationer av dessa, som är lämpligast.

Syftet med ett provtagningsprogram måste vara klart och tydligt formulerat (se t.ex. Hayes *et al.* 2005 för en diskussion). Dåligt planerade insamlingar, med ottydligt syfte, kan vara rika på data men fattiga på relevant information. Med tanke på de kostnader övervakning i den marina miljön medför så är det av yttersta vikt att syfte och målsättning klargörs, samt att det görs en ordentlig analys av hur insamlingen skall gå till för att bäst svara mot behoven.

Provtagningsprogram bör anpassas till varje hamn, och beror på olika faktorer. Till exempel så betyder det mycket var i hamnen barlastvatten släpps. Generellt så sker utsläppen i samband med lossning för att kompensera viktminskningen och det är därför viktigt att beakta möjligheten till spridning från den punkten, vilka lämpliga substrat som finns i närheten, o.s.v. I Granhag (2016) anges att ”antalet provtagningsområden bestäms utifrån hamnens storlek och form”. För Göteborg anges till exempel två områden varav ett ligger uppströms från de kajer där fartygen lossar sin last. Inte bara form och storlek på hamnen bör

avgöra antalet provpunkter, utan andra faktorer måste beaktas i utformningen av övervakningsprogrammet för varje hamn specifikt. Om det som i fallet med Göteborgs hamnområde finns en stark utgående ström så kanske provpunkter skall ligga nedströms de stora hamnarna. Likaså bör sannolikheten för att upptäcka IAS utredas, och insamlingsinsatsen dimensioneras för att uppnå en så liten risk som möjligt för ett Typ II-fel. Hewitt & Martin (2001) diskuterar dessa olika faktorer i detalj, och visar också tydligt på sambandet mellan upptäckt av en invasiv art och antalet prov som tas som en variabel beroende på olika tätheter av arten i fråga. För en mer teoretisk bakgrund, se Green & Young (1993).

Det finns anledning att ytterligare utreda om eDNA (miljö-DNA) baserade tekniker kan vara ett sätt att förbättra möjligheten att hitta främmande och invasiva arter. Eftersom DNA kan förväntas vara mer spritt i vattenmassorna ökar sannolikheten att upptäcka en art jämfört med att fysiskt hitta en organism (se Taberlet et al. 2018). Detta DNA kan utgöra grunden för samma typ av metabarkodnings-analys som i den här rapporten, eller för att leta efter en specifik målart med qPCR eller ddPCR. Undersökningar genom eDNA och metabarkodning kan därför på flera sätt vara effektivare än en traditionell undersökning, som till exempel när det gäller att undersöka om invasiva målarter finns i en hamn vid en provning om dispens för barlastvattenhantering. Det går att få ett snabbt svar på om målarten finns i ett område redan i ett tidigt skede av en invasion, vilket är viktigt för att upprätta hanteringsprogram för bekämpning av en IAS. Det går att också att kvantifiera mängden DNA och därigenom få ett semi-kvantitativt mått på hur framgångsrik insatsen varit. Men, det krävs mer forskning och empiriska undersökningar för att säkerställa detta sammanhang. Eftersom DNA bryts ner relativt snabbt i vatten (Philipod 2014) (speciellt i havsvatten (Thomsen 2012a)), så ger det en ögonblicksbild av situationen vilket kan vara en fördel när det gäller risken för att få "positiva falska" svar; det vill säga, att upptäcka DNA från en art som inte finns i området men vars DNA har förts dit på annat sätt. Men, detta ställer också krav på hur undersökningar läggs upp och planeras.

Vi anser att genetiska metoder har en stark potential när det gäller olika delar av övervakningsprogram, men de kan inte ersätta alla delar av traditionella undersökningsmetoder eftersom de svarar på lite olika frågor.

Sammanfattning

Om syftet med övervakningen skall vara att ge en mer övergripande bild av faunan/floran på det sätt som den här jämförelsen har gjort, så föreslås en kombination av metoder där traditionell identifiering görs av arter från settlingsplattor, mjukbottenlevande fauna och mobil fauna. För planktonprover föreslår vi att DNA-metoder används eftersom plankton generellt sett är svåra att identifiera. Dessutom kan det utgå ifrån att sannolikheten att stöta på arten i etableringsfasen är mycket större bland plankton, än bland adulter, för de arter som har planktoniska larvstadier.

Framtida behov

- Relevanta referensbibliotek måste upprättas om DNA-baserade metoder skall användas i framtiden (se även Sundberg *et al.* 2016). Dahlgren *et al.* (in prep) har gått igenom rapporterade bentiska arter runt oljeriggarna i Nordsjön och funnit att av cirka 2 000 rapporterade arter är bara runt 30 procent sekvenserade. Med tanke på den insamlingsinsats, och behov av taxonomisk expertis, som skulle krävas för att kunna sekvensera alla arter som kan tänkas påträffas i svenska farvatten ses detta som orealistiskt. Däremot är det fullt möjligt att bygga referensbibliotek om det fokuseras på enbart invasiva målarter.
- Möjligheten att använda eDNA och vattenprover bör utredas ytterligare. Kostnaden för provtagningen skulle minska avsevärt, och den skulle också förenklas, speciellt i kommersiella hamnar där det kan vara svårt att till exempel komma åt kajsidor. eDNA-tekniken är relativt billig och kan ganska omgående ge svar på frågan om en art finns i området. Frågor som behöver besvaras är hur länge DNA finns i vattenmassorna och ballastvatten (för att utreda riskerna med falska positiva svar), hur känslig tekniken är och hur långt ifrån källan positiva reaktioner kan förväntas.
- Det behövs en tydlighet i övervakningens syfte och mål, och en analys av hur provtagningen skall gå till i ett specifikt hamnområde. I denna analys bör också finnas med en statistisk utvärdering av olika risker, speciellt vad gäller risken att inte påträffa en invasiv art även om den finns i området.

Referenser

- Bergkvist, J., M. Magnusson & R. Rosenberg (2017). Test och utvärdering av ny övervakning av främmande arter i hamnar och utsatta områden. Rapport 2017:13. Havs- och vattenmyndigheten.
- Bourlat, S. J. (ed.) (2016). *Marine Genomics – methods and protocols*. Methods in Molecular Biology Series. Springer, New York, 253 pp.
- Bourlat, S. J., Q. Haenel, J. Finnman & M. Leray (2016) Preparation of Amplicon Libraries for Metabarcoding of Marine Eukaryotes Using Illumina MiSeq: The Dual-PCR Method. In: *Marine Genomics – methods and protocols* (Bourlat (ed.) 2016).
- Caporaso, J.G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. G. Pena, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R.E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J.R. Sevinsky, P.J. Turnbaugh, W.A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld & R. Knight (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7: 335–336. DOI: 10.1038/nmeth.f.303
- Goldberg, C.S., D.S. Pilliod, R.S. Arkle & L.P. Waits (2011). Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PloS ONE* 6: e22746. DOI: 10.1371/journal.pone.0022746
- Gollasch, S., J. Lenz, M. Dammer & H.G. Andres (2000). Survival of tropical ballast water organisms during a cruise from the Indian Ocean to the North Sea. *Journal of Plankton Research* 22(5): 923–937. DOI: 10.1093/plankt/22.5.923
- Gollasch, S., E. McDonald, S. Belson, H. Botnen, J.T. Christensen, J.P. Hamer, G. Houvenaghel, A. Jelmert, I. Lucas, D. Masson, T. McCollin, S. Olenin, A. Persson, I. Wallentinus, L.P.M.J. Wetsteyn & T. Wittling (2002). Life in ballast tanks. Leppäkoski, e, S. Gollasch & S. Olenin (red) "Invasive aquatic species of Europe distribution, impact and management". Kluwer, Dordrecht, pp 217–231.
- Gollasch, S., D. Minchin & M. David (2015). The transfer of harmful aquatic organisms and pathogens with ballast water and their impacts. David, M & S. Gollasch "Global maritime transport and ballast water management". Springer, Dordrecht, pp. 35–58.
- Granhag, L. (2016). Metoder för övervakning av främmande arter. Protokoll för provtagning i hamnar och farleder. Havs- och vattenmyndighetens rapport 2016:13. Hämtad 2017-05-04: <https://www.havochvatten.se/hav/uppdrag--kontakt/publikationer/publikationer/2016-09-21-metoder-for-overvakning-av-frammande-arter.html>.
- Green, R. H. & R. C. Young (1993). Sampling to detect rare species. *Ecological Applications* 3(2): 351–356. DOI: 10.2307/1941837
- Haenel, Q., O. Holovachov, U. Jondelius, P. Sundberg & S. J. Bourlat (2017) NGS-based biodiversity and community structure analysis of meiofaunal eukaryotes in shell sand from Hållö island, Smögen, and soft mud from

- Gullmarn Fjord, Sweden. Biodiversity Data Journal 5: e12731. DOI: <https://doi.org/10.3897/BDJ.5.e12731>.
- Hebert, P. D., S. Ratnasingham & J. R. deWaard (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270(Suppl 1):S96–S99. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0025
- Havs- och vattenmyndigheten. Lista över främmande arter i vårt närområde – alertlistan. Hämtad 2017-12-12: <https://www.havochvatten.se/hav/fiske--fritid/arter/frammande-arter/lista-over-frammande-arter-i-vart-naromrade--alertlistan.html>.
- Havs- och vattenmyndigheten (utkast). Undersökningstyp: Främmande arter. Granhag, L., Florin A-B., Karlsson B. och Mohlin M.
- Havs- och vattenmyndigheten (2016). Undersökningstyp Mjukbottenlevande makrofauna, trend- och områdesövervakning, Version 1:2 2016-12-08. Leonardsson, K. och Evans, S.
- Hao, X. L., Jiang, R., & Chen, T. (2011) Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering. *Bioinformatics* 27(5): 611–618. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq725
- Hayes, K. R., Cannon, R., Kerry, N. & Inglis, G. (2005). Sensitivity and cost considerations for the detection and eradication of marine pests in ports. *Marine Pollution Bulletin* 50: 823–834. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2005.02.032
- HELCOM (2017). Joint decision tool on alien species introductions via Ballast Water. Hämtad 2017-03-09: http://jointbwmexemptions.org/ballast_water_RA/apex/f?p=100:LOGIN:32646210652853.
- HELCOM (2014a). HELCOM ALIENS 3 – Tests of the Harmonized Approach to Ballast Water Management Exemptions in the Baltic Sea. Hämtade 2017-12-06: <http://helcom.fi/Lists/Publications/HELCOM%20ALIENS%203%20%E2%80%93%20Tests%20of%20the%20Harmonized%20Approach%20to%20Ballast%20Water%20Management%20Exemptions%20in%20the%20Baltic%20Sea.pdf>.
- HELCOM (2014b). Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM: Annex C7 Mesozooplankton. Annex C7 Mesozooplankton.
- HELCOM (2014c). Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM: Annex C8 Soft bottom macrozoobenthos.
- HELCOM (2015). Joint Harmonised Procedure for the Contracting Parties of HELCOM and OSPAR on the granting of exemptions under International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments, Regulation A-4. Hämtad 2017-12-06: <http://www.helcom.fi/Documents/HELCOM%20at%20work/Groups/MARITIME/TG%20BALLAST/HELCOM-OSPAR%20Joint%20Harmonized%20Procedure%20for%20BWMC%20A-4%20exemptions.pdf>.
- Hewitt, C. L. & R. B. Martin (2001) Revised protocols for baseline port surveys for introduced marine species: survey design, sampling protocols and

- specimen handling. Centre for research on introduced marine pests. Technical Report No 22. CSIRO Marine Research, Hobart, 46 pp. DOI: <https://doi.org/10.4225/08/585d67b4b913e>
- IMO. FN:s internationella sjöfartsorgan (2004). International Convention For The Control And Management of Ship's Ballast Water And Sediments.
- IMO. FN:s internationella sjöfartsorgan (2011). Guidelines for the control and management of ships' biofouling to minimize the transfer of invasive aquatic species (Biofouling Guidelines, MEPC.207(62).
- Lance, R.F., M.R. Carr (2012). Detecting eDNA of invasive dreissenid mussels: report on capital investment project. ANSRP Technical Notes Collection. ERDC/TN ANSRP-12-2.
- Leray, M., Q. Haenel Q. & S.J. Bourlat (2016). Preparation of Amplicon Libraries for Metabarcoding of Marine Eukaryotes Using Illumina MiSeq: The Adaptor Ligation Method. In: Marine Genomics – methods and protocols (Bourlat (ed.) 2016).
- Lobo J., Costa P. M., Teixeira M. A., Ferreira M. S., Costa M. H., & F. O Costa (2013) Enhanced primers for amplification of DNA barcodes from a broad range of marine metazoans. BMC Ecology 13:34. DOI: 10.1186/1472-6785-13-34.
- McCollin, T., A. M. Shanks & J. Dunn (2008). Changes in zooplankton abundance and diversity after ballast water exchange in regional seas. Marine Pollution Bulletin 56: 834–844. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2008.02.004
- Pillipod, D.S., C.S Goldberg, R.S. Arkle & L.P. Waits (2014) Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. Molecular Ecology Resources 14: 109-116, doi: 10.1111/1755-0998.12159.
- Strand, M. (2017). Metodutveckling: artbestämning av bottenfauna inom marin övervakning. Rapport till Havs- och vattenmyndigheten.
- Sundberg, P., Q. Haenel & S. Bourlat (2016). Utvärdering av DNA-streckkodning och referensbibliotek för övervakning av invasiva främmande arter. Rapport till Havs- och vattenmyndigheten.
- Sundberg, P., M. Berggren & T. Dahlgren (2017). Test av eDNA och ddPCR som metod för att upptäcka/övervaka invasiva främmande arter (IAS): svartmunnad smörbult och blåskrabba. Rapport till Havs- och vattenmyndigheten.
- Taberlet, P., A. Bonin, L. Zinger & E. Coissac (2018). Environmental DNA for biodiversity research and monitoring. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Thomsen, P.F., J. Kielgast, L.L. Iversen, P.R. Møller, M. Rasmussen & E. Willerslev (2012a). Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. PloS ONE 7: e41732. DOI: 10.1371/journal.pone.0041732
- Thomsen, P.F., J. Kielgast, L.L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M.T.P. Gilbert, L. Orlando & E. Willerslev (2012b). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Molecular Ecology 21 (11): 2565–2573. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x
- Williams S. L. & E.D. Grosholz (2008). The invasive species challenge in estuarine and coastal environments: Marrying management and science. Estuaries & Coasts. 31(1). 3–20. DOI: 10.1007/s12237-007-9031-6

Zeidler, W. (1992). Introduced starfish pose threat to scallops. Australian Fisheries 51: 28–29.

Bilagor

- I. Positioner och djup för provtagningen
- II. Metodbeskrivning DNA-metabarkodning
- III. Främmande arter funna inom undersökningen
- IV. Artlista djurplankton
- V. Artlista mjukbottenfauna
- VI. Artlista settlingspaneler
- VII. Kostnad DNA-analys

Arter angivna i **fetstil** är främmande arter för Sverige.

Bilaga I. Positioner och djup för provtagningen

Positioner anges i WGS84; decimalgrader.

Förkortning	Betydelse	Område
FL	farled	Dynabrott och Brandskärs flak
PK	produktkaj	inre hamnområde
ROK	råolkaj	yttre hamnområde

Prov	Datum	Latitud	Longitud	Djup (m)
FL_1_djurplankton	20161004	58,293083	11,310933	15
FL_2_djurplankton	20161004	58,303638	11,358735	25
FL_3_djurplankton	20161004	58,291931	11,376345	15
PK_1_djurplankton	20160804	58,354333	11,445083	20
PK_2_djurplankton	20160804	58,360433	11,435100	20
PK_3_djurplankton	20160804	58,358883	11,444433	19
ROK_1_djurplankton	20160804	58,340817	11,387983	28
ROK_2_djurplankton	20160804	58,339017	11,400133	30
ROK_3_djurplankton	20160804	58,348917	11,403383	25
FL_1_bottenfauna	20160601	58,291650	11,289200	48
FL_2_bottenfauna	20160601	58,301400	11,313333	45
FL_3_bottenfauna	20160601	58,288183	11,307067	44
PK_1_bottenfauna	20160602	58,361817	11,436033	13
PK_2_bottenfauna	20160602	58,355717	11,447483	15
PK_3_bottenfauna	20160602	58,356483	11,436617	20
ROK_1_bottenfauna	20160602	58,355417	11,418500	6
ROK_2_bottenfauna	20160602	58,348467	11,409833	4.5
ROK_3_bottenfauna	20160602	58,337017	11,397183	33
FL_1_settlingsplatta	20160611– 20160905	58,296659	11,309513	1–7
FL_2_settlingsplatta	20160611– 20160905	58,296659	11,309513	1–7
FL_3_settlingsplatta	20160611– 20160905	58,293084	11,310972	1–7
PK_1_settlingsplatta	20160607– 20161005	58,355439	11,438055	1–7
PK_2_settlingsplatta	20160607– 20161005	58,354713	11,431446	1–7
PK_3_settlingsplatta	20160607– 20161005	58,357465	11,446939	1–7
ROK_1_settlingsplatta	20160607– 20161005	58,347107	11,407725	1–7
ROK_2_settlingsplatta	20160607– 20161005	58,340542	11,388445	1–7
ROK_3_settlingsplatta	20160607– 20161005	58,339506	11,400633	1–7

Bilaga II. Metodbeskrivning DNA-metabarkodning

Från Haenel et al. (2017)

DNA extraction. The samples were processed for total DNA extraction using the PowerMax® Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories), according to manufacturer's instructions.

Primer design. Primers were designed for the mitochondrial cytochrome oxidase 1 (CO1) including Illumina MiSeq overhang adapter sequences for compatibility with Illumina index and sequencing adapters. CO1 was amplified using an internal primer based on Leray *et al.*'s (2016) 'mini-barcode', yielding a 313 bp fragment (mlCO1intF). We used a reverse primer developed by Lobo *et al.* (2013), shown to enhance amplification of the CO1 region in a wide range of invertebrates.

Illumina MiSeq library preparation using fusion primers. For Illumina MiSeq library preparation, we used a dual PCR amplification method described in Bourlat *et al.* (2016). The first PCR, the amplicon PCR, uses amplicon specific primers including the Illumina adapter overhang, as described above. The second PCR, the index PCR, allows the incorporation of Illumina index adapters using a limited number of cycles. For a detailed protocol, see references in Bourlat *et al.* (2016)

Sequencing. The pooled libraries were sequenced using Illumina MiSeq Reagent Kit v3

Bioinformatic data processing and analysis

Most analytical steps were performed using Qiime (Quantitative Insight Into Microbial Ecology) version 1.9.1 (Caporaso *et al.* 2010)

Paired-end joining. Demultiplexed MiSeq paired-end reads were joined using the Qiime script *multiple_join_paired_ends.py* using the fastq-join tool (<https://code.google.com/p/ea-utils/wiki/FastqJoin>).

Primer trimming and quality filtering. Dual indexes and Illumina overhangs were removed by the sequencing platform. CO1 primer sequences were removed using a custom python script (https://github.com/Quiterie90/Primer_Removal). A quality filtering step was then carried out using the Qiime script *multiple_split_libraries_fastq.py* to remove reads with a Q Score inferior to 30 (corresponding to a base call accuracy of at least 99,9%).

Chimera removal and OTU clustering. Chimeric reads were removed with UCHIME using the Qiime scripts *identify_chimeric_seqs.py* followed by *filter_fasta.py* based on the Usearch61 software.

For clustering sequences into Operational Taxonomic Units (OTUs) we used CROP, a Bayesian clustering algorithm that delineates OTUs based on the natural distribution of the data, using a Gaussian mixture model (Hao 2011) with sequence dissimilarity settings between 6% and 8%.

Taxonomic assignment. As Qiime is normally used for metagenomic analyses of prokaryotes, default databases are not suited for taxonomic assignment of Metazoa. Custom databases consisting in a taxonomy file associated with a reference sequence file can be created, or alternatively, a

preformatted database such as the Silva database (http://www.arb-silva.de/no_cache/download/archive/qiime/) can be used. For the CO1 region, a custom database of 1 947 954 sequences was created consisting of the BOLD database (<http://www.boldsystems.org/> downloaded on October 8 2015), combined with own reference databases of Nemertea, Xenacoelomorpha and Oligochaeta and barcodes of Swedish Echinodermata, Mollusca, Cnidaria and Arthropoda from the Swedish Barcode of Life database (SweBol) that have not yet been made public on BOLD.

Taxonomic assignments were carried out using 97% sequence similarity thresholds to obtain identifications at species level. For CO1, taxonomic assignment was done using the Qiime script *assign_taxonomy.py* using the Uclust software.

Invasive Alien Species (IAS) were detected in our samples by comparing our species list to the target species list of the HELCOM/OSPAR area and the EU list of IAS.

Bilaga III. Främmande arter funna inom undersökningen

Taxon	Svenskt namn	Provtagning	Metod (antal positiva prover)
<i>Mnemiopsis leidyi</i>	amerikansk kammanet	djurplankton	traditionell (alla), DNA (0)
<i>Dasysiphonia japonica</i>	japanplym	settlingspaneler	Traditionell (5), DNA (0)
<i>Crassostrea gigas</i>	japanskt jätteostron	settlingspaneler zooplankton	traditionell (3) DNA (6)
<i>Amphibalanus improvisus</i>	slät havstulpan	settlingspaneler zooplankton mjukbotten	traditionell (2) DNA (10)
<i>Acartia tonsa</i>	(hoppkräfta)	zooplankton mjukbotten	DNA (8)
<i>Crepidula fornicata</i>	ostronpest	zooplankton	DNA (1)
<i>Caprella mutica</i>	spökräka	settlingspaneler mjukbotten	DNA (7)

Kommentarer. Målarter i fetstil är listade på Helcom/Ospar "target species list" för Östersjön och Nordsjön. Ingen matchning kunde göras med EU:s unionsförteckning över IAS och som bara utgörs av en marin art, asiatisk ullhandskrabba (*Eriocheir sinensis*). *Mnemiopsis leidyi* var borttagen ur de prover som konserverades i etanol för senare DNA analys. Japanplym är en alg, och vi skannade inte för annat är djur med de molekylära markörer vi använt.

Bilaga IV. Artlista djurplankton

A. Alla taxa identifierade med traditionell metodik.

Taxon	Traditionell	Taxon	Traditionell
<i>Acartia clausi</i>	x	Invertebrata	x
<i>Acartia</i> spp.	x	<i>Isias</i> spp.	x
Anomura	x	<i>Isias claviceps</i>	x
Appendicularia	x	Isopoda	x
Bivalvia	x	Microsetella	x
Bosmina	x	<i>Mnemiopsis leidyi</i>	x
Brachyura	x	<i>Monstrilla</i> spp.	x
<i>Calanus finmarchicus</i>	x	Nemertea	x
<i>Calanus</i> spp.	x	Oikopleura	x
Candacia	x	<i>Oithona</i> spp.	x
Caridea	x	<i>Oncaea</i> spp.	x
<i>Centropages</i> spp.	x	Oncaeidae	x
<i>Centropages hamatus</i>	x	Ostracoda	x
<i>Centropages typicus</i>	x	<i>Paracalanus</i> spp.	x
Chaetognatha	x	<i>Penilia avirostris</i>	x
Cirripedia	x	Phoronida	x
Cladocera	x	Platyhelminthes	x
Cnidaria	x	<i>Pleurobrachia pileus</i>	x
Coelenterata	x	<i>Podon</i> spp.	x
Copepoda	x	Poecilostomatoida	x
Corycaeidae	x	Polychaeta	x
Ctenophora	x	Pontellidae	x
Cyclopoida	x	<i>Pseudocalanus</i> spp.	x
Decapoda	x	Rotifera	x
Doliolidae	x	<i>Sagitta</i> spp.	x
Echinodermata	x	Siphonophora	x
Euphausiacea	x	<i>Temora longicornis</i>	x
<i>Evadne</i> spp.	x	Thaliacea	x
Fish	x	Thecosomata	x
Gastropoda	x	Tintinida	x
Harpacticoida	x		

B. Arter identifierade med DNA vs traditionell metodik.

Art	DNA	Traditionell	Art	DNA	Traditionell
<i>Abra nitida</i>	x		<i>Kurtiella bidentata</i>	x	
<i>Acartia clausi</i>	x	x	<i>Laomedea flexuosa</i>	x	
<i>Acartia tonsa</i>	x		<i>Leuckartiara octona</i>	x	
<i>Acteon tornatilis</i>	x		<i>Liocarcinus depurator</i>	x	
<i>Alvania beani</i>	x		<i>Liocarcinus navigator</i>	x	
<i>Amphibalanus improvisus</i>	x		<i>Macrochaeta clavicornis</i>	x	
<i>Amphiura filiformis</i>	x		<i>Mangelia attenuata</i>	x	
<i>Anomalocera patersoni</i>	x		<i>Melicerium octocostatum</i>	x	
<i>Aporrhais pespelecani</i>	x		<i>Membranipora membranacea</i>	x	
<i>Athanas nitescens</i>	x		<i>Mnemiopsis leidyi</i>		x
<i>Bougainvillia muscus</i>	x		<i>Muggiaea atlantica</i>	x	
<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	x		<i>Mya arenaria</i>	x	
<i>Calanus finmarchicus</i>	x	x	<i>Myrianida brachycephala</i>	x	
<i>Calanus helgolandicus</i>	x		<i>Myrianida edwardsi</i>	x	
<i>Carcinus maenas</i>	x		<i>Nanomia cara</i>	x	
<i>Centropages hamatus</i>	x	x	<i>Nassarius incrassatus</i>	x	
<i>Centropages typicus</i>	x	x	<i>Nassarius nitidus</i>	x	
<i>Chaetopterus sarsi</i>	x		<i>Obelia dichotoma</i>	x	
<i>Clione limacina</i>	x		<i>Obelia geniculata</i>	x	
<i>Clytia hemisphaerica</i>	x		<i>Ophiothrix fragilis</i>	x	
<i>Clytia languida</i>	x		<i>Ophiura albida</i>	x	
<i>Corbula gibba</i>	x		<i>Ostrea angasi</i>	x	
<i>Crassostrea gigas</i>	x		<i>Pagurus cuanensis</i>	x	
<i>Crepidula fornicata</i>	x		<i>Paracalanus parvus</i>	x	
<i>Cuthona amoena</i>	x		<i>Parougia eliasoni</i>	x	
<i>Cyanea capillata</i>	x		<i>Penilia avirostris</i>	x	x
<i>Doliolum nationalis</i>	x		<i>Pennatula aculeata</i>	x	
<i>Doto coronata</i>	x		<i>Peringia ulvae</i>	x	
<i>Doto fragilis</i>	x		<i>Pinnotheres pisum</i>	x	
<i>Dynamena pumila</i>	x		<i>Pisidia longicornis</i>	x	
<i>Ebalia tumefacta</i>	x		<i>Pleopis polyphemoides</i>	x	
<i>Electra pilosa</i>	x		<i>Pleurobrachia pileus</i>		x
<i>Ercolania viridis</i>	x		<i>Podon intermedius</i>	x	
<i>Eualus cranchii</i>	x		<i>Pollachius virens</i>	x	
<i>Euspira nitida</i>	x		<i>Polycera quadrilineata</i>	x	
<i>Eutrigla gurnardus</i>	x		<i>Polydora cornuta</i>	x	
<i>Evadne nordmanni</i>	x		<i>Polygordius appendiculatus</i>	x	
<i>Harpacticus flexus</i>	x		<i>Processa modica</i>	x	
<i>Hiatella arctica</i>	x		<i>Processa nouveli holthuisi</i>	x	
<i>Homo sapiens</i>	x		<i>Pseudocalanus elongatus</i>	x	
<i>Isias claviceps</i>		x	<i>Pseudodiaptomus marinus</i>	x	
<i>Isias clavipes</i>	x		<i>Pusillina inconspicua</i>	x	

Art	DNA	Traditionell	Art	DNA	Traditionell
(Forts. föregående sida)			<i>Temora longicornis</i>	x	x
<i>Raniceps raninus</i>	x		<i>Tergipes tergipes</i>	x	
<i>Raphitoma linearis</i>	x		<i>Tima bairdii</i>	x	
<i>Sacculina carcini</i>	x		<i>Trichobranchus glacialis</i>	x	
<i>Scoloplos armiger</i>	x		<i>Turritella communis</i>	x	
<i>Tanytarsus usmaensis</i>	x		<i>Verruca stroemia</i>	x	
<i>Tellimya ferruginosa</i>	x		<i>Xantho pilipes</i>	x	

Bilaga V. Artlista mjukbottenfauna

A. Alla taxa identifierade med traditionell metodik.

Taxon	Traditionell	Taxon	Traditionell
<i>Abra alba</i>	x	<i>Harmothoe imbricata</i>	x
<i>Abra nitida</i>	x	<i>Harmothoe</i> sp.	x
<i>Alvania punctura</i>	x	<i>Harpinia pectinata</i>	x
<i>Ampelisca tenuicornis</i>	x	<i>Heteromastus filiformis</i>	x
<i>Ampharete lindstroemi</i>	x	<i>Holothuroidea</i> sp.	x
<i>Ampharete</i> sp.	x	<i>Hyala vitrea</i>	x
<i>Amphiura chiajei</i>	x	<i>Jassa falcata</i>	x
<i>Amphiura filiformis</i>	x	<i>Lepidonotus squamatus</i>	x
<i>Anobothrus gracilis</i>	x	<i>Leptasterias</i> cf. <i>muelleri</i>	x
<i>Bathyporeia sarsi</i>	x	<i>Leucothoe liljeborgi</i>	x
<i>Bivalvia</i>	x	<i>Levinsenia gracilis</i>	x
<i>Brissopsis lyrifera</i>	x	<i>Liocarcinus holsatus</i>	x
<i>Capitella capitata</i>	x	<i>Lipobranchus jeffreysii</i>	x
Caprellidae	x	<i>Lumbrineris fragilis</i>	x
<i>Chaetozone setosa</i>	x	<i>Lumbrineris gracilis</i>	x
<i>Chamelea striatula</i>	x	<i>Lumbrineris</i> sp.	x
Chironomidae	x	<i>Magelona minuta</i>	x
<i>Corbula gibba</i>	x	<i>Maldane sarsi</i>	x
Coromorphidae	x	<i>Mangelia attenuata</i>	x
<i>Corophium affine</i>	x	<i>Melinnie albicincta</i>	x
<i>Corophium volutator</i>	x	<i>Microdeutopus gryllotalpa</i>	x
<i>Cylichna cylindracea</i>	x	<i>Microdeutopus</i> sp.	x
<i>Dexamine spinosa</i>	x	<i>Mimachlamys varia</i>	x
<i>Diastylis bradyi</i>	x	<i>Monoculodes</i> cf. <i>carinatus</i>	x
<i>Diastylodes biplicata</i>	x	<i>Mya truncata</i>	x
<i>Diplocirrus glaucus</i>	x	<i>Mysella bidentata</i>	x
<i>Diplocirrus hirsutus</i>	x	<i>Mytilus</i> sp. juvenil	x
<i>Echinocardium cordatum</i>	x	<i>Nassarius nitidus</i>	x
<i>Echinocyamus pusillus</i>	x	<i>Nassarius pygmaeus</i>	x
<i>Ennucula tenuis</i>	x	<i>Nassarius reticulatus</i>	x
<i>Eriopisa elongata</i>	x	<i>Nemertea</i>	x
<i>Eteone</i> cf. <i>longa</i>	x	<i>Nephtys hombergi</i>	x
<i>Euchone</i> sp.	x	<i>Nephtys incisa</i>	x
<i>Eudorella emarginata</i>	x	<i>Nephtys kersivalensis</i>	x
<i>Eumida</i> sp.	x	<i>Nereida</i> sp.	x
<i>Galatheidæ juvenile</i>	x	<i>Notomastus latericus</i>	x
<i>Galathowenia occulata</i>	x	<i>Nucula nitidosa</i>	x
<i>Gammarus locusta</i>	x	Oligochaeta	x
<i>Gaoniada maculata</i>	x	<i>Ophelia borealis</i>	x
Gastropoda	x	<i>Ophiodromus flexuosus</i>	x
<i>Glycera alba</i>	x	<i>Ophiura robusta</i>	x

Taxon	Traditionell	Taxon	Traditionell
(Forts. föregående sida)		<i>Orbinia sertulata</i>	x
<i>Golfingia vulgaris</i>	x	<i>Pectinaria auricoma</i>	x
<i>Goniada maculata</i>	x	<i>Scalibregma inflatum</i>	x
<i>Pectinaria belgica</i>	x	<i>Scolecopsis tridentata</i>	x
<i>Pectinaria koreni</i>	x	<i>Scoloplos armiger</i>	x
<i>Phaxas pellucida</i>	x	<i>Sphaerodorum flavum</i>	x
<i>Philine aperta</i>	x	<i>Spionidae</i> sp.	x
<i>Pholoe baltica</i>	x	<i>Spiophanes kroeyeri</i>	x
<i>Phoronis muelleri</i>	x	<i>Syllidae</i> sp.	x
<i>Phyllodoce</i> cf. <i>groenlandica</i>	x	<i>Syllis armillaris</i>	x
<i>Platynereis dumerilii</i>	x	<i>Tellimya</i> cf. <i>ferruginosa</i>	x
<i>Polychaeta</i> sp.	x	<i>Tellimya ferruginosa</i>	x
<i>Polycirrus plumosus</i>	x	<i>Terebellides stroemi</i>	x
<i>Polynoidae</i> sp.	x	<i>Thracia convexa</i>	x
<i>Praxillella affinis</i>	x	<i>Thyasira flexuosa</i>	x
<i>Prionospio</i> cf. <i>banyulensis</i>	x	<i>Thyasira</i> sp.	x
<i>Prionospio cirrifera</i>	x	<i>Thysanocordia procera</i>	x
<i>Prionospio fallax</i>	x	<i>Trichobranchus roseus</i>	x
<i>Prionospio</i> sp.	x	<i>Turbellaria</i>	x
<i>Pusillina sarsi</i>	x	<i>Westwoodilla hyalina</i>	x
<i>Retusa truncatula</i>	x		
<i>Rhodine gracilor</i>	x		

B. Arter identifierade med DNA i förhållande till traditionell metodik.

Art	DNA	Traditionell	Art	DNA	Traditionell
<i>Abra alba</i>		x	<i>Chamelea striatula</i>		x
<i>Abra nitida</i>		x	<i>Clione limacina</i>	x	
<i>Acartia bifilosa</i>	x		<i>Clytia hemisphaerica</i>	x	
<i>Acartia clausi</i>	x		<i>Corbula gibba</i>	x	x
<i>Alvania punctura</i>		x	<i>Corophium affine</i>		x
<i>Ampelisca brevicornis</i>	x		<i>Corophium volutator</i>		x
<i>Ampelisca tenuicornis</i>		x	<i>Corymorpha nutans</i>	x	
<i>Ampharete lindstroemi</i>		x	<i>Cylichna cylindracea</i>		x
<i>Amphiura chiajei</i>		x	<i>Dexamine spinosa</i>		x
<i>Amphiura filiformis</i>	x	x	<i>Diastylis bradyi</i>		x
<i>Anobothrus gracilis</i>		x	<i>Diastylodes biplicata</i>		x
<i>Bathyporeia sarsi</i>		x	<i>Diplocirrus glaucus</i>		x
<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	x		<i>Diplocirrus hirsutus</i>		x
<i>Brissopsis lyrifera</i>		x	<i>Echinocardium cordatum</i>	x	x
<i>Capitella capitata</i>		x	<i>Echinocyamus pusillus</i>	x	x
<i>Cephalotrix arenaria</i>	x		<i>Electra pilosa</i>	x	
<i>Chaetozona setosa</i>		x	<i>Ennucula tenuis</i>	x	x

Art	DNA	Traditionell	Art	DNA	Traditionell
<i>Eriopisa elongata</i>		x	<i>Nassarius reticulatus</i>		x
<i>Eteone longa</i>		x	<i>Nephtys hombergi</i>		x
<i>Eudorella emarginata</i>		x	<i>Nephtys incisa</i>		x
<i>Eurytemora affinis</i>	x		<i>Nephtys kersivalensis</i>		x
<i>Evadne nordmanni</i>	x		<i>Notomastus latericus</i>		x
<i>Galathowenia occulata</i>		x	<i>Nucula nitidosa</i>	x	x
<i>Gammarus locusta</i>		x	<i>Obelia dichotoma</i>	x	
<i>Gaoniada maculata</i>		x	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	x	
<i>Glycera alba</i>		x	<i>Ophelia borealis</i>		x
<i>Golfingia vulgaris</i>		x	<i>Ophiodromus flexuosus</i>		x
<i>Goniada maculata</i>		x	<i>Ophiothrix fragilis</i>	x	
<i>Harmothoe imbricata</i>		x	<i>Ophiura robusta</i>		x
<i>Harpinia pectinata</i>		x	<i>Orbinia sertulata</i>		x
<i>Heteromastus filiformis</i>		x	<i>Paracalanus parvus</i>	x	
<i>Homo sapiens</i>	x		<i>Pectinaria auricoma</i>		x
<i>Hyala vitrea</i>		x	<i>Pectinaria belgica</i>		x
<i>Jassa falcata</i>		x	<i>Pectinaria koreni</i>		x
<i>Kurtiella bidentata</i>	x		<i>Penilia avirostris</i>	x	
<i>Lepidonotus squamatus</i>		x	<i>Phaxas pellucida</i>		x
<i>Leptasterias muelleri</i>		x	<i>Phaxas pellucidus</i>	x	
<i>Leuckartiara octona</i>	x		<i>Philine aperta</i>		x
<i>Leucothoe liljeborgi</i>		x	<i>Pholoe baltica</i>		x
<i>Levinsenia gracilis</i>		x	<i>Phoronis muelleri</i>		x
<i>Liocarcinus holsatus</i>		x	<i>Phyllodoce groenlandica</i>		x
<i>Lipobranchius jeffreysii</i>		x	<i>Platynereis dumerilii</i>		x
<i>Lumbrineris fragilis</i>		x	<i>Polycirrus plumosus</i>		x
<i>Lumbrineris gracilis</i>		x	<i>Praxillella affinis</i>		x
<i>Magelona minuta</i>		x	<i>Prionospio banyulensis</i>		x
<i>Maldane sarsi</i>		x	<i>Prionospio cirrifer</i>		x
<i>Mangelia attenuata</i>		x	<i>Prionospio fallax</i>		x
<i>Melinne albicincta</i>		x	<i>Pusillina sarsi</i>		x
<i>Membranipora membranacea</i>	x		<i>Retusa truncatula</i>		x
<i>Microdeutopus gryllotalpa</i>		x	<i>Rhodine gracilor</i>		x
<i>Mimachlamys varia</i>		x	<i>Salmo salar</i>	x	
<i>Monoculodes carinatus</i>		x	<i>Scalibregma inflatum</i>		x
<i>Monoposthia costata</i>	x		<i>Scolecopsis tridentata</i>		x
<i>Mya arenaria</i>	x		<i>Scoloplos armiger</i>	x	x
<i>Mya truncata</i>		x	<i>Sphaerodorum flavum</i>		x
<i>Myrianida edwardsi</i>	x		<i>Spiophanes kroeyeri</i>		x
<i>Mysella bidentata</i>		x	<i>Syllis armillaris</i>		x
<i>Nanomia cara</i>	x		<i>Tellinomya ferruginosa</i>	x	x
<i>Nassarius nitidus</i>		x	<i>Temora longicornis</i>	x	
<i>Nassarius pygmaeus</i>		x	<i>Terebellides stroemi</i>		x
			<i>Thracia convexa</i>		x

Art	DNA	Traditionell
<i>Thracia phaseolina</i>	x	
<i>Thyasira flexuosa</i>		x
<i>Thysanocordia procera</i>		x
<i>Trichobranthus glacialis</i>	x	

Art	DNA	Traditionell
<i>Trichobranthus roseus</i>		x
<i>Turritella communis</i>	x	
<i>Westwoodilla hyalina</i>		x

Bilaga VI. Artlista settlingspaneler

A. Alla taxa identifierade med traditionell metodik

Taxon	Traditionell
<i>Amphibalanus improvisus</i>	x
<i>Ascidia virginea</i>	x
<i>Asciella aspersa</i>	x
<i>Botryllus leachii</i>	x
<i>Brogniartella byssoides</i>	x
Bryozoa	x
<i>Ceramium virgatum</i>	x
<i>Chaetomorpha</i> sp.	x
<i>Ciona intestinalis</i>	x
<i>Cladophora</i> sp.	x
<i>Crassostrea gigas</i>	x
<i>Cryptosula pallasiana</i>	x
<i>Cystoclonium purpureum</i>	x
<i>Dasysiphonia japonica</i>	x
<i>Leucosolenia botryoides</i>	x
<i>Membranipora membranacea</i>	x
<i>Mytilus edulis</i>	x
<i>Obelia</i> cf. <i>longissima</i>	x
<i>Osmundea truncata</i>	x
<i>Pododesmus patelliformis</i>	x
<i>Polysiphonia fibrillosa</i>	x
<i>Polysiphonia phycoides</i>	x
<i>Polysiphonia</i> sp.	x
<i>Pomatoceros triqueter</i>	x
<i>Sagartiogeton laceratus</i>	x
<i>Sagartiogeton</i> sp.	x
<i>Sphacelaria</i> sp.	x
<i>Ulva</i> sp.	x

B. Arter identifierade med DNA vs. traditionell metodik.

Art	DNA	Traditionell
<i>Acartia clausi</i>	x	
<i>Amphibalanus improvisus</i>	x	x
<i>Amphiura filiformis</i>	x	
<i>Ascidia virginea</i>		x
<i>Asidiella aspersa</i>		x
<i>Aurelia aurita</i>	x	
<i>Balanus balanus</i>	x	
<i>Botryllus leachii</i>		x
<i>Bowerbankia gracilis</i>	x	
<i>Brogniartella byssoides</i>		x
<i>Calanus finmarchicus</i>	x	
<i>Caprella mutica</i>	x	
<i>Ceramium virgatum</i>		x
<i>Ciona intestinalis</i>		x
<i>Clytia hemisphaerica</i>	x	
<i>Clytia languida</i>	x	
<i>Crassostrea gigas</i>		x
<i>Craterolophus convolvulus</i>	x	
<i>Cryptosula pallasiana</i>		x
<i>Cystoclonium purpureum</i>		x
<i>Dasysiphonia japonica</i>		x
<i>Electra pilosa</i>	x	
<i>Harmothoe imbricata</i>	x	
<i>Homo sapiens</i>	x	

Bilaga VII. Kostnad DNA-analys

Kostnaden är baserad på 24 prover och protokoll enligt Bilaga II.
Med valuta € 1 = SEK 10,17 blir kostnaden per prov SEK 1 806.

	Kostnad för 24 prover (SEK)
DNA extraktiom, MoBio power soil DNA extraction kit	7 400
CO1 primers med illumina överhäng (Integrated DNA technologies)	200
KAPA Hifi Hot start ready mix	2 650
Rening, (Macrogen)	4 900
Preparering av mplicon bibliotek från steg 2 (Macrogen)	6 100
Illumina Miseq en körning (Macrogen)	22 400
Summa	43 650