

FEBRUARI 2023  
COWI SVERIGE AB

# PM GRODDJURSINVENTERING

INVENTERING AV GRODDJUR MED MOLEKYLÄRA METODER



**COWI**



FEBRUARI 2023  
RENOVA AB

# PM GRODDJURSINVENTERING

INVENTERING AV GRODDJUR MED MOLEKYLÄRA METODER

PROJEKTNR.

A237948

DOKUMENTNR.

-4-02-PM GRODDJURSINVENTERING-001

VERSION

001

UTGIVNINGSDATUM

2022-02-15

BESKRIVNING

PM

UTARBETAD

Max Karlsson

GRANSKAD

Jesper Scharin

GODKÄND

Johan Rosdahl



# INNEHÅLL

1	Sammanfattning	7
2	Bakgrund och syfte	8
3	Metod	9
3.1	Provtagning av eDNA	9
3.2	Analys och sekvensering av DNA	13
4	Resultat	14
4.1	Visuella tecken på förekomst	14
4.2	Resultat från analys av eDNA-prover	15
5	Diskussion	16
6	Slutsatser och rekommendationer	17
7	Referenser	19



# 1 Sammanfattning

Renova Miljö AB bedriver i dagsläget en deponiverksamhet inom fastighet Håltås 1:8 i Härryda kommun. I samband med antagandet av en ny detaljplan planerar bolaget att utöka sin befintliga deponiverksamhet vilket medför att markanvändningen inom fastigheten förändras. Av detta skäl har COWI AB fått i uppdrag att undersöka förekomsten av groddjur i de vattensamlingar som kan tänkas påverkas och behöva tas hänsyn till vid planering av och driften av framtida verksamhet. Inventeringen har genomförts med hjälp av molekylära metoder i form av provtagning för eDNA (miljö-DNA) i en av lakvattendammarna samt en mindre sjö som är belägen på området. I samband med detta har förekomst av eDNA från större- och mindre vattensalamander säkerställts i båda vattensamlingar. Visuella observationer av årsindivider av arterna vanlig padda samt en okänd art av brungroda har även gjorts på området.

Föreslagna skyddsåtgärder har rekommenderats i form av arbete i vattenområde endast sker under tiden utanför groddjurens leksäsong, förslagsvis oktober – mars. Utöver detta bör en fri passage lämnas mellan de skogsområden som planeras bevaras inom området och befintliga lakvattendammar samt våtmarksområdet som angränsar till sjöns södra del. Detta för att förhindra fragmentering av livsmiljön för skyddade groddjursarter samt säkerställa fri passage för djuren till och från lokaler för där lek väntas ske. Skogsområden som planeras att bevaras inom området bör förses med död ved från planerade avverkningar för att skapa ytterligare övervintringsplatser, samt en ny damm som tillgodoser ytterligare lokal för lek.

## 2 Bakgrund och syfte

Renova Miljö AB bedriver i dagsläget en deponiverksamhet inom fastighet Hålltsås 1:8 i Härryda kommun. I samband med antagandet av en ny detaljplan planerar bolaget att utöka sin befintliga deponiverksamhet vilket medför att markanvändningen inom fastigheten förändras. Områden som idag utgörs av blandskog på berg kommer att avverkas och berget sprängas bort till förmån för anläggning av nya deponiceller.

COWI AB har i samband med detta fått i uppdrag att undersöka förekomsten av groddjur i de vattensamlingar som kan tänkas påverkas i anläggnings- och driftskedet. Samtliga av Sveriges 13 groddjursarter är fridlysta och upptagna i Artskyddsförordningen (SFS 2007:845), där det i flera av fallen rör sig om skydd av respektive arts livsmiljöer så väl som levande individer i varje livsstadium.

I syfte att ge en så heltäckande bild av eventuellt förekommande arter inom området har molekylära metoder använts i form av förekomst av miljö-DNA (även kallat "environmental DNA", hädanefter förkortat som eDNA). Denna metodik baserar sig på att alla levande organismer avger spår i form av DNA vilket går att detektera i prover som uttas från det medium arten befinner sig i (Naturvårdsverket, 2022). Metodiken har tillämpats i flera inventeringar sen tidigare och har visat på ökad chans för detektion av arter över konventionella metoder (Biggs et al., (2014), AquaBiota (2019), WSP (2022)). Undersökningen utgjordes av två fältbesök under perioden juni-augusti 2022.

I föreliggande PM redovisas metoder som använts vid genomförda undersökningar, de resultat som genererats samt en kort diskussion kring deras innebörd.



Figur 1. Illustrationsplan över planerad markanvändning inom området.



## 3 Metod

### 3.1 Provtagning av eDNA

För att undersöka eventuell förekomst av groddjur genomfördes två inventeringstillfällen under perioden juni-aug (2022-06-09 respektive 2022-08-17). Inventeringen omfattade provtagning av vatten i syfte att analyseras för förekomst av eDNA från samtliga svenska groddjursarter (inkl. större- och mindre vattensalamander). Provtagning utfördes av de ansamlingar av vatten inom området som bedömts vara relevanta i detta avseende: den större lakvattendammen samt den konstgjorda sjön. Arbetet med proverna gällande extrahering och anrikning av DNA, sekvensering och utvärdering av resultaten genomfördes av IVL Svenska Miljöinstitutet.

Nedan följer en kort beskrivning gällande provtagningsmetodiken för insamling och filtrering av vatten och provtagningsmetodik.

#### 3.1.1 Lakvattendammen

Vatten från dammen samlades in från tre punkter omkring den vattenfyllda del som ligger i anslutning till dammens utlopp (Figur 2).



Figur 2. Lokalisering av provpunkter där vatten samlats in med avseende på provtagning av eDNA, lakvattendamm.

Vattnet från de tre punkterna blandades tillsammans i en steril plastpåse varifrån prover senare uttogs. Prover uttogs genom att vatten filtrerades med hjälp av en steril spruta (Sarstedt AG & CO) över ett filter med en porstorlek på 0,22 µm (Sterivex). På grund av hög förekomst av fytoplankton sattes filtren igen relativt omgående vilket begränsade mängden vatten som kunde uttas för prov. Totalt uttogs två prover där ca 130 ml vatten filtrerades. Då stopp uppstod

tömdes filtren på överblivet vatten och proverna konserverades i fält med hjälp av 99% etanol.

Vid det andra provtagningstillfället (2022-08-17) noterades att dammen var torrlagd och att botten på dammen hade fyllts upp med ca 40 cm av hårt packat finmaterial. Därmed uteblev den planerade provtagningen på grund av praktiska skäl.



*Figur 3. Lakvattendamm inom deponiområdet.*



Figur 4. Filter från uttaget prov för analys av eDNA från lakvattendammen. Grön färg indikerar förekomst av fytoplankton

### 3.1.1 Den konstgjorda sjön

Provtagningen gällande den konstgjorda sjön genomfördes på liknande vis som för lakvattendammen, se metodbeskrivning ovan. En liter vatten per punkt samlades in från sju punkter jämnt fördelade längs med sjöns kanter (se figur 6).



Figur 5. Lokalisering av provpunkter där vatten samlats in med avseende på provtagning av eDNA i konstgjord sjö på området.

Vatten från två punkter vardera blandades samman i en steril påse och prov uttogs på samma sätt som beskrivet ovan. Flaskor för insamling av vatten tvättades med 10% kloridlösning för att avlägsna eventuella DNA-rester innan insamling. Vid första tillfället uttogs två prover om 650 ml vardera innan filtren sattes igen till följd av humusämnen och partiklar. Vid det andra tillfället (2022-08-17) uttogs fyra prover om 900 ml vardera på samma vis som beskrivet tidigare. Samtliga uttagna prover från de två provtagningstillfällena slogs ihop var för sig inför extrahering och sekvensering i syfte att öka mängden extraherbart DNA.



*Figur 6. Konstgjord sjö inom området.*



Figur 7. Filter från uttaget prov för analys av eDNA från sjön. Brun färg indikerar förekomst av humusämnen

### 3.2 Analys och sekvensering av DNA

Uttagna prover skickades till IVL Svenska miljöinstitutet för extrahering och uppberedning av DNA. Sekvenseringsarbetet (Illumina Next-Generation Sequencing) utfördes av Novogene.

Som komplement till de prover som uttagits från vattensamlingar på området har föreliggande undersökning inbegripit användandet av kontrollprover.

- > En negativ kontroll har nyttjats i syfte att kontrollera för falskt positiva utslag. Kontrollen bestod i ett prov uttaget i fält på avjoniserat vatten enligt den metodik som beskrivits ovan.
- > En positiv kontroll har nyttjats för att kontrollera för falskt negativa resultat och bestod av ett prov på vatten innehållande DNA från fyra kända groddjursarter: vanlig padda (*Bufo bufo*), gölgroda (*Pelophylax lessonae*), grönfläckig padda (*Bufo viridis*) och strandpadda (*Epidalea calamita*). Det positiva kontrollprovet har tillhandahållits av IVL.

## 4 Resultat

### 4.1 Visuella tecken på förekomst

I samband med det första provtagningstillfället för eDNA (2022-06-09) noterades frisimmande yngel av okänd groddjursart i den mindre sedimentationsdammen. Vid det andra fältbesöket (2022-08-17) påträffades årsindivider av obestämd grodart samt vanlig padda i gräset och skogsmark i den norra delen av området omkring utloppet till sjön, se Figur 8 - Figur 9 nedan.



*Figur 8. Årsindivid av obestämd art av brungröda observerad i skogsmark omkring den konstgjorda sjön på området vid fältbesök i augusti.*



Figur 9. Årsindivida av vanlig padda (*Bufo bufo*) observerad i skogsmark omkring den konstgjorda sjön vid fältbesök i augusti.

## 4.2 Resultat från analys av eDNA-prover

Fullständiga resultat från eDNA-analyser presenteras i Bilaga 1 till föreliggande PM.

Samtliga arter som ingått i det positiva kontrollprovet detekterades i både den negativa- och positiva kontrollen. I provet från lakvattendammen detekterades grönfläckig padda tillsammans med större vattensalamander (*Triturus cristatus*) och mindre vattensalamander (*Lissotriton vulgaris*). I provet som uttagits från sjön på området detekterades samtliga arter från den positiva kontrollen samt båda arterna av vattensalamander.

## 5 Diskussion

Inom ramen för föreliggande PM har förekomst av groddjursarter inom vattensamlingar på verksamhetsområdet för Fläskebo deponi undersökts. Undersökningen har utförts med hjälp av molekylära metoder (provtagning och analys för förekomst av eDNA).

I de prover som uttagits från vattensamlingar har flertalet arter detekterats som ingått i det positiva kontrollprov som nyttjats. Samma arter har även detekterats i det negativa kontrollprovet. Detta medför att uppkomsten av arterna gröNFLäckig padda, gölgröda, strandpadda inte går att skilja från att de faktiskt uppehåller sig i området eller att proverna kontaminerats under laborativa moment. Gölgröda återfinns nästan enbart i Sverige längs Upplandskusten, gröNFLäckig padda nästan uteslutande längs kustområden i södra Sverige (Artfakta, 2023). Då flera av arterna inte tidigare registrerats i området i artportalen eller har krav på den miljö de är knutna till som inte uppfylls inom Renovas verksamhetsområde bedöms det som osannolikt att de leker och vistas inom området. Troligtvis har en kontamination skett vid hantering av uttagna prover under något av laboratiemomenten, något som IVL bekräftat i sina utredningar (se bilaga 1).

Förekomst av vanlig padda har bekräftats på området i samband med visuella observationer i fält, men i vilken omfattning eller dess utbredning och lek på området kan inte helt säkerställas.

Utöver ovan angivna observationer har båda arter av vattensalamander detekterats i uttagna prover från sjön och lakvattendammen. Då ingen av dessa arter detekterats i den negativa kontrollen kan deras detektion i uttagna prover betraktas som sann. Förekomst av arten i eller i nära anslutning till vattensamlingar på området bedöms trolig, specifikt omkring det våtmarksområde i anslutning till sjön och lakvattendammarna. Mindre vattensalamander har även noterats på området inom tidigare utförd naturvärdesinventering (WSP, 2021).



## 6 Slutsatser och rekommendationer

De arter som detekterats i samband med föreliggande undersökning tyder på att förekomst av groddjur på området är sannolik. De olika arterna som noterats på området medför att två huvudtyper av hänsynstaganden blir aktuella. Arterna mindre vattensalamander och vanlig padda är fridlysta i Sverige och omfattas av skyddet som angivits i § 6 i Artskyddsförordningen. Detta medför att det är förbjudet att döda, skada, fånga eller på annat sätt samla in exemplar av arten eller skada dess ägg, larver eller bon. Givet detta föreslås att eventuellt arbete i vatten på området förläggs till perioden oktober-mars för att inte riskera att påverka arterna under deras lekperiod.

Större vattensalamander omfattas av de bestämmelser kring fridlysning som angivits i § 4a i samma förordning. Denna typ av skydd innebär ytterligare förbud mot att avsiktligt störa djuren under parnings- och uppfödningssäsonger samt under deras övervintrings- och flyttperioder. Fridlysningen innebär även bland annat att deras fortplantningsområden eller viloplatsar måste skyddas mot förstörelse. De skyddsåtgärder som angivits för vanlig padda och mindre vattensalamander ovan är aktuella även för större vattensalamander.

Då förekomst av fisk noterats i sjön både vid inventeringstillfället och vid tidigare utförd naturvärdesinventering (WSP, 2021) bedöms våtmarksområdet i sjöns sydliga del som mest troligt lekområde, i kombination med befintliga lakvattendammar. Därmed får våtmarksområdet i anslutning till sjön och lakvattendammarna inte förstöras. Eftersom större vattensalamander är känd för att uppehålla sig i lämpliga närmiljöer till lekvatten under sitt landlevande stadium (inom 10–100 m) behöver även närliggande skogsmark skyddas (Artfakta, 2023). För detta syfte, samt för att möjliggöra för fri passage till och från lokaler för lek och på så sätt skapa förutsättningar för populationens överlevnad och utveckling, har en skyddszon uppskattats som behöver skyddas från exploatering, se Figur 10 nedan.



Figur 10. Skyddszon för groddjur inom området som behöver skyddas från exploatering

Utöver ovan angivna åtgärder behöver det skogsområde som planeras lämnas kvar enligt situationsplanen (se Figur 1) förses med död ved från planerade avverkningar på området för att skapa ytterligare övervintringsplatser för groddjur. För att ytterligare främja artens fortlevnad på området rekommenderas anläggandet av en damm i samma naturområde som potentiell ny lokal för lek.

## 7 Referenser

Artfakta. (2023). Större vattensalamander. Hämtad 2023-02-15 från [Större vattensalamander - Artbestämning från SLU Artdatabanken \(artfakta.se\)](https://artfakta.se/storre-vattensalamander-artbestamning-fran-slu-artdatabanken)

AquaBiota. (2019). Inventering av groddjur i tre dammar i Lövsta med eDNA samt konventionell metodik. Rapport 2019:06

Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R., Foster, J., Wilkinson, J., Arnell, A., Brotherton, P., Williams, P., Dunn, F. (2014). Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*. 183. DOI: 10.1016/j.biocon.2014.11.029

SFS 2007:845. *Artskyddsförordning*. Miljödepartementet.

SLU Artdatabanken. (2020). Rödlistade arter i Sverige 2020. SLU, Uppsala

WSP. (2021). Naturvärdesinventering. Utgiven 2021-10-29

WSP. (2022). Groddjursinventering med eDNA-metoden i Hallunda Gård. Utgiven 2022-07-18

FEBRUARI 2023  
COWI SVERIGE AB

# BILAGA I – RESULTATRAPPORTER, eDNA-ANALYSER



**COWI**



FEBRUARI 2023  
COWI SVERIGE AB

# BILAGA I RESULTATRAPPORTER, eDNA-ANALYSER







**Analysuppdrag:** 216491, 22-0225

**Uppdrag:** Inventering av amfibier med eDNA

**Uppdragsgivare:** COWI

**Projektledare:** Mats Töpel

**Ankomstdatum prov:** 2022-06-17 och 2022-08-19

**Analysdatum och utförare:** 2022- aug, sep; Asa Motiej, Mikaela Boltensern

**DNA Sekvensering utförd av:** Novogen

### Uppdragets omfattning

Analys av miljö-DNA prov från två lokaler för detektion av amfibier (groddjur och salamandrar) med DNA-sekvensering och metabarkodning. Provtagning i fält har utförts av uppdragsgivaren och prover har sedan skickats till IVL's laboratorium i Stockholm.

### Provhantering/upparbetning

Vattenprover filtrerades genom 22µm Sterivex-filter, konserverades med 99.5% etanol, och skickades till IVL svenska miljöinstitutets Laboratorium i Stockholm där de förvarades i -20 °C frys fram till DNA extraktionen gjordes.

### DNA-analys metod

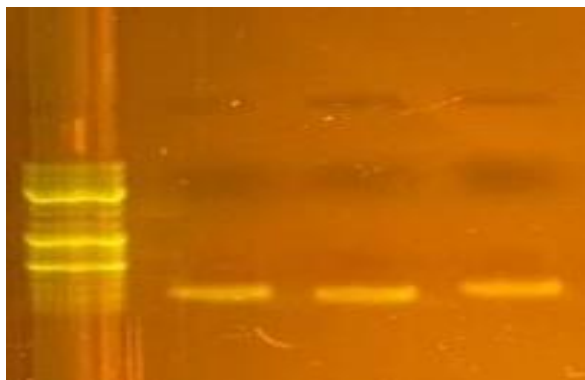
DNA extraherades med hjälp av DNeasy PowerWater Sterivex Kit (Qiagen, Cat. No. / ID: 14600-50-NF) och renad med Genomic DNA Clean & Concentrator-10 (Zymo Research, USA) enligt tillverkarens instruktioner (Tabell 1). DNA-amplifieringar utfördes i en slutlig volym på 50 µl innehållande 10 µl 5 X Q5 reaktionsbuffert, 0,2 µM batra primrar, 0,2 mM dNTPs, 4 µM human blocking primer och 0,02 U/µl Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New england biolab) (Tabell 2). En mikroliter DNA-extrakt från positiv kontroll ("mock community" bestående av DNA extraherat från fyra groddarter) samt fem mikroliter miljö-DNA-extrakt användes för PCR reaktionerna (1). Resulterande PCR-produkter renades sedan med Agencourt AMPure XP-kulor (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) och koncentrationen mättes med Qubit Flex Fluorometer (ThermoFisher, USA). Storleken på det amplifierade fragmenten visualiserades sedan på en 1% agarosgel med Invitrogen™ SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Figur 1). PCR-programmet bestod av följande steg: denaturering vid 98°C i 30 sek., följt av 30 cykler [98°C i 10 sek., 55°C i 15 sek. och 72°C i 30 sek.] samt ett avslutande steg av 72°C i 5 min.

**Tabell 1.** Prover som analyserats i projektet samt koncentrationer som uppmätts efter DNA-extraktion samt PCR-reaktion.

Provnamn kund	Provnamn IVL	IVL LIMS nummer	MängdDNA som extraherades från sterilvexfilter [ng/μl]	DNA-koncentration av (poolad) PCR-produkt [ng/μl]
Negativ kontroll	NC	287489	<0.05	1,83
Sjö	Sjö prov 1	274527	4,1	31,2
	Sjö prov 2	274529		
	Sjö 1	287481		
	Sjö 2	287482		
	Sjö 3	287483		
	Sjö 4	287484		
Damm	Dammprov 1	274526	2,0	31,8
	Dammprov 2	274528		
Mock Community	Grönfläckig padda	276658	12	26,8
	Gölgroda	276659		
	Vanlig padda	276661		
	Strandpadda	276660		

**Tabell 2.** Primersekvenser som använts för PCR-reaktionerna.

Name	Sequence (5'-3')
Batra-F	ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ACA CCG CCC GTC ACC CT
Batra-R	AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GTA YAC TTA CCA TGT TAC GAC TT
Human blocking primer	TCACCCTCCTCAAGTATACTTCAAAGGCA-SPC3I



**Figur 1.** Resultat från gelelektroforesanalysen visar (från vänster till höger) proverna 1) Sjö, 2) Damm, 3) Positiv kontroll ("Mock community").

### Biblioteksförberedelser och sekvensering

Proverna har sekvenserats av Novogen med platformen Illumina NovaSeq 6000, PE-150 (se separat rapport från Novogen för mer detaljer).

### Bioinformatisk analys

Sekvensdata analyserades med nf-core/ampliseq v2.4.0 (<https://nf-co.re/ampliseq>) och en referenssekvensdatabas innehållande samtliga 13 svenska amfibiearter (Swedish\_amphibians\_reference\_v0.2.fst) med följande inställningar:

```
nextflow run nf-core/ampliseq \  
-resume \  
-r 2.4.0 \  
-profile singularity \  
--input "./samplesheet.tsv" \  
--FW_primer ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNACACCGCCCGTCACCCT \  
--RV_primer AGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNGTAYACTTACCATGTTACGACTT \  
--double_primer \  
--dada_ref_tax_custom Swedish_amphibians_reference_v0.2.fst \  
--dada_ref_tax_custom_sp SP_Swedish_amphibians_reference_v0.2.fst \  
--dada_assign_taxlevels "Domain,Phylum,Class,Order,Family,Genus,Species" \  
--outdir "./results" \  
--max_memory "12 GB" \  
--max_cpus 8
```

### Resultat och slutsatser

Vid analysen detekterades samtliga fyra arter i den positiva kontrollen (Grönfläckig padda [*Bufo viridis*], Gölgröda [*Pelophylax lessonae*], Strandpadda [*Epidalea calamita*] och vanlig padda [*Bufo bufo*]).

I den negativa kontrollen detekterades Grönfläckig padda, Gölgröda, Strandpadda och vanlig padda, alltså samtliga arter som ingick i den positiva kontrollen. Denna signal beror troligen på att det positiva kontrollprovet har kontaminerat det negativa kontrollprovet under laboratoriearbetet, eller vid sekvenseringen av PCR-produkterna som utförts av Novogen.

I de två proverna "sjö" och "damm" detekterades Gölgröda, Strandpadda och vanlig padda, men detta resultat kan inte med säkerhet skiljas från en kontamination från den positiva kontrollen. Detta är alltså ett osäkert resultat som inte med säkerhet indikerar förekomst av

dessa arter på de två lokalerna. Mindre vattensalamander (*Lissotriton vulgaris*) detekterades dock i små mängder i båda proven och kan anses vara ett säkert resultat.

**Rapport utfärdad av**

Asa Motiei och Mats Töpel

**Rapporten granskad av**

Mikael Olshammar

Stockholm, 2022-10-19, IVL Svenska Miljöinstitutet AB

Utdrag från denna rapport får endast återges om IVL Svenska Miljöinstitutet AB tydligt anges som källa och data inte förändras.

**Referenser:**

1. Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen PF, et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol.* 2016;25(4):929–42.

**Analysuppdrag:** 216491, 22-0225

**Uppdrag:** Inventering av amfibier med eDNA

**Uppdragsgivare:** COWI

**Projektledare:** Mats Töpel

**Ankomstdatum prov:** 2022-06-17 och 2022-08-19

**Analysdatum och utförare:** 2022- Dec; Asa Motiei, Shazeeda Koonjan

**DNA Sekvensering utförd av:** Novogen

### Uppdragets omfattning

Analys av miljö-DNA prov från två lokaler för detektion av amfibier (groddjur och salamandrar) med DNA-sekvensering och metabarkodning. Provtagning i fält har utförts av uppdragsgivaren och prover har sedan skickats till IVL's laboratorium i Stockholm.

Dessa prover har analyserats vid ett tidigare tillfälle där sekvenseringsbibliotek och efterföljande sekvensering resulterade i ett lågt antal sekvenser (se separat rapport från 2022-10-19). Här rapporteras resultatet av analys av nya sekvenseringsbibliotek som tagits fram från samma prover som användes i den tidigare rapporten.

### Provhantering/upparbetning:

Vattenprover filtrerades genom 22µm Sterivex-filter, konserverades med 99.5% etanol, och skickades till IVL Svenska Miljöinstitutets laboratorium i Stockholm där de förvarades i -20 °C frys fram till DNA extraktionen gjordes.

### DNA-analys:

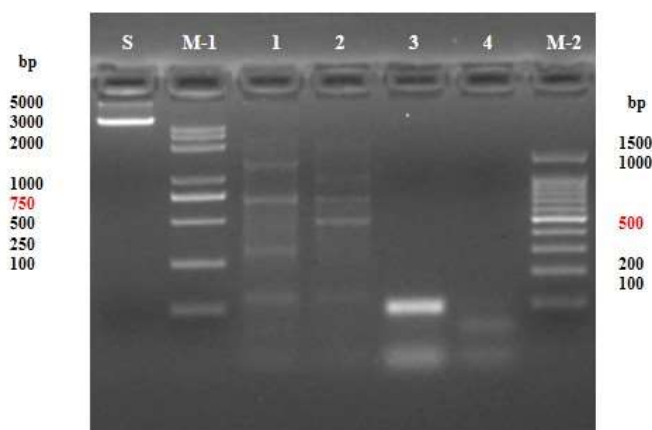
DNA extraherades med hjälp av DNeasy PowerWater Sterivex Kit (Qiagen, Cat. No. / ID: 14600-50-NF) och renad med Genomic DNA Clean & Concentrator-10 (Zymo Research, USA) enligt tillverkarens instruktioner. DNA- amplifisering utfördes i en slutlig volym på 50 µl innehållande 10 µl 5 X Q5 reaktionsbuffert, 0,2 µM batra primers, 0,2 mM dNTPs, 4 µM human blocking primer och 0,02 U/µl Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New england biolab) One microliter of positive control or 5 microliter of environmental DNA sample was used as template for the PCR reaction (1). PCR-produkter renades med Agencourt AMPure XP-kulor (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and concentrations were estimated using Qubit Flex Fluorometer (ThermoFisher, USA). To verify amplicon size, 5 ml of the PCR mixtures were run on a 2% agarose gel containing Invitrogen™ SYBR™ Safe DNA Gel Stain. The thermal program was the following: denaturation at 98°C for 30 s, 35 cycles of 98°C for 30 s, 57°C for 30s, 72°C for 1 min and final elongation at 72°C for 7 min.

**Tabell 1.** Prover som analyserats i projektet samt koncentrationer som uppmätts efter DNA-extraktion samt PCR-reaktion.

Provnamn kund	Provnamn IVL	IVL LIMS nummer	DNA/ PCR [ng/μl]
Negative Control	NC	287489	1.11
Sjö	Sjö prov 1	274527	11.1
	Sjö prov 2	274529	
	Sjö 1	287481	
	Sjö 2	287482	
	Sjö 3	287483	
	Sjö 4	287484	
Damm	Dammprov 1	274526	8.49
	Dammprov 2	274528	
Mock Community	Grönfläckig padda	276658	11.7
	Gölgroda	276659	
	Vanlig padda	276661	
	Strandpadda	276660	

**Tabell 2.** Primersekvenser som använts för PCR-reaktionerna.

Name	Sequence (5'-3')
Batra-F-s	ACACCGCCCGTCACCCCT
Batra-R-s	GTAYACTTACCATGTTACGACTT
Human blocking primer	TCACCCTCCTCAAGTATACTTCAAAGGCA-SPC3I



**Figur 1.** Resultatet av gelelektroforesanalys utförd av Novogen. Standardprov (S), Trans 2k plus DNA-stege (M-1), "Sjö" (1), "Damm" (2), Positiv kontroll (3), Negativ kontroll (4), DNA-stege (M-2).

### Biblioteksförberedelser och sekvensering:

Proverna har sekvenserats av Novogen med plattformen Illumina NovaSeq 6000, PE-150 (se separat rapport från Novogen för mer detaljer).

### Bioinformatisk analys

Sekvensdata analyserades med nf-core/ampliseq v2.4.0 (<https://nf-co.re/ampliseq>) och en referenssekvensdatabas innehållande samtliga 13 svenska amfibiearter (Swedish\_amfibians\_reference\_v0.2.fst) med följande inställningar:

```
nextflow run nf-core/ampliseq \  
-resume \  
-r 2.4.0 \  
-profile singularity \  
--input "./samplesheet.tsv" \  
--FW_primer ACACCGCCCGTCACCCT \  
--RV_primer GTAYACTTACCATGTTACGACTT \  
--double_primer \  
--dada_ref_tax_custom Swedish_amphibians_reference_v0.2.fst \  
--dada_ref_tax_custom_sp SP_Swedish_amphibians_reference_v0.2.fst \  
--dada_assign_taxlevels "Domain,Phylum,Class,Order,Family,Genus,Species" \  
--outdir "./results" \  
--max_memory "12 GB" \  
--max_cpus 8
```

### Resultat och slutsatser

Vid analysen detekterades samtliga fyra arter i den positiva kontrollen (Grönfläckig padda [*Bufoles viridis*], Gölgröda [*Pelophylax lessonae*], Strandpadda [*Epidalea calamita*] och vanlig padda [*Bufo bufo*]).

I den negativa kontrollen detekterades Grönfläckig padda, Gölgröda, Strandpadda och vanlig padda, alltså samtliga arter som ingick i den positiva kontrollen. Denna signal beror troligen på att det positiva kontrollprovet har kontaminerat det negativa kontrollprovet under laboratoriearbetet, eller vid sekvenseringen av PCR-produkterna som utförts av Novogen.

I provet "Sjö" detekterades samtliga fyra arter som ingick i den positiva kontrollen, vilket tyder på att problemet med kontamination som rapporterats tidigare kvarstår. I provet detekterades även höga mängder av Mindre vattensalamander (*Lissotriton vulgaris*) samt måttliga mängder av Större vattensalamander (*Triturus cristatus*).

I provet "Damm" detekterades Grönfläckig padda som ingår i den positiva kontrollen, vilket gör att detta resultat inte kan skiljas från en kontamination. I provet detekterades även måttliga mängder av Större vattensalamander (*Triturus cristatus*). I den tidigare analysen identifierades även Mindre vattensalamander (*Lissotriton vulgaris*) i detta prov. Det sammantagna resultatet blir därför att vi kan detektera båda dessa salamandrar i denna lokal.

**Rapport utförd av**

Mats Töpel

**Rapporten granskad av**

Mikael Dahl

Stockholm, 2023-01-20, IVL Svenska Miljöinstitutet AB

Utdrag från denna rapport får endast återges om IVL Svenska Miljöinstitutet AB tydligt anges som källa och data inte förändras.

**Referenser:**

1. Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen PF, et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol.* 2016;25(4):929–42.