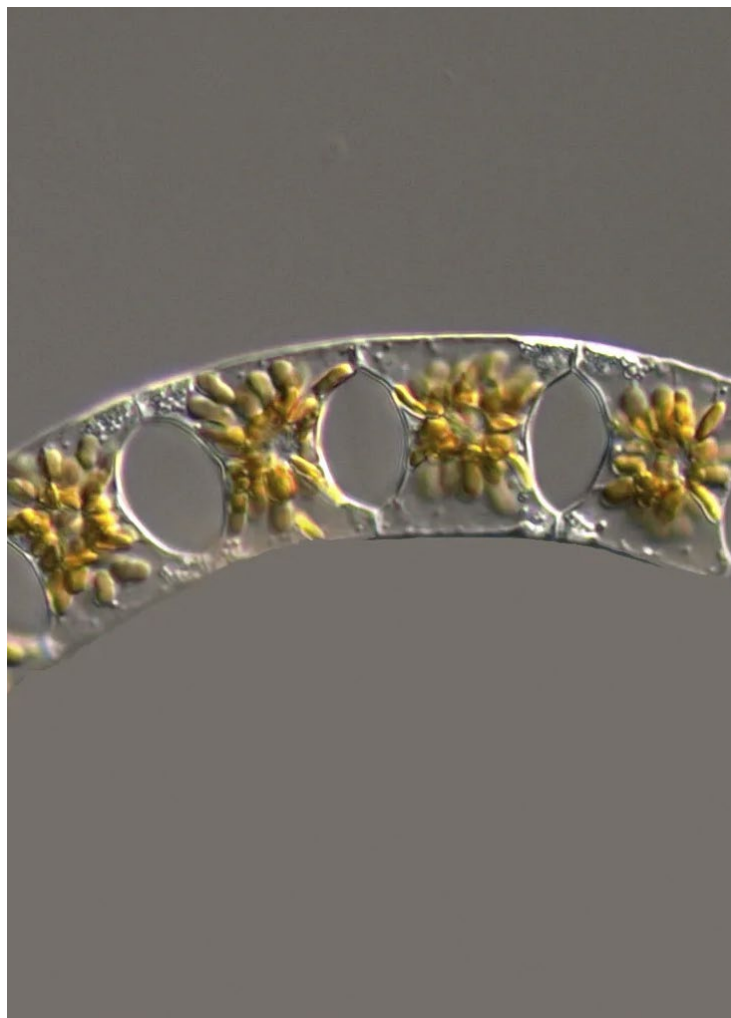


DNA-streckkodning av marina växtplankton

Ett nytt verktyg i miljöövervakningen

Agneta Andersson, Bengt Karlson,
Anders F Andersson, Anders Torstensson,
Sonia Brugel, Meike AC Latz,
Krzysztof T Jurdzinski, Mikael Hedblom,
Jenny Lycken, Markus Lindh

RAPPORT 7143 | JUNI 2024



DNA-streckkodning av marina växtplankton

Ett nytt verktyg i miljöövervakningen

av Agneta Andersson, Bengt Karlson, Anders F Andersson, Anders Torstensson,
Sonia Brugel, Meike AC Latz, Krzysztof T Jurdzinski, Mikael Hedblom,
Jenny Lycken och Markus Lindh

Beställningar

Ordertel: 08-505 933 40

E-post: natur@cm.se

Postadress: Arkitektkopia AB, Box 110 93, 161 11 Bromma

Internet: www.naturvardsverket.se/publikationer

Naturvårdsverket

Tel: 010-698 10 00

E-post: registrator@naturvardsverket.se

Postadress: Naturvårdsverket, SE-106 48 Stockholm

Internet: www.naturvardsverket.se

ISBN 978-91-620-7143-1

ISSN 0282-7298

© Naturvårdsverket 2024

Arkitektkopia AB, Bromma 2024

Omslagsfoto: Kiselalgen *Eucampia zodiacus*.

Foto, Bengt Karlson, SMHI



Förord

Här presenteras resultaten från forskningsprojektet ”DNA-streckkodning av marina växtplankton”. Projektet är ett av åtta projekt som genomförts inom forskningssatsningen DNA-metoder inom miljöövervakning.

Med forskningsområdet ville Naturvårdsverket och Havs- och vattenmyndigheten stödja forskning som kan bidra till en bättre och effektivare miljöövervakning genom införande av DNA-baserad analysteknologi.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag.

Rapporten har skrivits av

Agneta Andersson, Umeå universitet

Bengt Karlson, SMHI

Anders F Andersson, KTH SciLifeLab

Anders Torstensson, SMHI

Sonia Brugel, Umeå universitet

Meike AC Latz, KTH SciLifeLab/Köpenhamns universitet

Krzysztof T Jurdzinski, KTH SciLifeLab

Mikael Hedblom, SMHI

Jenny Lycken, SMHI

Markus Lindh, SMHI

Rapporten har granskats för vetenskaplig kvalitet av Sonja Leidenberger (Högskolan i Skövde) och för praktisk relevans av Carina P. Erlandsson (Länsstyrelsen Västra Götalands län).

Författarna svarar för rapportens innehåll.

Naturvårdsverket i maj 2024

Marie Uhrwing

Avdelningschef, Hållbarhetsavdelningen

Innehåll

Förord	3
Sammanfattning	5
Summary	6
Termer och förkortningar	7
1. Introduktion	8
2. Metoder	11
2.1 Provtagningsteknik	11
2.2 DNA extraktion och sekvensering	14
2.3 Bioinformatik	15
3. Resultat	16
3.1 Primerdesign	16
3.2 Provvolum och förvaringstemperatur för DNA-analys	17
3.3 Jämförelse DNA-streckkodning och mikroskopi	18
3.3.1 Fördelning av eukaryota växtplanktongrupper	18
3.3.2 Mikroskopimått abundans, biovolum och kolbiomassa	20
3.3.3 Utvärdering av kvantitativ DNA analys	21
3.3.4 Encelliga plankton – en översikt av biologisk mångfald	22
3.3.5 Antal identifierade taxa	23
3.3.6 Variation mellan prover	23
3.4 Utbredning av skadliga alger	24
3.4.1 Växtplankton som kan orsaka förgiftningar vid förtäring av musslor	25
3.4.2 Växtplankton som orsakar fiskdöd	27
3.5 Ekologiska drivkrafter i Östersjön-Västerhavet gradienten	30
4. Datavärdskap, datahantering och datatyp	33
5. Diskussion	34
5.1 Sekvenserade regioner – varierande resultat olika växtplanktongrupper	34
5.2 DNA-streckkodning identifierar fler taxonomiska grupper än mikroskopi	35
5.3 Kvantitativ DNA analys – fortsatt utredning	35
5.4 Fördelning av eukaryota växtplankton – indikator på miljöförändring	36
6. Slutsatser	37
7. Utvecklingsbehov	38
8. Rekommendationer	39
9. Kommunikation	40
10. Källhänvisningar	41
11. Tack	45
Bilaga A – Förslag till övervakningsmanual	46

Sammanfattning

Växtplankton utgör grunden i den marina näringsväven och används världen över för att bestämma miljöstatus i hav och sjöar. De ingår exempelvis som en kvalitetsfaktor i EU:s vattendirektiv och havsmiljödirektiv. Det finns långa tidsserier av växtplanktonövervakning där analyserna utförts med mikroskopi. Det sker nu en snabb internationell utveckling av DNA-metoder för att övervaka växtplankton. Målsättningen med detta projekt var att utveckla en praktisk och robust DNA analysmetod som kan implementeras i svensk marin miljöövervakning.

Vårt tillvägagångssätt var att följa med på ordinarie marina miljöövervakningsexpeditioner under ett års tid (2019–2020) och ta parallella havsvattenprov för så kallad DNA-streckkodning av växtplankton. Sammanlagt tog vi prov vid 19 övervakningsstationer som var spridda från Bottenviken i norr till Skagerrak i söder. Provtagningsfrekvensen var cirka 1 gång per månad. Praktiska metoder utarbetades för fältprovtagning, DNA-extraktion, sekvensering, bioinformatisk analys och taxonomisk annotering. Vi har även tagit fram system för datahantering hos nationell datavärd och gett förslag på en ny datatyp för nationellt datavärdskap för marinbiologi och oceanografi vid Svenskt Oceanografiskt Datacentrum (<https://sharkweb.smhi.se/hamta-data/>).

En viktig del har varit att jämföra resultaten av DNA-streckkodning och mikroskopi. Resultaten visar att DNA-streckkodning ger ungefär dubbelt så högt biodiversitetsmått än mikroskopering, även om det skiljer sig åt mellan olika grupper av växtplankton. För att undersöka om DNA-streckkodning kan användas för kvantitativ analys tillsatte vi en intern standard till proverna bestående av syntetiskt DNA, men eftersom resultatet varierade så behöver man arbeta vidare med detta. Den relativa fördelningen av vanliga eukaryota växtplanktongrupper visade sig ha relativt bra överensstämmelse mellan DNA-streckkodning och mikroskopimåttet kolbiomassa, medan biovolym och abundans skiljde sig åt mer. DNA-streckkodning visade sig ge detaljerade utbredningsmönster av skadliga alger, till exempel för släktet *Prymnesium* bland häftalgerna (Coccolithophyceae).

Vi har inom projektet kunnat utvärdera ekologiska drivkrafter för växtplanktonsamhällets diversitet och artsammansättning, genom att miljöövervakningen mäter många fysikalisk-kemiska parametrar. Både salthalt och närsalter visade sig ha stor inverkan på växtplanktonsamhällets sammansättning och diversitet.

Sammanfattningsvis ser vi att den framtagna DNA-streckkodningsmetoden skulle vara ett bra komplement till den etablerade växtplanktonövervakningen.

Summary

Phytoplankton constitute the base of the marine food web and is used all over the world to assess the quality status of marine and freshwater systems. Phytoplankton are for example used in the EU Marine Strategy Framework Directive and in the EU Water Framework Directive. There are long time series of data from monitoring programs, where phytoplankton are analyzed using microscopy. However, presently DNA methods are quickly emerging. The aim of this project was to develop a practical and robust method to analyze phytoplankton that can be implemented in Swedish marine monitoring programs.

The project was performed by joining the regular marine monitoring cruises for a period of one year (2019–2020). We collected parallel seawater samples for DNA metabarcoding of phytoplankton. Nineteen stations were sampled, all the way from the Bothnian Bay in the northern Baltic Sea to the Skagerrak adjacent to the North Sea, with a sampling frequency of ~1 sampling per month. Best practices were developed for field sampling, DNA extraction, sequencing, bioinformatics and taxonomic annotation. We also produced a system for data handling at the national host, and provided a new data type for national data host for marine biology and oceanography, the National Oceanographic Data Centre (<https://sharkweb.smhi.se/hamta-data/>).

An important part of the project was to compare results from DNA metabarcoding and microscopy. In general, results of DNA metabarcoding gives about twice as high biodiversity measures than microscopy, even though it varies between different phytoplankton groups. We found that the reference databases have shortcomings and need to be further developed. To find out if DNA metabarcoding can be used quantitatively, we added an internal standard to the samples, composed of synthetic DNA strings. The analysis showed varying results, and therefore further development is needed. The distribution of common eukaryotic groups showed relatively good agreement between DNA metabarcoding and the carbon biomass microscopy metric, while biovolume and abundance showed larger deviations. With DNA metabarcoding we were able to produce detailed maps of the occurrence of potentially harmful algae, for example the genus *Prymnesium*.

By using physicochemical data measured in the monitoring programs we have looked for environmental drivers of phytoplankton diversity and community composition. Both salinity and nutrients were shown to have significant impacts on the phytoplankton communities.

In summary, we think that the developed DNA metabarcoding method would be a valuable complement to the established microscopy-based phytoplankton monitoring.

Termer och förkortningar

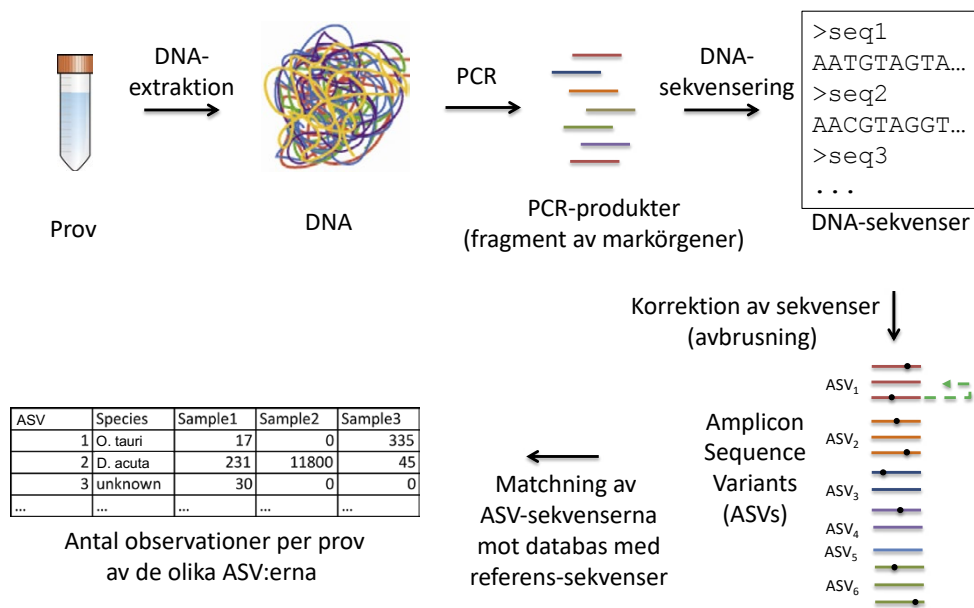
Term	Förklaring
Alfadiversitet	Mångfalden av arter på lokal nivå: t.ex. inom ett område, habitat eller ekosystem.
ASV	”Amplicon sequence variant”. Unik gensekvens som ofta motsvarar en art. Dock finns en naturlig variabilitet, då samma ASV ibland finns hos flera arter. Det är också möjligt att en art har flera olika ASV:er.
Betadiversitet	Olikhet i artsammansättning mellan områden, habitat eller ekosystem.
Biodiversitet	Biologisk mångfald.
bp	Baspar i DNA.
DNA-streckkodning	Analys av DNA-fragment i miljöprover samt identifikation av arter med hjälp av taxonomiska referensdatabaser.
EmodNET	”European Marine observation and data network”.
ENA	”European Nucleotide Archive”.
GBIF	”Global Biodiversity Information Facility”.
GTDB	”Genome Taxonomy Database”.
ICES	Internationella Havsforskningsrådet.
NGI	”National Genomics Infrastructure”.
PCR	”Polymerase Chain Reaction”.
Primer	Kort DNA-sekvens som initierar DNA-syntes vid PCR.
PR ²	”Protist Reference Database 2”.
qPCR	Kvantitativ PCR.
R	Mjukvara för statistisk beräkning.
rRNA	Ribosomalt ribonukleinsyra.
rDNA	DNA som kodar för rRNA.
rRNA operonet	Består av flera olika subenheter. T.ex. hos eukaryoter: 18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S.
SBDI	”Swedish Biodiversity Data Infrastructure”.
SHARK	Svenskt HavsArkiv.
SILVA	”SILVA rRNA database project”
Taxa	Taxonomisk klassificering på olika nivåer, till exempel art, släkte, familj, ordning, klass etc.
Utermöhl	Mikroskoperingsteknik för identifikation och kvantifiering av nano- (2–20 µm) och mikroväxtplankton (20–200 µm).
18S	18S rRNA. En subenhet av rRNA hos eukaryoter.
16S	16S rRNA. En subenhet av rRNA hos prokaryoter.

1. Introduktion

Växtplankton har en nyckelroll i de globala biogeokemiska kretsloppen, då de utgör basen i de marina födokedjorna. De består av både pro- och eukaryota organismer. Växtplanktonsamhällena hyser stor biologisk mångfald, men är också mycket känsliga för miljöförändringar såsom övergödning och klimatförändringar. Detta gör att man världen över använder växtplankton som kvalitetsindikatorer för miljötillståndet i både hav och sjöar.

Den metod som länge har använts för att analysera växtplankton inom miljöövervakningen är mikroskopering, där man framför allt identifierar nano- (2–20 μm) och mikroplankton (20–200 μm), medan picoplankton (0,2–2 μm) är för små för att analyseras. I mikroskopet identifieras och räknas olika växtplanktonarter och grupper, och deras storlek mäts. Därefter kan abundans, biovolym och kolbiomassa beräknas, vilket ger ett underlag för biodiversitetsberäkning. Eftersom plankton visar stor variation under olika årstider, gör man provtagningar vid miljöövervakningsstationerna minst en gång per månad under hela året. Inom svensk marin miljöövervakning finns nu långa tidsserier som är mycket värdefulla för att utvärdera förändringar av havsmiljön. Innan byte av en gammal metod till en ny görs, bör dessa interkalibreras så att det inte uppstår artificiella brott i tidsserierna.

En ny identifikationsmetod som utvecklas snabbt över hela världen är DNA-streckkodning ("DNA barcoding" eller "metabarcoding" på engelska) av växtplankton. Metoden har en stor potential, eftersom man med den kan identifiera både stora och små växtplankton, allt från picoplankton till nano- och mikroplankton. Metoden (Figur 1) går i korthet ut på att man filtrerar havsvatten innehållande både pro- och eukaryota organismer, extraherar DNA, sekvenserar och bioinformatiskt analyserar gensekvenserna. Därefter identifierar man dessa taxonomiskt till art-, släktes- eller högre nivå genom att använda referensdatabaser. Metoden kan ge information om vilka pro- och eukaryota växtplankton som finns i havsvattnet samt deras relativa förekomst. Detta kan i sin tur användas för att beräkna diversiteten, d.v.s. mångfalden, i växtplanktonsamhället. DNA-streckkodning har emellertid begränsningar då det framförallt anses vara en kvalitativ metod och på sin höjd en semikvantitativ metod. Därutöver kan det finnas begränsningar i referensdatabasernas innehåll, t.ex. om arter saknas eller om felaktiga taxonomiska bestämningar har gjorts. En fördel är dock att streckkodningsdata kan analyseras om då referensdatabaserna har uppdaterats. Eftersom alla metoder har sina begränsningar, är det viktigt att optimera och validera dessa innan de implementeras i miljöövervakningsprogrammen.



Figur 1. Schematisk bild över DNA-streckkodning. DNA extraheras från proven som skall undersökas och markörgener kopieras upp från DNA:t med PCR. DNA-sekvensering utförs så att ett stort antal (ofta tiotusentals till miljontals) markörgen-sekvenser erhålles per prov. Vanligtvis används sedan ett datorprogram för att rätta till felaktiga sekvenser (s.k. avbrusning) och man erhåller då s.k. ASV:er ("amplicon sequencing variants") som motsvarar felfria biologiska sekvenser. Dessa annoteras därefter mot en databas innehållande referenssekvenser för olika arter.

Det övergripande målet med detta projekt var att undersöka om DNA-streckkodning kan användas för att kartlägga biodiversitet hos växtplanktonsamhällen i Sveriges havsvatten. Ett speciellt fokusområde var förekomsten av skadliga växtplankton som kan producera toxiner. Vi tog oss an projektet genom att utvärdera olika steg i metodiken, från vattenprovtagning till sekvensering, bioinformatik och artbestämningar. Vi utvärderade och designade också s.k. "primers" för sekvensering av korta och långa sekvenser i subenheter av ribosomalt DNA (rDNA) hos pro- och eukaryota växtplankton. För taxonomisk bestämning av DNA-sekvenserna använde vi oss av internationella databaser som PR² ("Protist Ribosomal Reference Database", Guillou et al. 2013, <https://pr2-database.org>), GTDB (Genome Taxonomy Database, <https://gtdb.ecogenomic.org>) och SILVA ("high quality ribosomal RNA databases", <https://www.arb-silva.de/>). Vidare har vi undersökt hur väl dessa DNA-databaser stämmer överens med traditionell taxonomisk klassificering och även gjort harmoniseringar och korrigeringar. Vi har även testat om DNA-streckkodningsmetoden kan ge kvantitativa mått genom att tillsätta en känd mängd intern standard av syntetiskt DNA till proven. En viktig del i projektet var också att jämföra resultatet av DNA-streckkodning med mikroskopi, för att ta reda på om DNA-streckkodning kan användas som ett komplement till den etablerade mikroskopieringstekniken. I detta arbete har vi undersökt vilket av mikroskopimåtten; abundans, biovolym eller kolbiomassa, som stämmer bäst överens med DNA-streckkodning.

Projektet utfördes i samverkan med de ordinarie marina miljöövervakningsprogrammen där en rad fysikalisk-kemiska parametrar mäts, såsom salthalt, temperatur och koncentration av olika närsalter. Detta gav oss en möjlighet att utforska ekologiska drivkrafter för växtplanktonsamhällets sammansättning och biodiversitet.

En viktig leverans från projektet har varit att ta fram en praktisk och användbar metodik för DNA-streckkodning i marina miljöövervakningsprogrammen. Detta innefattar produktion av en fält- och laboratorie-manual (Bilaga A), system för datahantering, samt framtagande av en ny datatyp för nationellt datavärdskap för marinbiologi och oceanografi (<https://sharkweb.smhi.se/hamta-data/>).

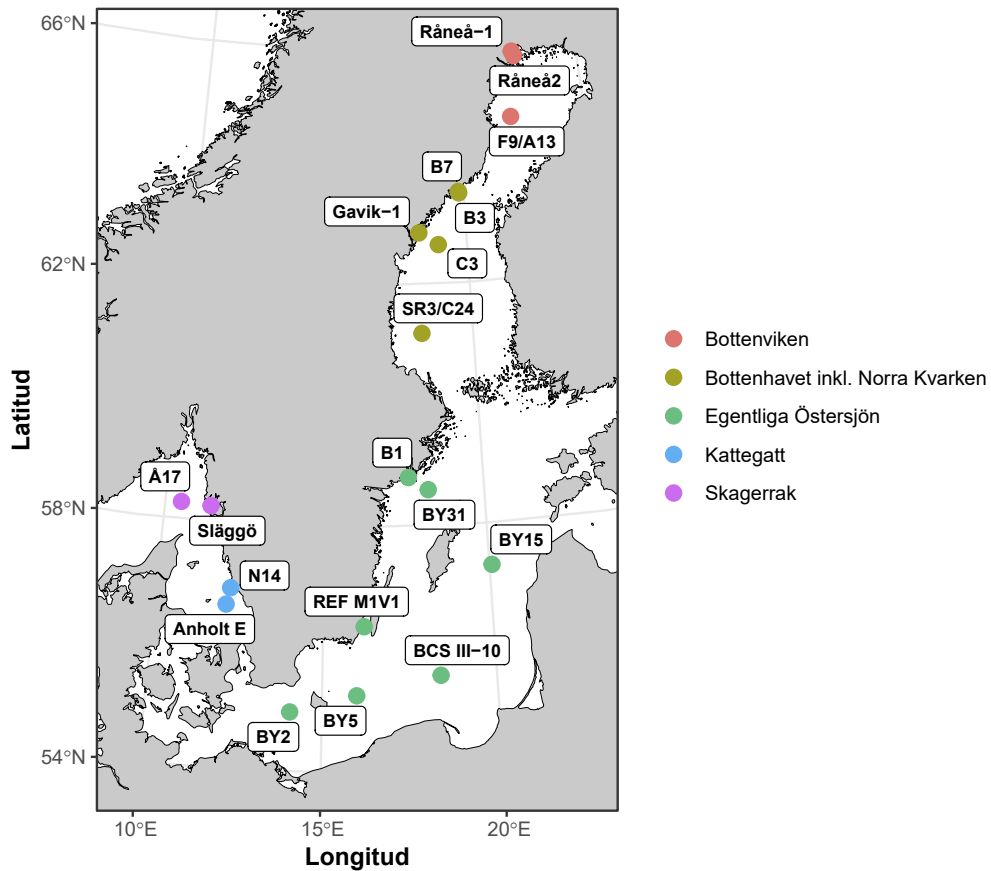
2. Metoder

2.1 Provtagningsteknik

Prover för DNA-streckkodning samlades in vid 19 stationer från forskningsfartyg i samband med pågående nationell miljöövervakning av växtplankton i havet under perioden januari 2019 till februari 2020 (Figur 2, 3). Provtagningsfrekvensen var vanligtvis en gång per månad, men vid stationerna Anholt E, Släggö, B1 (Askö) och BY31 (Landsortsdjupet) var provtagningarna mer frekventa, ca. 20 gånger per år. Endast ett fåtal prover samlades in vid station SR3/C24. Vattenprover samlades in med slang som täcker djupintervallet 0–10 m (Figur 4), förutom vid stationerna B1 och BY31 där 0–20 m täcktes. Delprover för mikroskopering och DNA-analys togs från samma slangprov. Ombord på fartygen koncentrerades DNA-proverna genom filtrering (Figur 5). Filtren med organismerna frystes sedan vid temperaturen $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. När fartygen anlöpt hamn flyttades proverna över till $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ frysar. I de ordinarie miljöövervakningsprogrammen togs prov för mikroskopianalys av växtplankton (Figur 6), vilket utgjorde en betydelsefull jämförelsebas i vårt DNA-streckkodningsprojekt.



Figur 2. Forskningsfartyget R/V Svea användes för provtagningar i Egentliga Östersjön, Kattegatt och Skagerrak (foto till vänster, SLU), förutom vid station B1 och BY31 i Egentliga Östersjön där Stockholms universitet utförde provtagningar med några olika fartyg. I Bottniska viken användes Kustbevakningens fartyg KBV181 (foto till höger, Kustbevakningen).



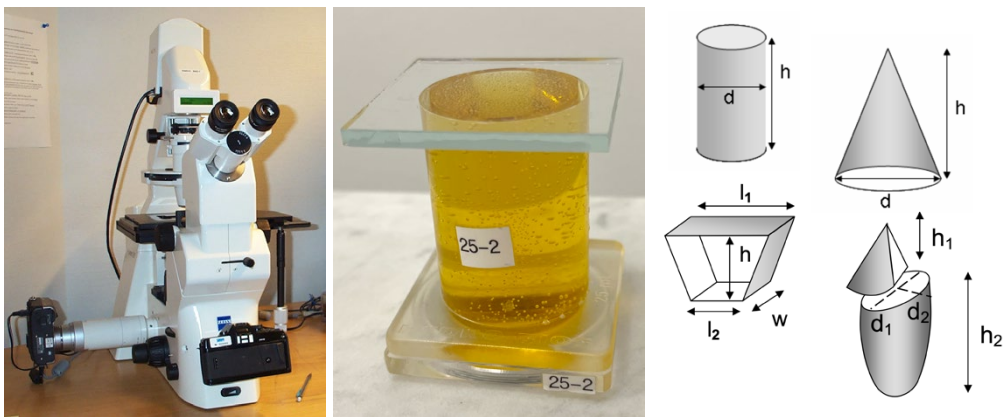
Figur 3. Provtagningsplatser för växtplankton och DNA. Vid station BCS III-10 utfördes endast analys av DNA, växtplankton ingår inte i det nationella programmet för denna station.



Figur 4. Slang som täcker djupintervallet 0–10 m användes vid de flesta stationerna. Undantagen är: 0–20 m vid stationerna B1 (Askö) och BY31 Landsortsdjupet i Egentliga Östersjön samt 0–5 m vid Råneå-1 i Bottenviken.



Figur 5. Proverna koncentrerades med filtrering. Filter med plankton frystes i små plastburkar (kryovialer).



Figur 6. Mikroskopanalys utfördes enligt standardmetoder för nationell miljöövervakning – den så kallade Utermöhl-metoden med inverterat mikroskop (vänstra bilden). Proverna koncentrerades i sedimentationskammare (mitten). Biomassa beräknades baserat på cell-volymer beräknade utifrån förenklade geometriska modeller av växtplankton (exempel i bilden till höger) (Olenina et al. 2006).

2.2 DNA extraktion och sekvensering

Extrahering av DNA utfördes i enlighet med framtaget metoddokument (Andersson et al. 2022, <https://www.protocols.io/view/dna-extraction-protocol-for-dna-metabar-coding-of-m-bucjnsun.html>). Metoden bygger på ett DNA extraktionskit från Zymo-BIOMICS. Intern standard-DNA med känd koncentration (en för 16S och en för 18S) tillsätts i provet. Tidsåtgång för DNA extraktion är cirka 2 timmar per 10–12 prov.

Utrustning som behövs:

- Extraktionskit
- Mikropipetter
- Vortex med adapter, t.ex. Vortex-Genie 2 med horisontell mikrotubhållare
- Centrifug för Eppendorf-rör (1.5/2 ml rotor), kapacitet av 16 000 × g
- Qubit Fluorometer

Efter DNA extraktion amplifierades med hjälp av polymeraskedjereaktion ("polymerase chain reaction", PCR) ett fragment av genen för 16S rRNA för identifiering av bakteriella plankton, och 18S rRNA för identifiering av eukaryota plankton. För PCR av 16S rRNA genen användes primer-paret 341F – 805R (Herlemann et al. 2011) som genererar amplicon (PCR-produkt) som inkluderar variabla regionerna V3 och V4 och som matchar ca. 95 % av 16S sekvenser i referensdatabaser (Hugerth et al. 2014). För 18S rRNA användes V4F-V4RB (Balzano et al. 2015) som genererar amplicon som inkluderar V4. Vi använde en två-steps PCR, där den första PCR:en amplifierar genfragmentet av intresse och den andra PCR:en inkorporerar provspecifika index-sekvenser och Illumina adaptorer i ändarna på ampliconen. För detta användes det s.k. Adapterama-schemat (Glenn et al. 2019). DNA-sekvensering gjordes på Illumina MiSeq (Figur 7), med parade 300 baspar (bp) läsningar (dvs 300 bp lästes från varje ände av ampliconen), resulterande i överlappande läs-par för både 16S och 18S. I medeltal genererades cirka 100 000 läs-par per prov. Prepareringen av sekvenserings-biblioteken och DNA-sekvensering utfördes av National Genomics Infrastructure (NGI) på SciLifeLab i Solna, Sverige.



Figur 7. Illumina MiSeq på SciLifeLab i Solna, Sverige.

2.3 Bioinformatik

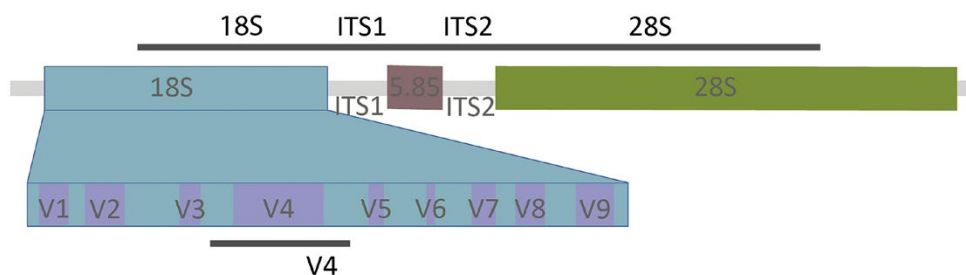
I början av projektet övervägde vi att använda ”operational taxonomic units” (d.v.s. kluster av sekvenser som skiljer sig med som mest t.ex. 3 %), men beslöt oss för att istället använda ”amplicon sequence variants” (ASV:er), dvs unika gensekvenser, som anses ge mer precis taxonomisk information. Det finns dock en naturlig variabilitet, då man ibland kan finna samma ASV hos flera närbesläktade arter. Det är också möjligt att en art har flera olika ASV. Efter rekonstruktion av ASV:er annoteras dessa taxonomiskt med hjälp av referensdatabaser. Den detaljerade processen beskrivs nedan.

Data från DNA-sekvenseringen bearbetades i följande steg: 1) avlägsnande av primer-sekvenser och lågkvalitativt DNA; 2) avbrusning, dvs bioinformatisk korrektion av data så att ett antal ASV:er rekonstrueras, som skall motsvara felfria biologiska sekvenser; 3) avlägsnande av chimärer (två eller flera biologiska sekvenser som oavsiktligt kombinerats ihop i PCR:en); 4) taxonomisk annotering av återstående ASV:er. Steg 1 utfördes med programmet Cutadapt (Martin 2011), steg 2–4 med paketet DADA2 (Callahan et al. 2016) i R. I uppföljande projekt används pipelinen nf-core/ampliseq (<https://nf-co.re/ampliseq>) som utför alla stegen ovan automatiskt. För den taxonomiska annoteringen användes för 16S dels en av Swedish Biodiversity Data Infrastructure (SBDI) kurerad version (<https://doi.org/10.17044/scilifelab.14869077>) av 16S sekvenser från Genome Taxonomy Database Project (GTDB; (Parks et al. 2018) och dels SILVA databasen (Quast et al. 2013). SILVA användes för att komplettera GTDB-annoteringen med annotering av kloroplast-sekvenser, vilka ej innefattas av GTDB. För 18S användes Protist Ribosome Reference (PR²) databasen (Guillou et al. 2013).

3. Resultat

3.1 Primerdesign

Vid DNA-streckkodning är det önskvärt att PCR-primrarna är exakt komplementära till en så stor andel av markörgenerna i provet som möjligt, så att det amplifierade biblioteket blir representativt för det ursprungliga planktonsamhället. Detta är en utmaning vid analys av så pass taxonomiskt breda organismgrupper som bakterier och protister. Endast gener i rRNA-operonet har tillräckligt konserverade regioner för att samma primer-par ska kunna amplifiera DNA hos en majoritet av organismerna i dessa grupper. Samtidigt har dessa gener variabla regioner mellan de konserverade, vilka möjliggör taxonomisk identifiering. Eftersom valet av primrar är så centralt gjorde vi en utvärdering av publicerade primrar och ett försök att designa bättre primrar (Latz et al. 2022). Utvärderingen gjordes dels för amplifiering av variabla regioner av 18S genen för sekvensering med Illumina (2 x 300 bp), och dels för amplifiering av en stor del av hela eukaryota rRNA operonet (18S + ITS1 + 5.8S + ITS2 + 28S) för sekvensering med "long-read" metoder som Oxford Nanopore eller PacBio (Figur 8).



Figur 8. Schematisk bild över rRNA-operonet med en förstoring av 18S rRNA-genen och dess variabla regioner markerade. De mörkgråa horisontella linjerna representerar segment som amplifieras för DNA-streckkodning av antingen V4-regionen i 18S (nedre) eller en stor del av rRNA operonet för "long-read"-sekvensering (övre).

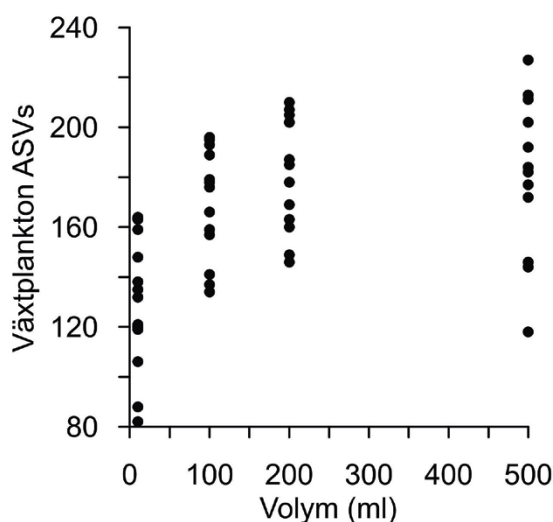
Analysen som baserades på referens-sekvenser i PR2 (Guillou et al. 2013) och SILVA (Quast et al. 2013) och inkluderade 27 primrar (18 gamla och 9 nya) visade att primer-paret som amplifierar V4–V5 regionerna i 18S som Anders Anderssons grupp tidigare designade (Hugerth et al. 2014) alltjämt var det med bäst taxonomisk täckning av referens-sekvenserna. Detta par ger dock för långa amplikon för att få överlappande 2 x 300 bp-läsningar. Primer-paret från Balzano et al., (Balzano et al. 2015) som amplifierar V4-regionen ger endast något sämre täckning men ger överlappande read-par. Vi lyckades bara designa marginellt bättre primers för V4-regionen (Latz et al. 2022), och eftersom Balzano-paret har använts i många tidigare studier på protister valde vi att använda det, så att våra data blir jämförbara med data från dessa studier.

För amplifiering av en stor del av rRNA-operonet för "long-read" sekvensering kan man t.ex. använda en primer som binder in före V4 regionen i 18S (t.ex. Balzano) och en primer som binder in mot slutet av 28S rRNA genen. Vi designade en ny

primer (3143R) som binder in efter variabel region D10 i 28S genen och som matchar en stor del (90 %) av 28S sekvenserna i SILVA. Vi testade V4-primern från Balzano i kombination med vår nya 3143R-primer på några av våra vattenprover och det resulterade i robust PCR-amplifiering (Latz et al. 2022). Detta primer-par kan således vara aktuellt att använda i monitorering om kostnaden för ”long-read” sekvensering sjunker i framtiden.

3.2 Provolym och förvaringstemperatur för DNA-analys

Olika provfiltreringsvolym (10, 100, 200, 500 ml) jämfördes i fem replikat tagna vid tre olika provtagningstillfällen vid Släggö-stationen (Figur 9) för att validera att 500 ml var tillräckligt för att täcka den mikrobiella mångfalden. Replikaten bestod av tekniska replikat, det vill säga delprov från samma vattenprov. Antalet växtplankton ASV:er ökade med provvolymen som filtrerades upp till 200 ml (Figur 9); dock fanns det ingen skillnad i antalet detekterade växtplankton ASV:er mellan 200 och 500 ml. Genom att använda DNA-streckkodning fångades därmed en stor del av diversiteten med en vattenprovvolym på 200 ml.



Figur 9. Artrikedom (antal ASV:er) funna i prover där 10, 100, 200 eller 500 ml havsvatten har filtrerats.

Liknande observationer fanns för hela det eukaryota samhället där både alfa-diversitet, mätt med Shannon-index, och rikedom (antal ASV:er) tycktes nå en plattå vid cirka 200 ml provvolym (Latz et al. 2024), och variationen mellan replikaten minskade med provvolymen upp till den punkten. Vi jämförde även påverkan av provlagring vid -20°C jämfört med -80°C på tre replikat under en lagringsperiod på tre månader, och det fanns inga signifikanta skillnader i Shannon α -diversitet (Wilcoxon rank sum exakt test, p-värde 1 och 0.1 för 16S och 18S, respektive).

3.3 Jämförelse DNA-streckkodning och mikroskopi

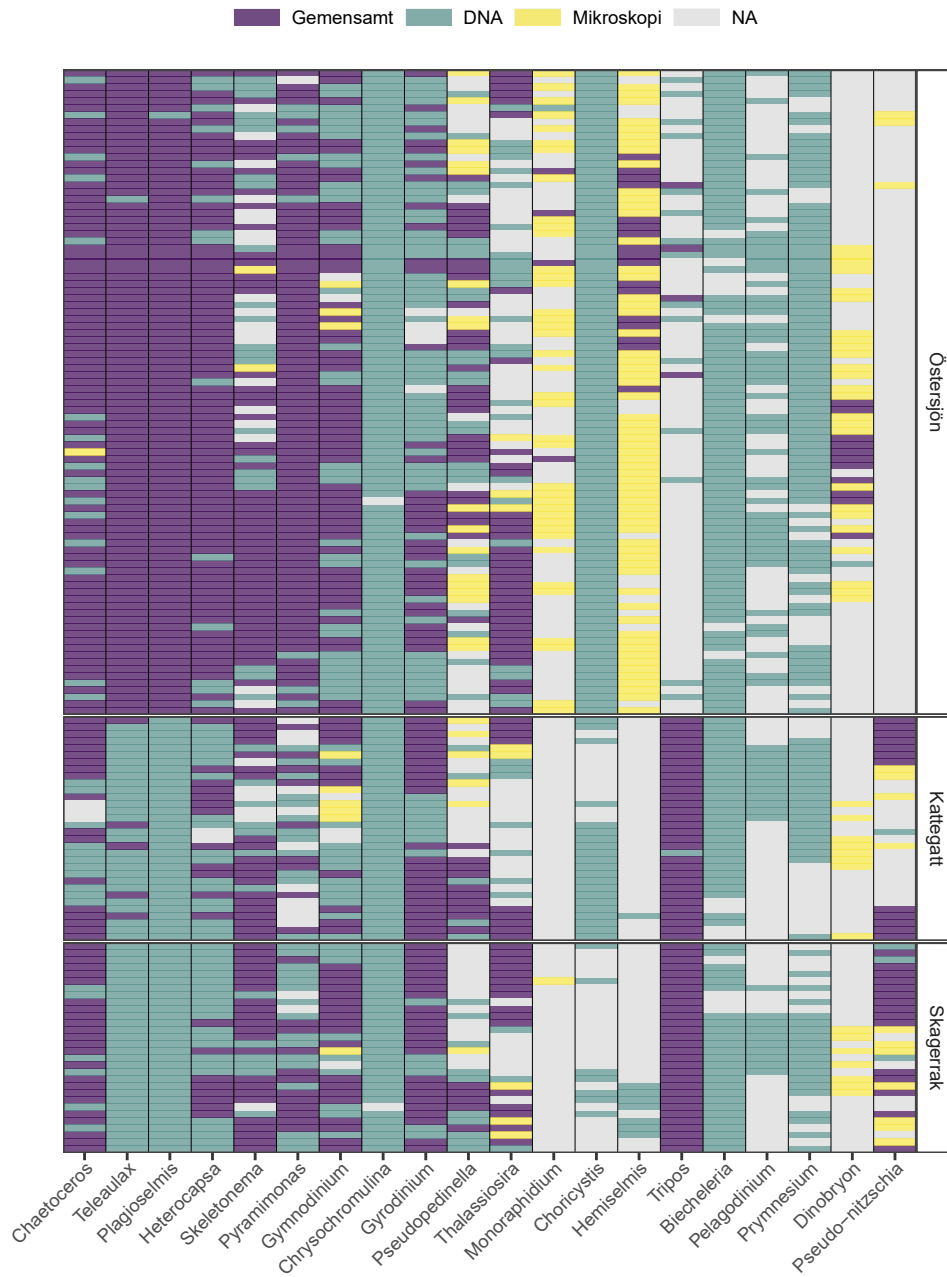
Ett av projektets delmål var att utvärdera tillämpbarheten av DNA-streckkodning i marin miljöövervakning genom att utvärdera skillnaderna mellan mikroskopi-baserad analys av växtplankton och DNA-streckkodning. Detta har gjorts dels genom att jämföra resultat för 15 utvalda eukaryota nano- och mikroväxtplanktonklasser och dels genom att göra en bredare jämförelse, där alla storleksklasser och organismtyper ingår. Resultaten från jämförelsen sammanfattas nedan.

3.3.1 Fördelning av eukaryota växtplanktongrupper

Identifieringen av vanligt förekommande släkten var geografiskt skild mellan båda metoderna (Figur 10). I vissa havsbassänger detekterades ett antal släkten endast med en metod, medan dessa återfanns i både mikroskopi- och DNA-streckkodning-dataset i andra bassänger. Släktena *Hemiselms* (Cryptophyceae) och *Monoraphidium* (Chlorophyceae) identifierades t.ex. som vanligt förekommande med hjälp av mikroskopi i Östersjön, men var frånvarande i de flesta av proverna som analyserats med DNA-streckkodning (Figur 10). Framgången med sekvens-annotering är beroende av referensdatabaser som behöver täcka inte bara ett omfattande antal släkten och arter utan också ett stort antal exemplar från olika miljöer för ett givet släkte eller art.

Identifieringen av små taxa (<10 µm) med Utermöhl-metoden är en svår uppgift, och denna svårighet förstärks ytterligare i olika miljöer. Till exempel huserar den svenska västkusten ett brett utbud av rekylalger (kryptomonader), vilket gör artidentifiering baserad enbart på morfologi till en svår uppgift (Kuylenstierna & Karlson 1994), samtidigt som taxonomisk expertkunskap blir mer och mer sällsynt. Som ett resultat rapporteras dessa organismer ofta som okända celler tillhörande ordningen Cryptomonadales. Våra resultat indikerar att tillämpningen av DNA-streckkodning avslöjar närvaron av släkten som *Teleaulax* (Cryptophyceae) och *Plagioselmis* (Cryptophyceae), vilket överensstämmer med mikroskopiresultaten. Däremot observerades *Hemiselms* främst med mikroskopi i Östersjön, och enbart i ett fåtal DNA-prover, vilket kan bero på begränsningar i referensdatabasen eller att de är morfologiskt felidentifierade.

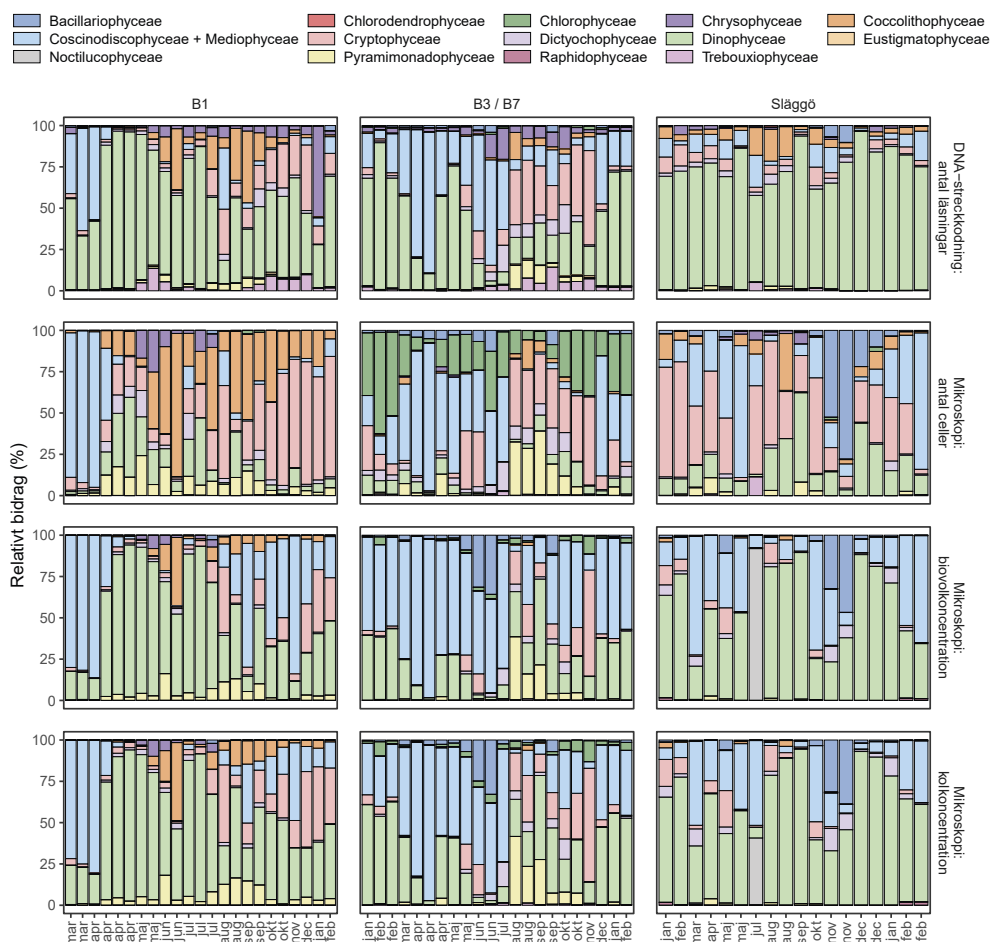
På liknande sätt är släktena *Chrysochromulina* (Coccolithophyceae) och *Prymnesium* (Coccolithophyceae), som är kända för att inkludera arter som är ansvariga för skadliga algblomningar (Edwardsen & Paasche 1998), ofta endast identifierade på ordningsnivå (Prymnesiales) i mikroskopidata. Trots detta har tillämpningen av DNA-streckkodning visat sig framgångsrik för att upptäcka dessa släkten i Skagerrak, Kattegat och Östersjön (Figur 10). Dessa resultat understryker DNA-streckkodningens potential som ett tidigt varningssystem för att upptäcka taxa som orsakar skadliga algblomningar (Se avsnitt om skadliga algblomningar). DNA-streckkodning har förmåga att tilldela och annotera taxonomiska enheter med hög detaljnivå (ASV nivå), vilket möjliggör differentiering av samhällssammansättningar mellan geografiskt och miljömässigt liknande områden. Denna höga taxonomiska upplösning möjliggör en precis bedömning av variationerna i samhällsstrukturen inom dessa närliggande regioner.



Figur 10. Påvisning av vanligt förekommande växtplanktonsläkten i Egentliga Östersjön, Kattegatt och Skagerrak enligt mikroskopi och DNA-streckkodning. Varje ruta representerar ett prov, där färgen indikerar vilken metod som släktet identifierats med.

3.3.2 Mikroskopimått abundans, biovolym och kolbiomassa

Fördelningen av vanligt förekommande eukaryota växtplanktongrupper utvärderades dels i en avgränsad fallstudie i norra Bottenhavet (Andersson et al. 2023) och dels i den övergripande spatiotemporala årsstudien (Torstensson et al. in prep.). Vi jämförde resultaten av DNA-streckkodning med olika mikroskopimått; abundans, biovolym och kolbiomassa. Båda studierna visade att kolbiomassa var det mikroskopimått som bäst stämde överens med DNA-streckkodning (Figur 11). Detta beror troligtvis på att antalet rRNA-genkopior per cell varierar mellan arter, men är positivt korrelerat till cellstorleken hos arterna.



Figur 11. Relativt antal växtplanktonsekvens-läsningar (rad 1), relativt antal cellantal från mikroskopi (rad 2), relativ biovolym från mikroskopi (rad 3) och relativ kolbiomassekoncentration från mikroskopi (rad 4) för de tre högfrekventa stationerna B1 (Egentliga Östersjön), B3/B7 (Bottniska viken), och Släggö (Skagerrak). Identifiering av arter, släkten och ordningar och klasser.

I den övergripande spatiotemporala DNA-streckkodningsanalysen visade dinoflagellater (Dinophyta) högst förekomst av DNA (52 % av markörgens-läsningarna) följt av kiselalger (Bacillariophyceae, Coscinodiscophyceae + Mediophyceae) (12 %). Kolbiomassa och biovolym från mikroskopering uppvisade en jämnare fördelning av dessa: dinoflagellater var dominerande gruppen (36–42 %) följt av kiselalger

(28–42 %). Abundans från mikroskopering indikerade däremot att rekylalger (Cryptophyta) (32 %) var den vanligaste förekommande gruppen av växtplankton följt av kiselalger (19 %). Med denna analys stod dinoflagellater endast för 11 % av eukaryota växtplanktonsamhället.

3.3.3 Utvärdering av kvantitativ DNA analys

En viktig del av miljöövervakningen är att kvantifiera cellantal, biovolym och/eller biomassa av växtplankton. Detta görs traditionellt genom räkning och mätning av celler i mikroskop. Två omständigheter gör det svårt att kvantifiera cellantal per prov med DNA-streckkodning. Den ena är att antalet markörgener per cell varierar mellan arter, och det i nuläget saknas data på markör-gen-antal för de flesta arter. Den andra försvårande omständigheten är att DNA-streckkodning endast ger relativ abundans av de olika markör-gen-sekvenserna i provet, inte absoluta antal sekvenser per prov. Om metoden gav absoluta antal markör-gen-sekvenser per prov för en art, och man dessutom hade referensdata på genkopior per cell för arten, vore det möjligt att räkna ut antal celler per prov för arten. Även om bara det första vore möjligt, att räkna ut antal markörgensekvenser per prov för en art, skulle det vara möjligt att göra detaljerade trendanalyser över olika prover. En sådan trendanalys kan också göras baserat på relativ abundans, men den blir mindre kvantitativ, eftersom totala antalet markör-gen-sekvenser per prov varierar mellan proverna.

I det här projektet utvärderade vi en metod för att få fram absoluta antal markör-gen-sekvenser (ASV:er) per prov genom att tillsätta en känd mängd syntetiskt DNA vid DNA extraktionen som användes som intern standard. En syntetisk standard för 16S och en för 18S tillsattes. Sekvenserna på dessa designades av oss (Latz et al. 2024); de var av samma längd och med G/C-innehåll som typiska 16S och 18S sekvenser, men innehöll slumpmässiga sekvenser förutom primer-bindningsställen. På så vis kommer de amplifieras i PCR:en och samtidigt vara enkla att särskilja från övriga ASV:er i den bioinformatiska analysen. Absoluta genkoncentrationer i proverna har beräknats och metoden har utvärderats genom att jämföra normaliserade genkoncentrationer med cellantal, biovolym och biomassa från mikroskopiberäkningar. Normalisering med hjälp av intern standard resulterade ej i bättre korrelationer mellan DNA-koncentrationer och mikroskopimåtten hos de olika klasserna, jämfört med relativa proportioner. Det justerade R²-värdet från förhållandet mellan intern standard-normaliserade koncentrationer och cellantal för alla klasser var 0.24, vilket kan jämföras med förhållandet mellan relativa mått från DNA-streckkodning och cellantal från mikroskopi, 0.34. Relativ koncentration av kolbiomassa korrelerade ännu bättre med relativ abundans från DNA-streckkodning, 0.41. På släktesnivå erhöles dock ofta bättre korrelationer med intern standard-normalisering än med relativ abundans, särskilt för proverna från Bottniska viken.

Anledningen till att intern standard-normalisering inte förbättrade korrelationerna på högre taxonomisk nivå kan vara att dessa taxonomiska enheter innehåller en mix av taxa med olika markör-genkopieantal per cell. Beroende på sammansättningen av dessa varierar således det totala antalet genkopior per prov, även då cellantalet är det samma. När vi gör jämförelsen på släktesnivå är detta ett mindre problem eftersom olika arter av samma släkte ofta har liknande genkopieantal per cell, och dessutom är ett släkte ofta dominerat av en art i våra prover. Varför jämförelsen på släktesnivå fungerade bättre i vissa regioner är oklart. Metoden för att

erhålla kvantitativa mått från DNA-streckkodning bör utvärderas ytterligare, och normalisering mot genkopienummer kan övervägas (Martin et al. 2022). Dock är informationen om genkopienummer för 18S rDNA i olika taxa begränsad i dagsläget.

3.3.4 Encelliga plankton – en översikt av biologisk mångfald

En översikt av biologisk mångfald (biodiversitet) hos encelliga plankton redovisas i Tabell 1. I tabellen ingår både växtplankton (inklusive mixotrofa arter) och mikrozooplankton. Med mikroskopi observerades totalt 378 olika arter av eukaryota, i huvudsak encelliga, plankton. Med sekvensering av 18S observerades 1 056 olika arter. När det gäller cyanobakterier noterades 14 olika arter med mikroskopi medan 53 observerades baserat på sekvensering av 16S rDNA. I tabellen redovisas också taxa på andra taxonomiska nivåer. I tabell 2 visas hur stor del av det totala antalet ASV:er som kunde knytas till en art eller till ett taxon på en annan taxonomisk nivå i referens-databasen PR² (version 5.01). Cirka 52 % av det totala antalet ASV:er kunde knytas till arter. En stor del av arterna som fanns i proven är därmed okända. Vår slutsats är att 1056 arter är en underskattning. Om databasen hade varit mer komplett hade antalet arter varit högre. Att antalet taxa som observerats med DNA-streckkodning är högre än antalet som observeras med mikroskopi var väntat. Anledningen är att mikroskopi-metodiken som används i miljöövervakningen (Utermöhl, 1931, 1958) inte möjliggör identifikation av plankton mindre än cirka 5 µm, medan DNA-streckkodning fångar upp sådana arter. Även vissa större arter, t.ex. inom kiselalgläktet *Pseudo-nitzschia*, är svåra att skilja åt med ljusmikroskop.

Tabell 1. Antal taxa som observerats på olika taxonomiska nivåer med DNA-streckkodning och mikroskopi. Sekvenser som gäller flercelliga organismer ingår inte. De taxonomiska nivåerna inom PR² (18S, eukaryoter), GTDB (16S, cyanobakterier) är inte alltid direkt jämförbara med traditionell taxonomi som finns i AlgaeBase och World Register of Marine Species.

Taxonomisk nivå	Supergrupp/ Rike	Division/ Fylum	Klass	Ordning	Familj	Släkten	Arter
18S rDNA – PR ² Eukaryoter	12	27	133	297	582	898	1056
Mikroskopi Eukaryoter*	4	12	36	81	123	180	378
16S rDNA – GTDB Cyanophyceae	1	1	3	6	26	60	53
Mikroskopi Cyanophyceae*	1	1	1	4	9	17	14

* Organismer som räknats som oidentifierade flagellater eller oidentifierade celler ingår inte.

Tabell 2. Antal ASV:er som erhållit taxonomisk annotering på olika taxonomiska nivåer med DNA-streckkodning. Andel i % av totala antalet ASV:er (8 435) visas inom parentes. Tabellen gäller eukaryota plankton. Sekvenser som gäller flercelliga organismer ingår inte.

Taxonomisk nivå	Supergrupp/ Rike	Division/ Fylum	Klass	Ordning	Familj	Släkten	Arter
18S rDNA – PR ² Eukaryoter	7 887 (94)	7 834 (93)	7 230 (86)	6 227 (74)	5 658 (67)	5 006 (59)	4 464 (52)

3.3.5 Antal identifierade taxa

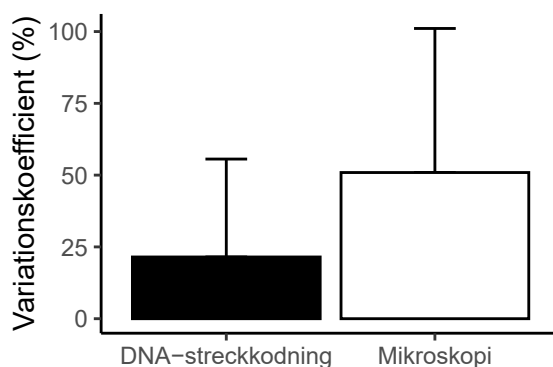
Antalet identifierade taxa av eukaryota växtplankton (nano- och mikroplankton) var generellt högre för DNA-streckkodning än för mikroskopering (Tabell 3). För DNA-streckkodning identifierades 520 taxa medan för mikroskopi 307 taxa. Således identifierades 70 % fler taxa med DNA-streckkodning än med mikroskopi. Identifikation av växtplanktonarter visade ett liknande mönster; 296 arter identifierades med DNA medan 230 arter hittades med mikroskopi. Endast cirka 25 % av arterna identifierades gemensamt med båda metoderna.

Tabell 3. Identifikation av eukaryota nano- och mikroväxtplankton med DNA-streckkodning och mikroskopi. De minsta växtplanktonen, picoplankton, ingår inte i tabellen.

	Taxa	Arter
DNA-streckkodning	520	296
Mikroskopi	307	230
Gemensamt anoterade arter		63
Ökning med DNA-streckkodning	69 %	29 %
Gemensamt anoterade arter, medel		24 %

3.3.6 Variation mellan prover

Reproducerbarheten för att bedöma den relativa sammansättningen av växtplankton utvärderades från replikerade prover (n = 5) vid tre tillfällen från stationerna Släggö och B3/B7. Replikaten bestod av tekniska replikat, det vill säga delprov från samma vattenprov. Reproducerbarheten för att uppskatta relativ abundans av de växtplanktonklasser som fanns i proverna var högre för DNA-streckkodningsmetoden (Figur 12), som främst visades genom den lägre variationskoefficienten för klasserna Chrysophyceae, Coccolithophyceae, Dictyochophyceae, Dinophyceae och Trebouxiophyceae (Mann-Whitney U-test, $p < 0,05$) jämfört med mikroskopi.



Figur 12. Medelvärde av provvariationen för relativ abundans av olika klasser av växtplankton för DNA-streckkodning och mikroskopi.

3.4 Utbredning av skadliga alger

Vissa växtplankton orsakar problem, de brukar kallas skadliga alger och orsakar skadliga algblomningar (Harmful Algal Blooms). Skadliga alger förekommer regelbundet i haven runt Sverige (Karlson et al. 2021). Fyra huvudtyper är vanliga: (1) mikroalger som producerar alggifter som kan ansamlas i musslor och ostron, gifterna utgör en risk för människors hälsa och förgiftningar kan ge allvarliga skador, (2) arter som orsakar fiskdöd, några växtplanktonarter skadar fiskars gälar kemiskt eller mekaniskt, (3) arter som påverkar hela ekosystemet negativt och (4) vissa cyanobakterier, t.ex. *Nodularia spumigena*, som blommar i Östersjön. Dessutom förekommer bottenlevande mikroalger som producerar alggifter på makrovegetation som ålgräs eller tång (Álvarez et al. 2022). Kraftiga ansamlingar av arter som inte är giftiga kan uppfattas som störande, t.ex. när cyanobakterier ansamlas på stränder i Östersjön eller när ”mareldsdjuret” *Noctiluca scintillans* förekommer i riklig mängd på Västkusten. *N. scintillans* är en encellig organism, ett mikrozooplankton, som livnär sig av att äta bl.a. växtplankton. Den är den mest kända av ett antal arter som orsakar mareld. I tabell 4 listas de släkten som innefattar skadliga alger och som observerades i proverna som samlades in under år 2019 och början av 2020. FN (UNESCO Intergovernmental Oceanographic Commission) har en panel gällande skadliga algblomningar (IPHAB – Intergovernmental Panel on Harmful Algal Blooms). Vi har jämfört våra resultat med en lista över skadliga alger som IPHAB tillhandahåller och uppdaterar regelbundet: IOC Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae (Lundholm et al. 2023). Resultat gällande skadliga alger som presenteras i den här rapporten planeras att publiceras i vetenskaplig tidskrift (Karlson et al. in prep.).

DNA-streckkodning är en av flera molekylärbiologiska metoder för att undersöka förekomst av skadliga alger. En annan metod är qPCR (quantitative PCR) som även finns i en variant kallad dPCR (digital PCR). qPCR har likheter med DNA-streckkodning men är kvantitativ på så sätt att antalet markörgener per prov för en art kan uppskattas från PCR-resultatet. En annan fördel med qPCR är att metoden är snabb, resultat kan fås inom några timmar. En nackdel med qPCR är att bara en handfull arter kan analyseras åt gången. qPCR används i flera länder för övervakning av algtoxinproducerande arter som är svåra att identifiera i mikroskop, t.ex. *Azadinium*, *Alexandrium* och *Pseudo-nitzschia* (Penna and Galluzi, 2013). qPCR används även för att detektera växtplankton som skadar fisk Engesmo et al. 2018).

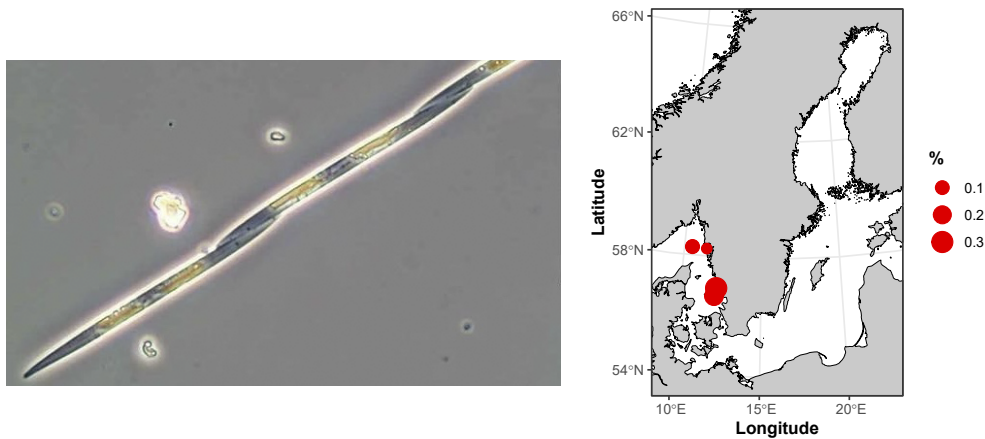
Tabell 4. Släkten som innehåller skadliga alger som observerades i prover som samlats in under projektet.

Klass	Släkte	Alggift/typ av skador	DNA	Mikroskop
Bacillariophyceae	<i>Pseudo-nitzschia</i>	Domorinsyra – minnesförlust	x	x
Dictyochophyceae	<i>Pseudochattonella</i>	Skadar fisk	x	x
Dinophyceae	<i>Akashiwo</i>	Skadar fisk	x	x
Dinophyceae	<i>Alexandrium</i>	Paralyserande skaldjursgifter	x	x
Dinophyceae	<i>Amphidoma</i>	Azaspiracider	x	
Dinophyceae	<i>Azadinium</i>	Azaspiracider	x	x
Dinophyceae	<i>Coolia</i>	Coolia-toxiner	x	
Dinophyceae	<i>Dinophysis</i>	Diarrégifter	x	x
Dinophyceae	<i>Gonyaulax</i>	<i>G. spinifera</i> producerar yessotoxiner	x	x
Dinophyceae	<i>Gymnodinium</i>	Några skadar fisk	x	x
Dinophyceae	<i>Heterocapsa</i>	En art skadar ostron	x	x
Dinophyceae	<i>Karenia</i>	Skadar fisk/hela ekosystem	x	x
Dinophyceae	<i>Lingulodinium</i>	Yessotoxiner	x	x
Dinophyceae	<i>Luciella</i>	Skadar fisk	x	
Dinophyceae	<i>Margalefidinium</i>	<i>M. polykrikoides</i> skadar fisk, skaldjur och djurplankton	x	
Dinophyceae	<i>Polykrikos</i>	<i>P. hartmannii</i> skadar fisk	x	x
Dinophyceae	<i>Prorocentrum</i>	<i>P. lima</i> producerar diarrégifter		x
Dinophyceae	<i>Protoceratium</i>	Yessotoxiner		x
Pelagophyceae	<i>Aureococcus</i>	Risk för skador på musslor	x	
Prymnesiophyceae	<i>Chrysochromulina</i>	Skadar fisk	x	
Prymnesiophyceae	<i>Phaeocystis</i>	Skadar fisk	x	
Prymnesiophyceae	<i>Prymnesium</i>	Skadar fisk/hela ekosystem	x	
Raphidophyceae	<i>Fibrocapsa</i>	Skadar fisk	x	

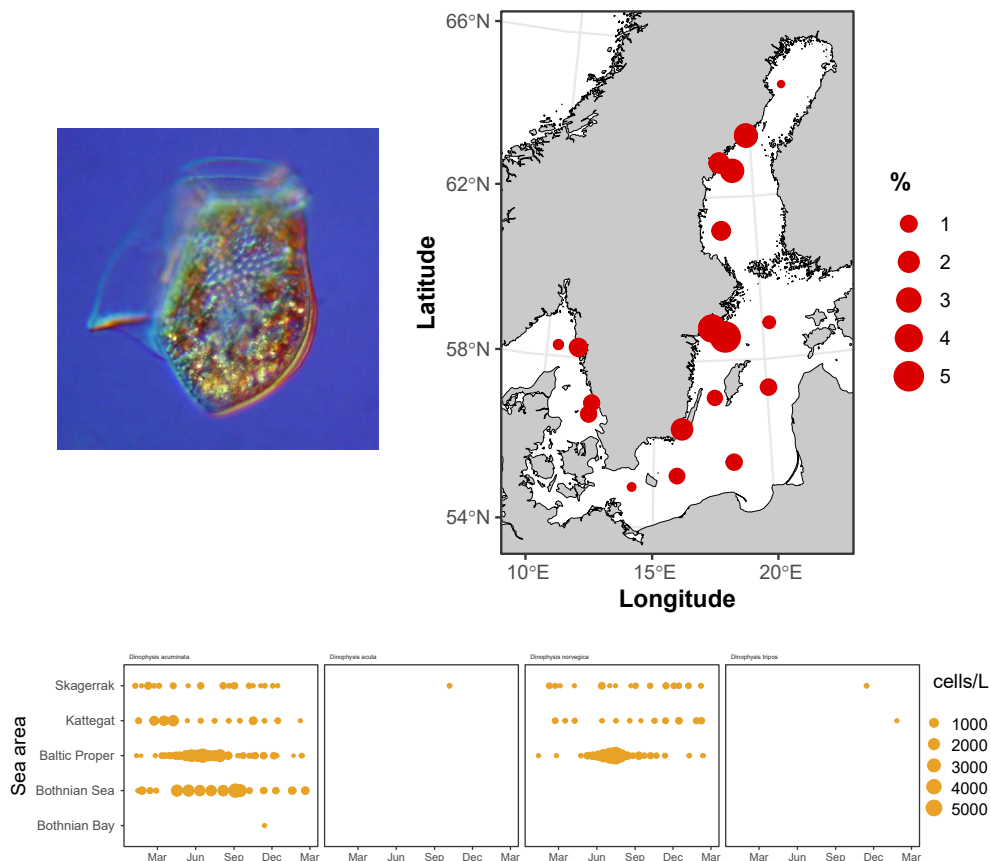
3.4.1 Växtplankton som kan orsaka förgiftningar vid förtäring av musslor

Inom kiselalgssläktet *Pseudo-nitzschia* finns arter som producerar domorinsyra, ett gift som skadar centrala nervsystemet hos människor. Giftet orsakar bl.a. minnesförlust. *Pseudo-nitzschia* noterades framförallt i Kattegat och Skagerrak och endast i mycket små mängder i Egentliga Östersjön (Figur 13). Tio olika unika ASV observerades för släktet *Pseudo-nitzschia*. Högst relativ abundans (cirka 6 %) noterades i november 2019 i Skagerrak.

Dinophysis är ett släkte dinoflagellater där de flesta arterna producerar diarrégifter, till exempel okadasyra. I mikroskop observerades fyra olika arter: *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. norvegica* och *D. tripos* (Figur 14). Det visade sig att den gen som använts för att identifiera växtplankton (18S V4) inte var den bästa när det gäller att särskilja arter inom *Dinophysis*. Arterna kunde inte skiljas åt med DNA-streckkodning när denna del av 18S användes. I kartan i Figur 14 visas utbredningen av *Dinophysis* spp. baserat på 18S V4. Andra studier har istället fokuserat på andra delar av rRNA med bättre resultat (t.ex. Edvardsen et al. 2013).



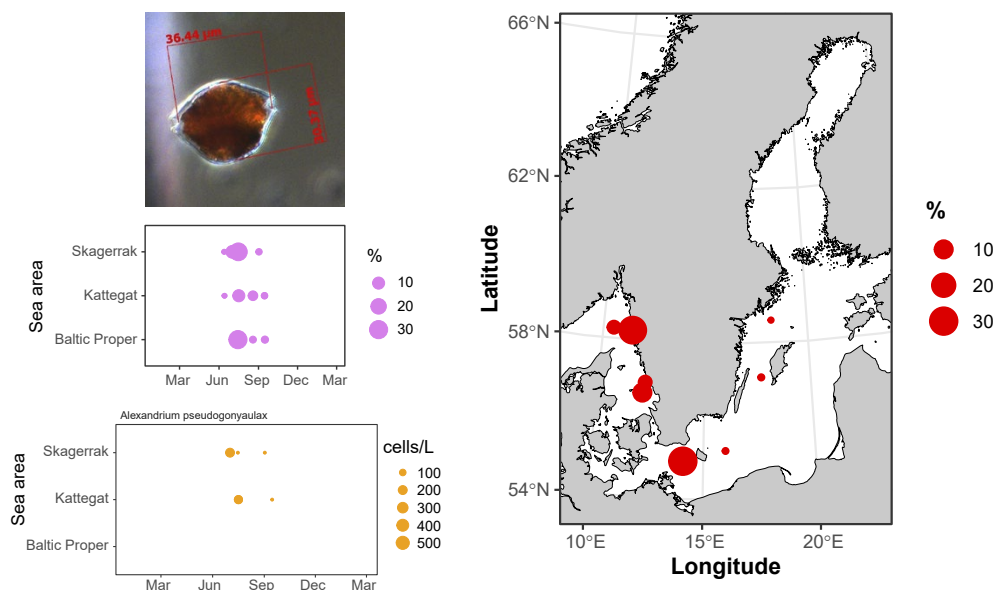
Figur 13. Kartan visar max relativ abundans för *Pseudo-nitzschia* spp. Totalt tio olika unika ASV noterades för *Pseudo-nitzschia* spp., kartan utgör ett exempel. Fotografiet av *Pseudo-nitzschia* kommer från <http://nordicmicroalgae.org> och har tagits av Regina Hansen.



Figur 14. Kartan visar utbredningen (relativ abundans) av *Dinophysis* spp. baserat på resultat från DNA-streckkodning. Bubbelpottarna visar abundans (celler per liter) baserat på mikroskopi, från vänster: *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. norvegica* och *D. tripos*. Fotografiet av *D. acuta* kommer från <http://nordicmicroalgae.org> och har tagits av Bengt Karlson.

Alexandrium är också dinoflagellater. De flesta arterna producerar paralyserande skaldjursgifter (saxitoxiner). En art, *A. pseudogonyaulax*, producerar istället goniodomin. Totalt elva olika unika ASV noterades. *A. pseudogonyaulax* observerades

både med mikroskopi och DNA-streckkodning (Figur 15). Utöver ovanstående släkten observerades flera andra dinoflagellater som producerar alggifter som kan ansamlas i musslor och ostron, se tabell 4. Värt att notera är att *Azadinium* spp. och *Amphidoma* förekom. De producerar azaspiracider som har effekter som liknar diarrégifterna från *Dinophysis*. *Lingulodinium polyedra* är en art som producerar yessotoxiner. Den noterades i Skagerrak och Kattegatt. I mikroskop noterades även *Protoceratium reticulatum* som även den producerar yessotoxiner.



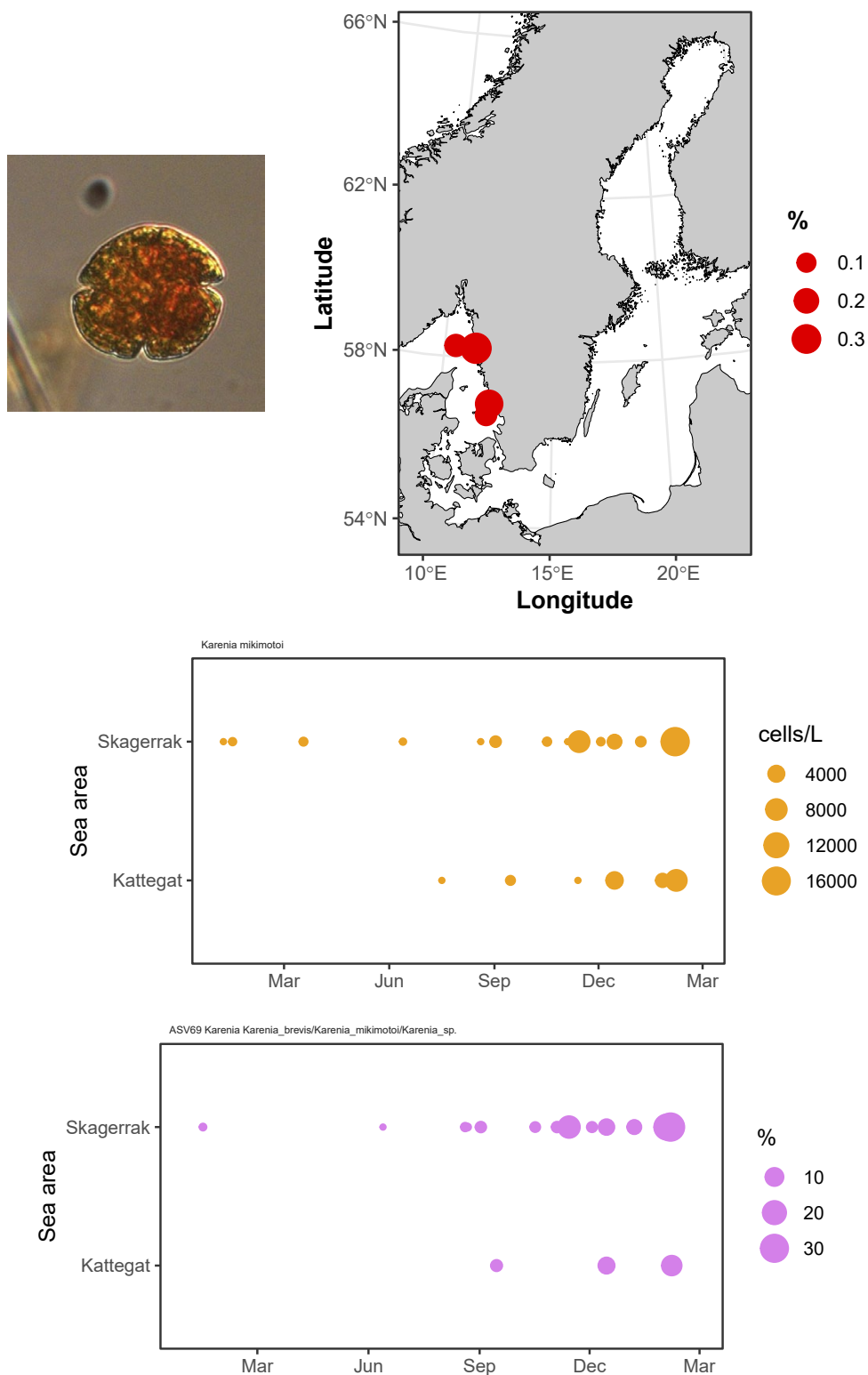
Figur 15. Kartan visar max relativ abundans för *Alexandrium pseudogonyaulax*. Totalt 11 olika unika ASV:er noterades för *Alexandrium* spp., kartan utgör ett exempel. Bubbel-plottarna visar tidsserier 2019 till början av 2020 för DNA – relativ abundans (violett) och mikroskopi, cellantal per liter (orange). Fotografiet kommer från <http://nordicmicroalgae.org> och har tagits av Ann-Turi Skjevik.

3.4.2 Växtplankton som orsakar fiskdöd

Växtplankton som skadar fiskars gälar och kan orsaka fiskdöd finns i flera olika klasser av mikroalger. I den här sammanställningen tas endast arter och släkten som listas av IOC upp (IOC Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae, Lundholm et al. 2023). Det finns andra arter som kan orsaka rent mekaniska skador på fiskgälar, t.ex. *Chaetoceros* spp. som har vassa utskott vilka kan påverka fiskgälar negativt.

Dinoflagellater (Dinophyceae)

Fyra olika släkten av dinoflagellater som orsakar fiskdöd observerades med DNA-streckkodning: *Akashiwo*, *Karenia*, *Margalefidinium* och *Polykrikos*. *Margalefidinium* är tidigare inte känd från mikroskopi i haven runt Sverige. *Karenia mikimotoi* (tidigare känd som *Gyrodinium aureolum*) var vanlig i Kattegatt och Skagerrak. Observationerna med DNA-streckkodning och mikroskopi överensstämde väl (Figur 16). Notera dock att streckkodningsmetoden inte kunde skilja *K. mikimotoi* från *K. brevis*, sekvenserna är identiska inom 18S V4. *K. brevis* är främst känd från den mexikanska golfen.

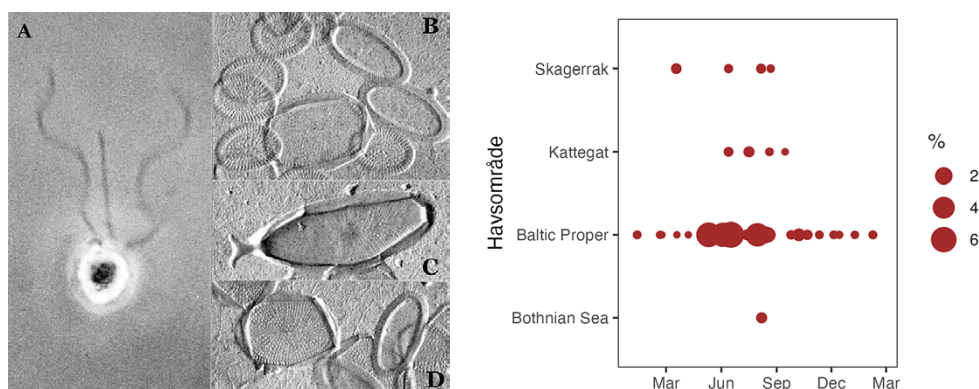


Figur 16. Observationer av *Karenia mikimotoi*, ett växtplankton som orsakar fiskdöd. Det övre diagrammet visar resultat från DNA-streckkodning (relativ abundans) och det nedre resultat från mikroskopi (celler per liter). Fotografiet kommer från <http://nordicmicroalgae.org> och har tagits av Ann-Turi Skjevik.

Häftalger (*Prymnesiophyceae/Coccolithophyceae*)

Tre olika släkten av häftalger som innehåller skadliga alger observerades: *Chrysochromulina*, *Phaeocystis* och *Prymnesium*. *Phaeocystis* finns i två former, dels som kolonier som kan bli synliga för blotta ögat, och dels som flagellater som är svår att bestämma i mikroskop. I mikroskop räknades de som oidentifierade flagellater. Tio olika ASV:er noterades för *Phaeocystis*, tre var vanliga och två av dessa anses som skadliga. *Phaeocystis* observerades endast i Kattegat och Skagerrak.

Släktena *Prymnesium* och *Chrysochromulina* är svåra att skilja åt i mikroskop och bestäms därför vanligen till ordningen Prymnesiales. *Prymnesium polylepis* blev känd som *Chrysochromulina polylepis* år 1988 då en stor blomning skadade stora delar av det marina ekosystemet i Kattegatt och Skagerrak. Arten fördes över till släktet *Prymnesium* för ett antal år sedan. Resultat från DNA-streckkodning visar på sex olika ASV:er. *P. polylepis* förekommer främst i Egentliga Östersjön (Figur 17). När det gäller *Chrysochromulina* noterades tretton unika ASV. *C. leadbeateri*, den *Chrysochromulina* art som är känd för att orsaka fiskdöd i Nordnorge (John et al. 2022), observerades endast i Skagerrak (ingen figur visas).



Figur 17. Utbredningen av *Prymnesium polylepis*. Fotografierna av *P. polylepis* kommer från <http://nordicmicroalgae.org> och är tagna av Wenche Eikrem. Elektronmikroskop har använts för B och C.

Pseudochattonella (Dictyochophyceae)

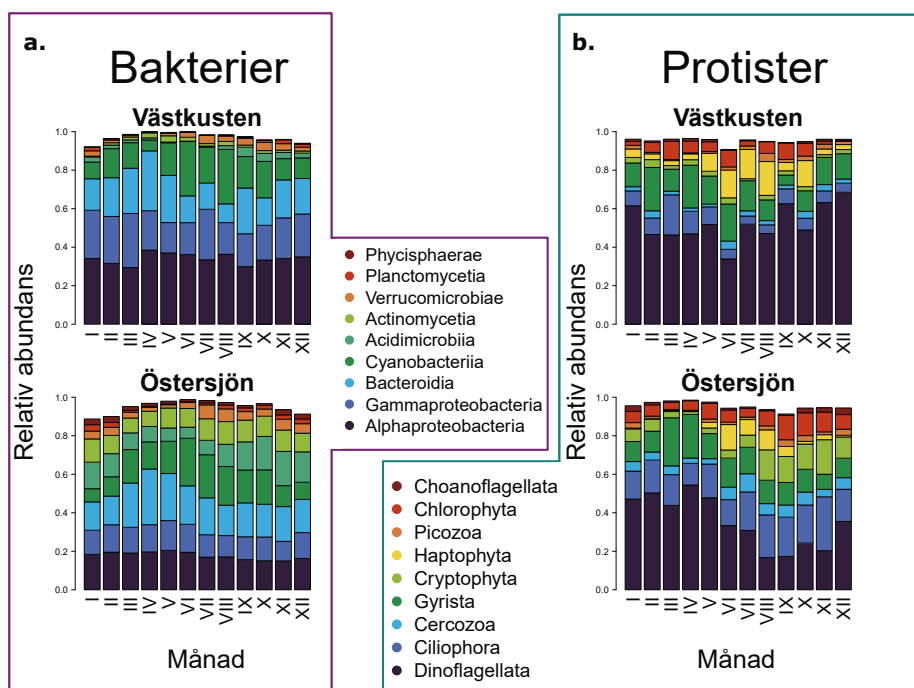
Släktet *Pseudochattonella* blev känt i Skandinavien år 1998 då den första stora blomningen noterades med fiskdöd, bl.a. i Sverige. Blomningar i Kattegatt och Skagerrak har förekommit sedan dess. Den senaste större blomningen var år 2017 då fiskdöd observerades i danska delar av Kattegatt. Två arter är kända: *P. farcimen* och *P. verruculosa*. Med mikroskop noterades *Pseudochattonella* endast i Kattegatt och Skagerrak. Så var även fallet när DNA-streckkodning användes. Fyra olika ASV observerades. En av dessa stämmer med *P. verruculosa* i referensdatabas PR². De övriga kunde endast knytas till släktet *Pseudochattonella*.

3.5 Ekologiska drivkrafter i Östersjön- Västerhavet gradienten

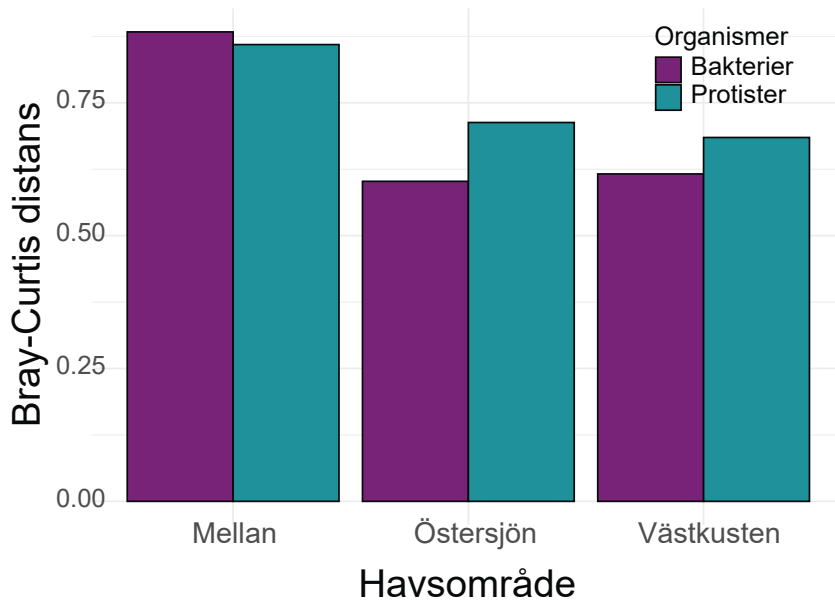
De relativa abundanserna av dominerande taxa av bakterier och protister (encelliga eukaryoter) har jämförts under olika årstider i Östersjön och på Västkusten (Figur 18). I denna analys har vi inte bara använt oss av växtplankton utan också inkluderat heterotrofa bakterier, vilket är ett mervärde som DNA-streckkodning ger. Vi observerade liknande säsongsdynamik och relativ abundans av cyanobakterier (Cyanobacteria, Figur 18a) i Östersjön och på Västkusten, med en nedgång i april och en topp under sommaren. Actinomycetia och Acidimicrobia (tillhör heterotrofa bakterier) förekom oftare i Östersjön än på Västkusten. Detta resultat stämmer överens med tidigare resultat som visar att Actinobacteria, ett fylum som båda dessa klasser tillhör, oftare förekommer på den mindre salta sidan av Öresund (Herlemann et al. 2011). Med den månatliga provtagningen kunde vi dessutom observera en säsongsvariation i den relativa abundansen av Acidimicrobia (tillhör heterotrofa bakterier). Gamma-proteobakterier och Alphaproteobakterier (båda grupper tillhör heterotrofa bakterier) utgjorde en ganska konstant del av planktonsamhället under hela året och var båda mer rikliga på Västkusten.

Även i analysen av protister inkluderades både autotrofa och heterotrofa organismer. När det gäller protister (Figur 18b) var dinoflagellater (klass Dinophyceae) den vanligast förekommande gruppen i Östersjön och de var än mer dominerande på Västkusten. Deras relativa abundans minskade på hösten i Östersjön, men inte på Västkusten. Kiselalger (algklasserna Bacillariophyceae, Coscinodiscophyceae och Mediophyceae som ingår i subdivision Gyrista), ökade i abundans under senvintern och tidig vår och minskade under andra halvåret. Både kiselalgers ökning och minskning skedde tidigare på Västkusten. Häftalger, Haptophyta (klass Prymnesiophyceae som nu benämns Coccolithophyceae) utgjorde en större del av samhället på Västkusten, och Ciliophora (flimmerdjur, ciliater) i Östersjön. De flesta arterna bland ciliater är heterotrofa, men det finns även arter som är mixotrofa.

Vidare har vi undersökt hur proverna skiljer sig från varandra med avseende på förekomst av olika ASV:er. Avstånden i samhällssammansättning mellan proverna från olika delar av den svenska kusten (Västkusten respektive Östersjön) var signifikant större än inom dessa båda regioner (Figur 19; $P < 2 \times 10^{-16}$ för både bakterier och protister), även om avstånden inom regionerna också var betydande. Säsongsmässiga och regionala skillnader förklarar således en stor del av de observerade skillnaderna mellan de mikrobiella samhällena.



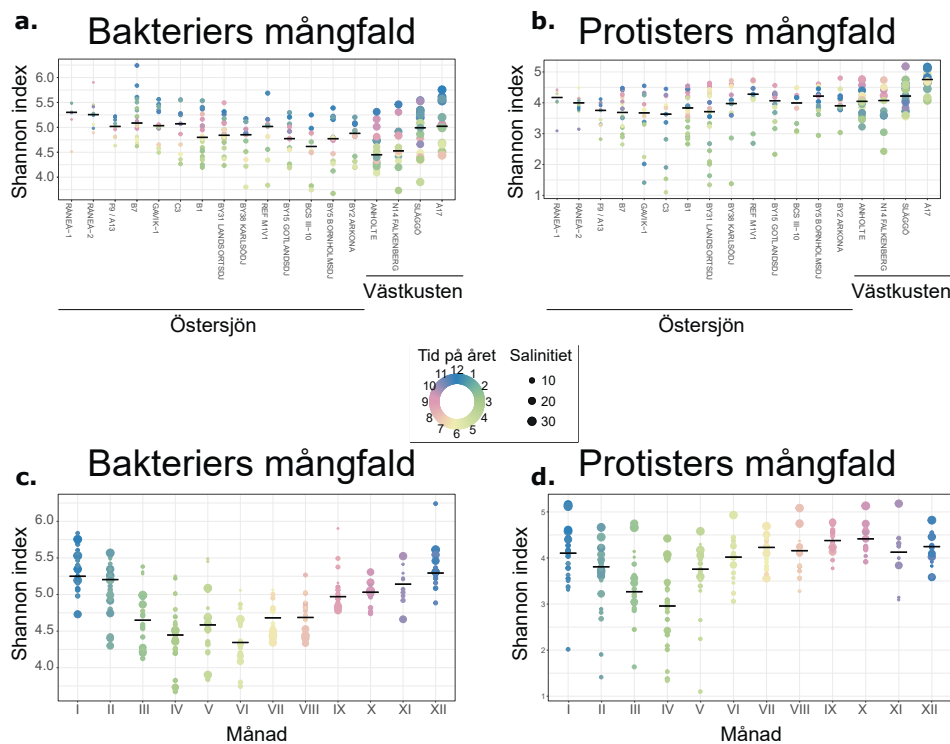
Figur 18. Relativ abundans av (a.) klasser av bakterier och (b.) subdivisioner av protister i varje månad på Västkusten (Kattegatt och Skagerrak) och i Östersjön. Endast taxa med en total relativ abundans > 1 % visas.



Figur 19. Olikheter i bakterie- och protistsamhällena i prover från samma eller olika delar av den svenska kusten (Västkusten eller Östersjön).

Biodiversiteten hos en grupp organismer kan sammanfattas med hjälp av (alfa-) mångfaldsmått, till exempel Shannon-index. Vi har analyserat förändringar i mångfalden hos bakterier och protister mellan stationer och mellan månader i det insamlade datasetet (Figur 20). Bakteriernas mångfald, inkluderande både cyanobakterier och heterotrofa bakterier, minskade generellt med ökande salinitet (Figur 20a), fram till Kattegatt (stationerna Anholt E och N14 Falkenberg). I Skagerrak (stationerna Släggö och Å17) observerades dock högre Shannon-indexvärden igen. Protisternas mångfald (Figur 20b), inkluderande både autotrofa och heterotrofa organismer, förändrades utan något uppenbart geografiskt mönster i Östersjön. I Skagerrak, där salthalten är högre, var den biologiska mångfalden hos protister generellt högre.

Biodiversitetens säsongsmönster var tydligare än de salthaltsberoende mönstren (Figur 20c–d). Bakteriernas mångfald (Figur 20c) minskade under vintern och tidig vår för att nå ett minimum mellan april och juni, för att sedan öka stadigt igen. Bakteriernas mångfald var som högst december–januari. Protisternas mångfald (Figur 20c) nådde ett minimum i april, steg sedan tillbaka igen snabbare än bakteriemångfalden, och låg på en plåtå runt en maximal nivå från juli till januari.



Figur 20. (Alfa-)mångfald av bakterier och protister i prover ordnade över (a–b) stationer, sorterade efter salthalt, och över (c–d) månader under året.

Mer detaljerade analyser behövs för att klargöra hur den mikrobiella mångfalden och dynamiken i den ekologiska successionen förändras över miljögradienterna i den svenska kustlinjen. Framtida provtagnings- eller övervakningsinsatser kommer att göra det möjligt att skilja de universella mönstren från de som är unika för det studerade året.

4. Datavärdskap, datahantering och datatyp

Alla data från provtagningarna i projektet har samlats i databasen Svenskt HavsARKiv (SHARK) hos SMHI. Data är fritt tillgängliga på <https://sharkweb.smhi.se>. SMHI är nationell datavärd för miljöövervakningsdata gällande marinbiologi och oceanografi på uppdrag av Havs- och vattenmyndigheten. För att hantera data gällande DNA-streckkodning har en ny datatyp tagits fram kallad PlanktonBarcoding. Arbetet har utförts av projektdeltagarna i samarbete med det av Vetenskapsrådet finansierade projektet SBDI, Swedish Biodiversity Data Infrastructure. Den nya datatypen bygger på existerande internationella standarder som används av SBDI, Internationella Havsforskningsrådet, ICES, EMODnet samt European Nucleotide Archive (ENA). Notera att data kommer att uppdateras när nya versioner av referensdatabaser och bioinformatiska pipelines blir tillgängliga.

Gör så här för att hämta data från DNA-streckkodning av plankton:

1. Gå till: <https://sharkweb.smhi.se>
2. Välj datatyp ”PlanktonBarcoding”
3. Välj tidsperiod
4. Ladda hem data

DNA-sekvenseringsdata deponerades och gjordes publikt tillgängligt i European Nucleotide Archive (ENA), Swedish Biodiversity Data Infrastructure (SBDI), samt SHARK. Oprocessade sekvensdata (i FASTQ-format) tillsammans med kontextuella data för motsvarande prover publicerades i ENA (<https://www.ebi.ac.uk/ena; study accession PRJEB55296>). ASV sekvenser och antal observationer av dessa per prov, samt kontextuella data, publicerades i SBDI's Swedish ASV portal (<https://asv-portal.biodiversitydata.se/>) (Prager et al. 2023), därmed blev de också tillgängliga i Global Biodiversity Information Facility (GBIF; <https://doi.org/10.15468/vrxhxe> för 16S och <https://doi.org/10.15468/cwjstg> för 18S). Data i SBDI:s ASV-portal erhåller en enhetlig annotering (även den med GTDB för 16S och PR² för 18S) och uppdateras då referensdatabaserna uppdateras.

5. Diskussion

Projektet visar att DNA-streckkodning har stor potential att öka kunskapen om de marina växtplanktonsamhällenas sammansättning och diversitet samt hur de påverkas av miljöförändringar. En av fördelarna är att DNA-metoden ger möjlighet att inkludera fler celler/individer i analysen än mikroskopi, så att biodiversitetsanalysen får ett bättre underlag. Med mikroskopi analyserar man exempelvis 25 ml havsvatten, men med DNA-streckkodning finns möjlighet att analysera upp till 1000 ml havsvatten. Våra resultat visar dock att man endast behöver filtrera 200 ml havsvatten för att fånga upp diversiteten hos växtplanktonsamhället med DNA-streckkodning.

Andra fördelar med DNA-streckkodning är att den är lätt att standardisera och att analysen kan göras om allteftersom referensdatabaser och bioinformatiska verktyg utvecklas. DNA-streckkodning ger även information om förekomsten av organismgrupper som inte tillhör växtplanktonsamhället, till exempel heterotrofa bakterier och mikrozooplankton, vilket är ett mervärde i miljöövervakningen eftersom de också påverkas av miljöförändringar och kan användas som indikatorer för olika ekologiska processer.

5.1 Sekvenserade regioner – varierande resultat olika växtplanktongrupper

Det var en relativt stor andel av växtplankton-ASV:erna som vi inte kunde bestämma till art utan endast till klass- eller släktesnivå (Tabell 2), och den möjliga annoteringsnivån skiljde sig också åt mellan olika taxa. Det kan dels bero på att den DNA-region som vi sekvenserat inte gav tillräcklig taxonomisk upplösning för alla grupper och dels på att referensdatabasen är ofullständig. Exempelvis var det endast möjligt att annotera *Dinophysis* till släktesnivå, vilket kan bero på att 18S V4 inte är den optimala regionen för att artbestämma dinoflagellater. I stället kan man behöva använda regionerna D1 och D2 av 28S, en annan del av rDNA. När det gäller ciliater noterar vi att den vanligt förekommande mixotrofa arten *Mesodinium rubrum* inte fångades med 18S V4, vilket troligtvis beror på att de primers vi använde ej matchar *M. rubrum*s 18S gensekvens. Den taxonomiska upplösningen kan förbättras genom att implementera ”long-read” sekvenseringstekniker (Johnson et al. 2019; Latz et al. 2022) och då högst troligt uppnå upplösning på artnivå i alla de fall där referenssekvenser finns i databaserna. Inom projektet testades PacBio-tekniken för ”long read” sekvensering, men endast på ett litet antal prover (Latz et al. 2022).

Under projektets gång blev det tydligt att referensdatabaserna, exempelvis PR² och GTDB, behöver fyllas på med växtplanktonarter som förekommer i svenska marina vatten. Det finns även ett behov att harmonisera referensdatabaserna mellan traditionell ”växtplanktontaxonomi” och ”DNA-taxonomi”. Arbetet med detta har påbörjats, i PR² finns numera id-nummer för taxonnamn från databasen World Register of Marine Species (WoRMS; <http://marinespecies.org>) som används av de flesta växtplankton-specialister. WoRMS hämtar information om alger från AlgaeBase (<https://algaebase.org>).

5.2 DNA-streckkodning identifierar fler taxonomiska grupper än mikroskopi

För eukaryota plankton kan en ASV oftast knytas till ett namn i referensdatabasen PR² (Tabell 1). När man tittar på antal taxa kan man notera att DNA-streckkodning hittar många fler taxa jämfört med mikroskopi (Tabell 1). Det är inte förvånande eftersom den mikroskopimetod som används inom miljöövervakningen (Utermöhl-metoden) är lämplig för att identifiera organismer som har morfologiska detaljer som skiljer dem åt. Det är svårt för organismer mindre än cirka 5 µm. Det går helt enkelt inte att skilja små arter åt utan de räknas som oidentifierade celler med flagell eller oidentifierade celler utan flagell. Det finns även större arter som inte går att skilja åt med Utermöhlmetoden. Ett exempel är arter inom kiselalgssläktet *Pseudo-nitzschia*. Några av arterna producerar alggifter, medan andra är harmlösa. Riktigt små celler, framförallt picoplankton <2 µm, förbises ofta helt med Utermöhl-metoden. De kan räknas med flödescytometri eller med fluorescensmikroskopi men kan då inte artbestämmas. Med DNA-streckkodning får man med diversiteten även bland de små cellerna som är de mest talrika i havet och ofta tillsammans står för huvuddelen av primärproduktionen. Dessutom går det att skilja ut större arter som är svåra att skilja på med mikroskop. Det är extra viktigt för arter som producerar alggifter.

Även om jämförelsen mellan DNA-streckkodning och mikroskopi visar att DNA-streckkodning generellt sett fångar upp en större biodiversitet än mikroskopi, så ser vi att DNA-streckkodning missar en del arter som noteras med mikroskopi. Anledningen är med stor sannolikhet att arterna saknas i referensdatabaserna för DNA-streckkodning eller att de primers som användes inte fungerar för dessa arter. Detta innebär att planktonarter från haven runt Sverige behöver sekvenseras och sekvenserna läggas in i referensdatabaserna. En fördel med mikroskopi är också att antal celler per liter lätt beräknas och biomassa kan bestämmas baserad på cellvolym och omräkningsfaktorer till kolbiomassa.

5.3 Kvantitativ DNA analys – fortsatt utredning

DNA-streckkodning ger i sin grundläggande form endast relativa abundanser av de olika arternas markörgensekvenser i provet, inte absoluta cellantal av de olika arterna som mikroskopi ger. Vi gjorde ett försök att få DNA-streckkodningsmetoden kvantitativ genom att tillsätta en intern standard av syntetiskt DNA. Emellertid, gav detta i vår analys inte avsevärt bättre resultat än att använda relativ abundans. Vi använde i våra försök syntetiskt DNA, men det finns andra möjligheter, till exempel att tillsätta till proven en känd mängd celler av en art som inte förekommer i svenska marina vatten. Det vore önskvärt att framöver arbeta vidare med att utveckla DNA-streckkodning till en mer kvantitativ metod.

5.4 Fördelning av eukaryota växtplankton – indikator på miljöförändring

Eftersom det är av stort värde att interkalibrera etablerade och nya metoder, gjorde vi en jämförelse vilket mikroskopimått som bäst stämmer överens med DNA-streckkodning hos eukaryota växtplanktonklasser. Undersökningen visade att DNA-streckkodning överensstämmer bäst med mikroskopimåttet kolbiomassa och inte med cellabundanser. Detta kan tyckas vara oväntat, men kan förklaras av att stora celler, med hög kolbiomassa, generellt innehåller fler genkopior än små celler (Zhu et al. 2005, Godhe et al. 2008, Mäki et al. 2017, Santi et al. 2021). Biovolym gav näst bäst överensstämmelse med DNA-streckkodning, men eftersom den vanligt förekommande växtplanktongruppen diatoméer (kiselalger) innehåller tomma vakuoler (utan DNA och biomassa), så ger det inte lika bra överensstämmelse som kolbiomassa.

Vi ser att den nu utvecklade DNA-analysen skulle kunna användas för att beskriva den relativa förekomsten av olika planktontaxa, vilket kan användas som indikator för miljöförändring. Exempelvis har kvoten mellan diatomeer och dinoflagellater föreslagits kunna vara indikator för klimatförändringar (Wasmund et al. 2017). Eftersom det är en relativt bra överensstämmelse mellan resultaten från mikroskopi (kolbiomassa) och DNA-streckkodning, skulle en övergång från etablerad till ny metod i detta fall inte orsaka något brott i tidsserierna, vilket är mycket lovande. Det vore dock önskvärt att utföra parallella analyser med de båda metoderna över ett längre tidsspänn.

6. Slutsatser

Sammantaget visar våra resultat att DNA-streckkodning är en fungerande metod för att analysera växtplanktonsamhällets sammansättning och diversitet. DNA-streckkodning ger högre och mindre variabla diversitetsmått än mikroskopi. Det är en stor fördel att säkert kunna mäta diversiteten eftersom den är en bra indikator för ekosystemens hälsa. DNA-streckkodning ger också värdefull information om förekomst av främmande arter. Vi har inom projektet kunnat visa detaljerade utbredningskartor för skadliga alger i svenska marina vatten, exempelvis för dino-flagellatsläktet *Dinophysis*. Påverkan av storskaliga ekologiska processer kan undersökas, såsom effekten av miljöfaktorer eller säsongsmässig succession. Med den framtagna DNA-streckkodningsmetoden kan man spåra förändringar i biologisk mångfald i tid och rum. Exempelvis har vi i projektet kunnat visa på salthaltens och närsaltens betydelse för artsammansättningen hos växtplanktonsamhället. Det finns dock fortfarande problem eftersom en hel del plankton från haven runt Sverige saknas i referensdatabaserna. Ett annat problem är att 18S V4 regionen av rDNA inte är optimal för att skilja dinoflagellater åt. Därför bör större delar av rDNA operonet sekvenseras (18S, ITS och 28S) och referensdatabaser byggas ut genom att plankton identifieras baserat både på morfologi och sekvensering. Sådana projekt kunde med fördel genomföras genom ett internationellt samarbete.

7. Utvecklingsbehov

Eftersom endast ca 50 % av de observerade ASV:erna kunde identifieras till art, ser vi att det finns ett utvecklingsbehov för DNA-analys av växtplankton i svenska marina vatten. Ett förslag är att kombinera traditionellt taxonomiskt arbete med DNA-analys. Olika tekniker skulle kunna användas, såsom ljus- och elektronmikroskopi, odling av algkulturer baserat på handplockning av celler och cellsortering från naturliga planktonsamhällen med flödescytometri. DNA skulle kunna sekvenseras från algkulturer eller från enskilda celler. För att inte göra en sådan studie i blindo föreslår vi att man riktar in sig på ett antal pico-, nano- och mikroplankton och vidare att fokusera på skadliga alger som kan producera toxiner.

Eftersom svenska marina vatten i stor utsträckning delas med våra grannländer, föreslår vi att ett sådant projekt sker i samarbete med grannländerna, t.ex. mellan de nordiska länderna eller länder anslutna till HELCOM.

8. Rekommendationer

- Provtagning och analys av rDNA bör införas i nationell och regional miljöövervakning för undersökningar av växtplanktons biodiversitet och utbredning i tid och rum som ett komplement till mikroskopi.
- DNA-streckkodning kan och bör användas för att identifiera främmande arter.
- Den metodik som beskrivs i förslag till Miljöövervakningsmanual bör användas (Bilaga A). En nordisk standard för användning av DNA-streckkodning för plankton kan också användas (Jerney et al. 2023).
- Resultat från DNA-streckkodning av plankton sparas lämpligen i databas framtagen av projektet samt hos SBDI. En ny datatyp finns färdig att använda hos datavärd för marinbiologi och oceanografi, <https://sharkweb.smhi.se>.
- Resultat i databaser (processade data) bör uppdateras regelbundet, till exempel en gång per år, då nya versioner av referensdatabaser finns tillgängliga.
- Ett utvecklingsarbete för att förfina DNA-streckkodning för planktonövervakning startas, det bör innefatta ett nordiskt eller globalt samarbete, förbättring av referensdatabaser – sekvensering av plankton från haven runt Sverige samt utvärdering av sekvensering av hela eller stora delar av rDNA (18S, ITS och 28S).

9. Kommunikation

Resultaten har kommunicerats kontinuerligt under projektperioden, dels genom information på projektets hemsida (<https://www.umu.se/forskning/projekt/dna-streckkodning-av-marina-vaxtplankton/>), och dels genom föredrag vid olika möten konferenser samt populärvetenskapliga och vetenskapliga publikationer. Exempel på konferenser är ICHA International Conference on Harmful Algae (presentationer år 2021 och 2023), Symposium for Aquatic Microbial Ecology (SAME17; 2023), Swedish Marine Research Days 2023 och SBDI Days 2024: Towards Data-driven Ecology. Resultat har även presenterats vid årliga möten inom ICES-IOC Working Group on Harmful Algal Bloom Dynamics (WGHABD) och NOMP Nordic Marine Phytoplankton group. Vi har också diskuterat våra resultat med följargruppen bestående av vetenskapliga experter och användare.

10. Källhänvisningar

Álvarez, E.A., Klemm, K., Hoppenrath, M., Cembella, A., John, U., Karlson, B., 2022. Temporal and spatial distribution of epibenthic dinoflagellates in the Kattegat-Skagerrak, NE Atlantic–Focus on *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis*. *Harmful Algae* 118, 102318.

Andersson A., Andersson A.F., Karlson, B., 2020. DNA-streckkodning kompletterar traditionell planktonanalys. Sveriges Vattenmiljö DNA-streckkodning kompletterar traditionell planktonanalys | Sveriges vattenmiljö (sverigesvattenmiljo.se)

Andersson, A., Karlson, B., Andersson, A.F., Brugel, S., Latz, B., Lycken, J., Hedblom, M., Torstensson, A., Lindh, M., 2022. DNA extraction protocol for DNA-metabarcoding of marine phytoplankton using Zymobiomics DNA minprep kit (Zymo Research; D4300. [Protocols.io dx.doi.org/10.17504/protocols.io/bucjnsun](https://doi.org/10.17504/protocols.io/bucjnsun))

Andersson, A., Zhao, L., Brugel, S., Figueroa, D., Huseby, S., 2023. Metabarcoding vs Microscopy: Comparison of Methods To Monitor Phytoplankton Communities. *ACS ES&T Water* 3, 2671–2680.

Balzano, S., Abs, E., Leterme, S.C., 2015. Protist diversity along a salinity gradient in a coastal lagoon. *Aquat. Microb. Ecol.* 74, 263–277.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583.

Edvardsen, B., Dittami, S.M., Groben, R., Brubak, S., Escalera, L., Rodriguez, F., Reguera, B., Chen, J.X., Medlin, L.K., 2013. Molecular probes and microarrays for the detection of toxic algae in the genera *Dinophysis* and *Phalacrocoma* (Dinophyta). *Environmental Science and Pollution Research* 20(10), 6733–6750.

Edvardsen, B., Paasche, E., 1998. Bloom dynamics and physiology of *Prymnesium* and *Chrysochromulina*. *NATO ASI Series G. Ecological Sciences* 41, 193–208.

Engesmo, A., Strand, D., Gran-Stadniczeňko, S., Edvardsen, B., Medlin, L.K. and Eikrem, W., 2018. Development of a qPCR assay to detect and quantify ichthyotoxic flagellates along the Norwegian coast, and the first Norwegian record of *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). *Harmful Algae*, 75, pp. 105–117.

Glenn, T.C., Pierson, T.W., Bayona-Vásquez, N.J., Kieran, T.J., Hoffberg, S.L., Thomas, J.C., Iv, Lefever, D.E., Finger, J.W., Gao, B., Bian, X., Louha, S., Kolli, R.T., Bentley, K.E., Rushmore, J., Wong, K., Shaw, T.I., Rothrock, M.J., Jr, McKee, A.M., Guo, T.L., Mauricio, R., Molina, M., Cummings, B.S., Lash, L.H., Lu, K., Gilbert, G.S., Hubbell, S.P., Faircloth, B.C., 2019. Adapterama II: universal amplicon sequencing on Illumina platforms (TaggiMatrix). *PeerJ* 7, e7786.

Godhe, A., Asplund, M.E., Härnström, K., Saravanan, V., Tyagi, A., Karunasagar, I., 2008. Quantification of diatom and dinoflagellate biomasses in coastal marine seawater samples by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7174–7182.

Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., Boutte, C., Burgaud, G., de Vargas, C., Decelle, J., del Campo, J., Dolan, J.R., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Holzmann, M., Kooistra, W.H.C.F., Lara, E., Le Bescot, N., Logares, R., Mahé, F., Massana, R., Montresor, M., Morard, R., Not, F., Pawlowski, J., Probert, I., Sauvadet, A.-L., Siano, R., Stoeck, T., Vaulot, D., Zimmermann, P., Christen, R., 2013. The Protist Ribosomal Reference database (PR(2)): a catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue), D597–D604.

Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Andersson, A.F., 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5, 1571–1579.

Hugerth, L.W., Muller, E.E.L., Hu, Y.O.O., Lebrun, L.A.M., Roume, H., Lundin, D., Wilmes, P., Andersson, A.F., 2014a. Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia. *PLoS One* 9, e95567.

Hugerth, L.W., Wefer, H.A., Lundin, S., Jakobsson, H.E., Lindberg, M., Rodin, S., Engstrand, L., Andersson, A.F., 2014b. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5116–5123.

Jerney, J., Hällfors, H., Jakobsen, H., Jurgensone, I., Karlson, B., Kremp, A., Lehtinen, S., Majaneva, M., Meissner, K., Norros, V., Sildever, S., Suikkanen, S., Teeveer, K., 2023. Guidelines – DNA metabarcoding for monitoring the diversity and distribution of phytoplankton in marine and brackish waters. Nordic Council of Ministers, Copenhagen.

John, U., Šupraha, L., Gran-Stadniczeňko, S., Bunse, C., Cembella, A., Eikrem, W., Janouškovec, J., Klemm, K., Kühne, N., Naustvoll, L., Voss, D., Wohlrab, S., Edvardsen, B., 2022. Spatial and biological oceanographic insights into the massive fish-killing bloom of the haptophyte *Chrysochromulina leadbeateri* in northern Norway. *Harmful Algae* 118, 102287.

Johnson, J.S., Spakowicz, D.J., Hong, B.-Y., Petersen, L.M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S.R., Hanson, B.M., Agresta, H.O., Gerstein, M., Sodergren, E., Weinstock, G.M. 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications* 10, 5029 (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>

Karlson, B., Andersen, P., Arneborg, L., Cembella, A., Eikrem, W., John, U., West, J.J., Klemm, K., Kobos, J., Lehtinen, S., Lundholm, N., Mazur-Marzec, H., Naustvoll, L., Poelman, M., Provoost, P., De Rijcke, M., Suikkanen, S., 2021. Harmful algal blooms and their effects in coastal seas of Northern Europe. *Harmful Algae* 102, 101989.

Karlson, B., Torstensson, A., Andersson, A., Andersson, A.F., Brugel, S., Hedblom, M., Jurdzinski, K.T., Latz, M.A.C., Lindh, M.V., In prep. Light microscopy and metabarcoding of 18S rDNA reveals the distribution of harmful algae in a salinity gradient from the Baltic Sea to the Kattegat-Skagerrak, NE Atlantic.

Kuylenstierna, M., and Karlson, B., 1994. Seasonality and composition of pico- and nanoplanktonic cyanobacteria and protists in the Skagerrak. *Botanica Marina* 37, 17–34, doi:10.1515/botm.1994.37.1.17

- Latz M, A.C., Grujic, V., Brugel, S., Lycken, J., Karlson, B., John, U., Andersson, A., Andersson, A.F., 2022. Short- and long-read metabarcoding of the eukaryotic rRNA operon: evaluation of primers and comparison to shotgun metagenomics sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 22(6) 2304–2318.
- Latz, M.A.C., Jurdzinski, K., Brugel, S., Torstensson, A., Hedblom, M., Lindh, M., Lycken, J., Andersson, A., Karlson, B., Andersson, A.F., 2024. A comprehensive dataset on spatiotemporal variation of microbial plankton communities in the Baltic Sea. *Sci Data* 11, 18. <https://doi.org/10.1038/s41597-023-02825-5>
- Lundholm, N., Churro, C., Escalera, L., Fraga, S., Hoppenrath, M., Iwataki, M., Larsen, J., Mertens, K., Moestrup, Ø., Tillmann, U., Zingone, A., 2023. IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Accessed at <http://www.marinespecies.org/hab> on 2023-11-20. doi:10.14284/362
- Martin J.L., Santi I., Pitta P., John U., Gypens N., 2022. Towards quantitative metabarcoding of eukaryotic plankton: an approach to improve 18S rRNA gene copy number bias. *Metabarcoding and Metagenomics* 6: e85794. <https://doi.org/10.3897/mbmg.6.85794>
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10–12.
- Menden-Deuer, S., Lessard, E.J., 2000. Carbon to volume relationships for dino-flagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnol Oceanogr.* 45(3), 569–579.
- Mäki, A., Salmi, P., Mikkonen, A., Kremp, A., Tirola, M., 2017. Sample preservation, DNA or RNA extraction and data analysis for high-throughput phytoplankton community sequencing. *Front. Microbiol.* 8, 1848.
- Olenina, I., Hajdu, S., Edler, L., Andersson, A., Wasmund, N., Busch, S., Göbel, J., Gromisz, S., Huseby, S., Huttunen, M., Jaanus, A., Kokkonen, P., Ledaine, I., Niemkiewicz, E., 2006. Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea. *Baltic Marine Environment Protection Commission*, Helsinki.
- Parks, D.H., Chuvochina, M., Waite, D.W., Rinke, C., Skarszewski, A., Chaumeil, P.-A., Hugenholtz, P., 2018. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat. Biotechnol.* 36, 996–1004.
- Penna, A., and Galluzzi, L., 2013. The quantitative real-time PCR applications in the monitoring of marine harmful algal bloom (HAB) species. *Environ Sci Pollut Res* 20: 6851–6862.
- Prager, M., Lundin, D., Ronquist, F., Andersson, A.F., 2023. ASV portal: an interface to DNA-based biodiversity data in the Living Atlas. *BMC Bioinformatics* 24, 6.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–6.
- Santi, I., Kasapidis, P., Karakassis, I., Pitta, P.A., 2021. Comparison of DNA metabarcoding and microscopy methodologies for the study of aquatic microbial eukaryotes. *Diversity* 13, 180.

Torstensson, A., Brugel, S., Andersson, A.F., Hedblom, M., Jurdzinski, K.T., Karlson, B., Latz, M.A.C., Lindh, M., Lycken, J., Andersson, A., Comparing DNA metabarcoding with light microscopy to identify eukaryotic phytoplankton in the Baltic Sea, Kattegat and Skagerrak. Manuscript.

Utermöhl, H., 1931. Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons (mit besonderer Berücksichtigung des Ultraplanktons). Verh. int. Ver. theor. angew. Limnol. 5(2), 567–596.

Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt. int. Ver. ther. angew. Limnol. 9, 1–38.

Wasmund, N., 2017. The diatom/dinoflagellate index as an indicator of ecosystem changes in the Baltic Sea. 2. Historical data for use in determination of good environmental status. Front. Mar. Sci.4, 153.

Zhu, F., Massana, R., Not, F., Marie, D., Vaultot, D., 2005. Mapping of picoeukaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. FEMS Microbiol. Ecol. 52, 79–92.

11. Tack

Vi vill framföra ett stort tack till utförare av miljöövervakningsprogrammen vid SMHI, Umeå marina forskningscentrum (UMF) och Stockholms universitet som gav oss möjlighet att följa med på deras havsexpeditioner och ta parallella prov för DNA analys och i vissa fall tog prov åt oss. Vi vill även tacka National Genomics Infrastructure (NGI) på SciLifeLab för hjälp med bibliotekspreparationer och DNA-sekvensering samt Swedish National Infrastructure for Computing (SNIC) för tillhandahållande av datorkapacitet. Sonja Leidenberger och Carina Erlandsson tackas för granskning av tidigare versioner av rapporten samt för konstruktiva förbättringsförslag.

Projektet finansierades av Havs och Vattenmyndigheten och Naturvårdsverket (NV-03728-17). Det marina strategiska forskningsområdet EcoChange har också bidragit till projektet.

Bilaga A – Förslag till övervakningsmanual

DNA-streckkodning för övervakning av
diversitet och utbredning av växtplankton,
mikrozooplankton och bakterieplankton
i kust och hav

Författare: Mikael Hedblom, Anders Torstensson, Markus Lindh, Bengt Karlson,
Anders Andersson, Meike Latz, Sonia Brugel och Agneta Andersson

Innehåll

1. Bakgrund	48
2. Syfte	49
3. Beskrivning av övervakningen	51
4. Strategi	52
4.1 Statistiska aspekter	52
4.2 Provplatser/övervakningsstationer	52
4.3 Frekvens och tidpunkter	52
5. Undersökningen	54
5.1 Variabler	54
5.2 Observations- och provtagningsmetoder	56
5.3 Utrustningslista	56
5.4 Tillvaratagande av prov och analysmetod	56
5.5 Fältprotokoll	60
5.6 Samordning med annan provtagning	61
6. Andra förutsättningar inför undersökningens genomförande	62
6.1 Säkerhetsaspekter	62
7. Kvalitetssäkring	63
7.1 Fältarbete	63
7.2 Laboratorieanalyser	63
8. Dataleverans	64
9. Tids- och kostnadsuppskattning	65
9.1 Fasta kostnader	65
9.2 Analyskostnader	65
9.3 Tidsåtgång	66
10. Författare och kontaktpersoner	67
11. Referenser	68
12. Uppdateringar, versionshantering	69
Bilaga 1. Utrustningslista	70
Bilaga 2. Fältprotokoll	71
Bilaga 3. Metodbeskrivningar	72

1. Bakgrund

Växtplankton, mikrozooplankton och bakterieplankton spelar en viktig roll i biogeokemiska cykler, och utgör basen av den marina födoväven. Övervakning av plankton används för många olika syften, såsom att undersöka ekologisk status och långsiktiga förändringar i den marina födoväven, effekten av påverkan såsom övergödning eller försurning, förekomst av invasiva främmande arter eller skadliga arter. Genom att undersökningarna görs enligt en standardiserad och reproducerbar metodik kan undersökningsresultat användas till flera olika syften. Data som levererats till datavärd utgör därmed ett viktigt bakgrundsmaterial i svensk miljö- och naturvård.

Övervakningen av växtplankton, mikrozooplankton och bakterieplankton har traditionellt utförts med mikroskopsräkning. Metoden är tidskrävande och kräver goda taxonomiska kunskaper av utföraren. Dessutom är vissa arter, och framför allt de minsta organismerna, svåra att identifiera på artnivå genom mikroskopering. Användningen av DNA-streckkodning av taxonomiska DNA-markörer (t.ex. 16S rRNA genen för prokaryota organismer, och 18S rRNA genen för eukaryota organismer) erbjuder ett tidseffektivt komplement till mikroskopanalyser för att studera marina växtplankton och andra mikroorganismer.

DNA-streckkodning har dock begränsningar. Den ställer höga krav på harmoniserade metoder för att producera jämförbara resultat. Dessutom utvecklas tekniken snabbt, samtidigt som referensdatabaserna som styr annoteringen (den taxonomiska bestämningen) av sekvenserna kontinuerligt förbättras. Sekvensering av arter från haven runt Sverige och rapportering av sekvenser hjälper till att utvidga internationella databaser t.ex. Protist Reference Database 2 (PR2), vilket är viktiga för att säkerställa hög kvalitet på resultaten från genbaserad miljöövervakning. Genom lagring av streckkodsekvenser med den högsta möjliga genetiska upplösningen hos datavärd, d.v.s. exakta amplikonsekvensvarianter (ASVer), kan data återannoteras i framtiden allteftersom referensdatabaserna uppdateras. DNA-streckkodning ger en god uppskattning av artdiversiteten och relativa abundanser (förekomst) men har än så länge svårt att uppskatta absolut abundans samt biomassa eller cellantal, eftersom olika arter har olika antal av markörgenerna i sina genom. DNA-streckkodning skall därför ses som ett komplement till traditionell mikroskopbaserad analys. Notera också att långa tidsserier bakåt i tiden saknas för DNA-streckkodning.

2. Syfte

Undersöka biodiversitet

Bedömning av miljötillstånd och miljö kvalitet – basövervakning

Statusbedömning enligt EU:s Vattendirektiv, svenska lagkrav enligt Vattenförvaltningsförordningen

Långsiktiga förändringar av växtplanktonpopulationen

Bedömningsgrunder

Kontrollerande övervakning – ekologisk status (enligt vattenförvaltningsförordningen)

Operativ övervakning – ekologisk status och uppföljning av effekter av specifika åtgärder (enligt vattenförvaltningsförordningen)

Statusbedömning enligt EU:s Havsmiljödirektiv, svenska lagkrav enligt havsmiljöförordningen

Växtplankton ingår i deskriptor 1 (biologisk mångfald), deskriptor 2 (nyintroducerade främmande arter), deskriptor 4 (marina näringsvävar) och deskriptor 5 (övergödning, bl.a. skadliga algbloomningar (t.ex. cyanobakterier) i vattenpelaren).

Det primära kriteriet D1C6: Tillståndet i livsmiljötypen, inklusive dess biotiska och abiotiska struktur och dess funktioner (till exempel dess typiska artsammansättning och dessa arters relativa abundans, frånvaro av särskilt känsliga eller sårbara arter eller arter som tillhandahåller en viktig funktion, arternas storleksstruktur) är inte negativt påverkad till följd av mänskliga belastningar. Måttenheter: omfattning av livsmiljötypen som är negativt påverkad uttryckt i kvadratkilometer (km²) och som procentandel av livsmiljötypens totala omfattning.

Det primära kriteriet D2C1: Antalet främmande arter som nyintroduceras i naturen genom mänsklig verksamhet, per bedömningsperiod (sex år), räknat från det referensår som rapporteras för den inledande bedömningen enligt artikel 8.1 i direktiv 2008/56/EG, minimeras och, om möjligt, minskas till noll.

Det primära kriteriet D4C1: Den trofiska gruppens mångfald (artsammansättning och arternas relativa abundans) är inte negativt påverkad till följd av mänskliga belastningar.

Det primära kriteriet D4C2: Balansen i total abundans mellan de trofiska gilderna är inte negativt påverkad till följd av mänskliga belastningar.

Det sekundära kriteriet D4C3: Individernas storleksfördelning inom den trofiska gilden är inte negativt påverkad till följd av mänskliga belastningar.

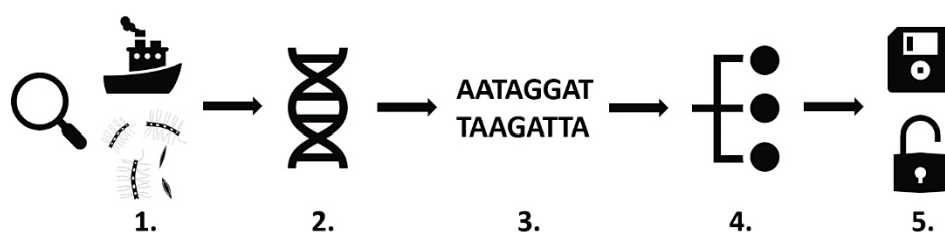
Det sekundära kriteriet D5C3 – Antal, rumslig utbredning och varaktighet av skadliga algblomningstillfällen, ligger inte på nivåer som tyder på negativa effekter av näringsberikning.

Bedömning – För bedömning av god miljöstatus gällande växtplankton finns svenska indikatorer framtagna enligt HVMFS 2012:18:

- Artsammansättning av växtplankton (nationell indikator)
- Biomassa av växtplankton i kustvatten (klorofyll a och biovolym)
- Skadliga alg- och cyanobakterieblomningar i Östersjön
- Förekomst av skadliga alger i Västerhavet
- Förekomst av invasiva/främmande arter
 - *Giftiga/skadliga arter*
 - *Effekter av olika påverkan*
 - *Näringsbelastning/övergödning*
 - *Klimat effekter (temperaturhöjning/försurning)*

3. Beskrivning av övervakningen

Övervakningen av mikrobiell diversitet genom DNA-streckkodning sker genom ett arbetsflöde (figur 1) och beskrivs kortfattat här nedan. En detaljerad beskrivning av de olika momenten finns under stycke 5: Undersökningen. Metoderna ska vara allmänt accepterade och dokumenterade och provtagarna bör vara vana vid provtagning i marin miljö.



Figur 1. Beskrivning av arbetsflöde. Insamling av organismer (1), DNA-extraktion (2), rening, PCR-amplifiering och sekvensering (3), bioinformatisk processering (4), och tillgängliggörande av data (5).

1. Insamling av vattenprover sker i fält. Filtrering av prov sker och organismerna fångas på filter, och förvaras därefter vid minst $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Extrahering av DNA från prover sker i laboratorium. Ett särskilt framtaget metodokument för extrahering av DNA rekommenderas för att uppnå god extraktions-effektivitet.
3. Extraherat DNA renas, specifika regioner av 16S och/eller 18S rRNA genen amplifieras med hjälp av polymeraskedjereaktion (PCR). PCR-produkterna skickas för sekvensering.
4. Sekvensdata bearbetas i ett standardiserat arbetsflöde genom en så kallad bioinformatisk pipeline. Detta resulterar i s.k. ASVer. Dessa annoteras med hjälp av matchning mot en bestämd referensdatabas.

Bearbetat data levereras till, och lagras hos, nationell datavärd för oceanografi och marinbiologi (SMHI). Data tillgängliggörs via datavärdenswebbplats (<https://sharkweb.smhi.se/hamta-data/>).

4. Strategi

4.1 Statistiska aspekter

Den vertikala fördelningen av växtplankton kan variera avsevärt. Ofta samlas växtplankton i tunna skikt på varierande djup. Prov från vattenhämtare från enskilda djup riskerar att missa sådana skikt av växtplankton, vilket gör att dessa prov inte visar den sanna bilden av växtplanktonförekomsten. Problemet minimeras genom att integrerade prov insamlas med hjälp av slang. Provtagning bör även ske på specifika djup med provtagningsflaskor, t.ex. vid klorofyll-maximum.

4.2 Provplatser/övervakningsstationer

Stationer bestäms av undersökningens syfte och kraven på rumslig och temporal upplösning. Vid upprättandet av provtagningsstationer är det av vikt att stationens representativitet i området är undersökt. Se stationsregister med övervakningsstationer och provplatser: <https://stationsregister.miljodatasamverkan.se/stationsregister/composer/>.

Representativa provtagningsstationer

Ur vattendirektivet (200/60/EG): "Medlemsstaterna skall se till att det upprättas program för övervakning av vattenstatusen för att upprätta en sammanhållen och heltäckande översikt över vattenstatusen inom varje avrinningsdistrikt..."

Ur HVMFS 2019:26: "Vattenmyndigheten ska se till att samtliga befintliga ytvattenkategorier inom ett vattendistrikt omfattas av övervakningsprogram som inkluderar ett nät av övervakningsstationer för kontrollerande övervakning. Övervakningsprogram ska upprättas i enlighet med 7 kap. 1 § vattenförvaltningsförordningen (2004:660). Ett eget övervakningsprogram behöver inte upprättas för varje ytvattenkategori, utan flera kategorier får ingå i samma program."

4.3 Frekvens och tidpunkter

Syftet med övervakningen är att följa successionen av mikrobiella taxa över året. På grund av mikroorganismernas korta generationstid (från mindre än en dag till fjorton dagar eller mer) krävs i allmänhet en hög provtagningsfrekvens för att viktiga steg i successionen ska kunna dokumenteras.

Högfrekvent växtplanktonundersökning innebär 20–25 provtagningsstillfällen per år för att täcka växtplanktonsuccessionen under året. Frekvent växtplanktonundersökning omfattar minst 12 provtagningsstillfällen per år och är i allmänhet tillräcklig för att ge information om årscykeln, för att täcka växtplanktonsuccessionen under året. Episoder av kortare varaktighet kan emellertid gå förlorade. I allmänhet kan provtagningsfrekvensen minskas under vintermånaderna (speciellt i Östersjön), för att sedan ökas under blomningsperioder, vår, sommar och höst.

DNA-streckkodningstekniken möjliggör att många prover kan analyseras till en relativt låg kostnad vilket innebär att man kan öka antalet provtagningsplatser och frekvensen för provtagning jämfört med traditionell övervakning av växtplankton utan att kostnaderna skenar. En utökad provtagning innebär att den naturliga variabiliteten kan beskrivas bättre och att den statistiska säkerheten ökar vad gäller analys av långtidsförändringar etc.

5. Undersökningen

5.1 Variabler

DNA-streckkodning erbjuder en kvalitativ och semikvantitativ uppskattning av den mikrobiella biodiversiteten i ett prov. Den relativa abundansen av olika ASVer beskrivs separat för varje gen (t.ex. 16S och 18S rRNA generna), baserat på antal sekvenserade amplicon i ett prov. Val av primer-par och referensdatabas är kritiska vid jämförelse mellan prov och styrs av detta dokument. Informationen måste även rapporteras vid leverans till datavärd. Övriga variabler beskrivs i tabell 1.

Tabell 1. Översiktstabell för variabler och tidsperioder m.m.

Område	Företeelse	Determinand (Mätvariabel)	Metodmoment	Enhet/klassade värden	Prioritet	Frekvens och tidpunkter	Referens till provtagnings- eller observationsmetodik	Referens till analysmetod	
Station (Latitud och Longitud)	Datum, Klockslag			UTC	Obligatorisk		Bilaga 2		
	Prov	Provtagningsdjup (min och max)		m	Obligatorisk			Lindahl (1986)	
		Filtreringsvolym		ml	Obligatorisk				
	Lista över Växtplankton och mikrozooplankton, arter eller lägsta taxonomiska nivå	Antal sekvenser	18S	st	%	Obligatorisk	12–25 gånger per år beroende på område och tid på året. Högre frekvens vid vår- och höstblomning		
		Relativa abundanser							
		Absolut koncentration		gen-kopior/L					
		Primerpar			Obligatorisk		Tabell 2, Stoeck et al. (2010), Balzano et al. (2015)		
		Referensbibliotek			Obligatorisk		PR ² , Guillou et al. (2013)		
	Lista över bakterieplankton inklusive cyanobakterier, arter eller lägsta taxonomiska nivå	Antal sekvenser	16S	st	%	Obligatorisk	12–25 gånger per år beroende på område och tid på året. Högre frekvens vid vår- och höstblomning		
		Relativa abundanser							
Absolut koncentration		gen-kopior/L							
Primerpar				Obligatorisk		Tabell 2, Herlemann et al. (2011)			
Referensbibliotek				Obligatorisk		GTDB-SBDI, Parks et al. (2021), SBDI (2021)			

5.2 Observations- och provtagningsmetoder

Provtagningsmetoderna skall vara allmänt accepterade och provtagarna bör vara vana vid provtagning i marin miljö. Ackreditering av provtagning och analys enligt SWEDAC rekommenderas (Naturvårdsverket och Havs och Vattenmyndigheten, 2022. Systematiskt kvalitetsledningsarbete för samordnad miljöövervakning. Vi rekommenderar att provtagning sker med slang för att erhålla sanna integrerade prov (Lindahl 1986). Provtagningsdjupen kan variera med område. I allmänhet skall prov tas från 0–10 m. Genom användande av *in situ* fluorometer för mätning av djup-profiler av klorofyll-fluorescens kan eventuella klorofylltoppar upptäckas. När sådana observeras skall ett prov tas med vattenhämtare på det aktuella djupet för att identifiera vilken eller vilka växtplanktonarter som bildar klorofylltoppen.

5.3 Utrustningslista

Se bilaga 1.

5.4 Tillvaratagande av prov och analysmetod

Tillvaratagande av prov

Slangprovtagning

Förberedelser

Det är viktigt att hålla en god renhet för att undvika kontamination mellan prover.

- Skölj slang med provvatten inför varje station.
- Skölj slang med varmt kranvatten efter varje station.
- Skölj slangdunk (5 L, plast) med varmt kranvatten följt av avjoniserat vatten efter varje prov.
- Skölj provflaska (1 L, mörk plast) med varmt kranvatten följt av steriliserat och avjoniserat vatten efter varje prov. Märk provflaska.

Utförande

1. Sänk ned slangen i vattnet så att nedre delen befinner sig på önskat djup, t.ex. 10 m.
2. Stäng kran på slangen
3. Ta upp slangen och töm den i havet (sköljning med prov)
4. Sänk ned slangen igen så att nedre delen befinner sig på önskat djup, t.ex. 10 m.
5. Stäng kran på slangen
6. Ta upp slangen ur havet
7. Töm slangen i slangdunken.
8. Blanda vattnet i slangdunken väl innan provet mäts upp.
9. Skölj provflaskan med provvatten, och fyll den sedan den till max.
10. Skölj slang med varmt kranvatten efter varje provtagningsstation.

Starta filtreringen direkt efter provtagningen, det bör ske senast inom en timme. Om det inte är möjligt att filtrera direkt så bör provflaskan förvaras nära *in situ* temperatur. Notera i så fall detta som en kommentar i fältprotokollet.

Blankprov

Innan prover filtreras under en provtagningsomgång görs ett blankprov per filtreringstratt/havsområde. Provet består av 500 ml steriliserat och avjoniserat vatten och ska filtreras, hanteras och förvaras på samma vis som proverna. Före blankprovet ska hela filtreringstratten (under- och överdel) och mätglas sköljas med varmt vatten följt av steriliserat och avjoniserat vatten. Kryorören märks med blank, havsområde och datum. Extrahera prov och blankprov tillsammans, för att konfirmera att ingen kontamination skett.

Filtrering

Organismer samlas upp på filter, ingen för-filtrering skall ske. Se lista över utrustning och material nedan.

Önskvärt är 500 ml filtrerat prov, vid kraftig algblomning i praktiken mindre, t.ex. 200 ml.

Max undertryck är 200 mm Hg/267 mbar/27 kPa.

Undvik kontamination vid hantering av filter och filtreringsutrustning

- Använd laboratoriehandskar (puderfria), torka av med 70 % etanol vid behov.
- Rengör arbetsbänken med 70 % etanol.

Mellan varje prov

- Skölj filterutrustning samt mätglas med varmt kranvatten följt av steriliserat och avjoniserat vatten.
- Pincett torkas av med 70 % etanol.

1. Märk kryorör.
2. Lägg på ett filter.
3. Blanda provet väl i flaskan (vrid runt 50 gånger) och mät upp prov i ett mätglas. Börja med 200 ml (vid mycket kraftig algblomning 100 ml).
4. Fyll på mer prov i tratten innan allt prov gått igenom, låt ej gå torrt. Fyll på med 100–200 ml åt gången. När totalmängden, max 500 ml, är filtrerad kan filtret gå torrt några minuter. Tiden för filtrering får ej överstiga 60 minuter.
5. Med ren pincett, vik filtret på mitten, rulla det sedan, organismerna skall vara på insidan.
6. Stoppa ned filtret i därför avsett kryorör.
7. Placera röret i rack/kryobox i frys vid minst –20 °C.
8. Fyll i fältprotokollet (bilaga 2). Notera t.ex. färg på filtret, förekomst av flercelliga djurplankton, och andra kommentarer angående provtagningen eller filtreringen i fältprotokollet.
Prover transporteras och förvaras frysta vid minst –20 °C.

Analysmetodik

Extrahering av DNA

Rekommendationen är att extrahering av DNA från 16S (bakterier, cyanobakterier) respektive 18S (eukaryota plankton) rRNA generna sker med framtaget metoddokument (Andersson et al. version 2022-02-01). Se illustrerad metodbeskrivning i referens. Metoden bygger på ett DNA extraktionskit från ZymoBIOMICS. Rekommendationen är även att använda anpassade spike-in DNA (bilaga 3) som intern standard. Spike-in DNA tillsätts i provet med en känd koncentration, enligt tabell B3. Dessa är syntetiskt framställda DNA sekvenser som är anpassade för flertalet primers (specificerade i bilaga 3) men vars sekvenser i övrigt skiljer sig från verkliga organismer. Syftet med dessa är att möjliggöra beräkning av absoluta koncentrationer av streckkodsekvenser (ASVer) (antal gen-kopior/L) som ett komplement till relativa abundanser (%).

Tidsåtgång

Bearbetningstiden med ZymoBIOMICS DNA miniprep kit beror på antalet prover från vilka DNA skall extraheras. Extraktion inklusive provhantering tar cirka 2 timmar att utföra vid arbete med 10–12 prover och säkerställer hög kvalitet och noggrannhet. Extraktionen måste utföras från start till slut utan paus. Bearbetning av mer än 10–12 prover i en omgång kommer sannolikt att sänka kvaliteten på extrakten. Utrustningens kapacitet, framförallt centrifug, begränsar antal möjliga prov per extraktion. Vår rekommendation är också att begränsa antalet extraktioner som utförs på en dag till maximalt tre omgångar för att säkerställa hög kvalitet.

Förberedelse

- Se till att extraktionskit och kemikalier ej passerat utgångsdatum.
 - Rengör arbetsbänken med 70 % etanol, arbeta gärna i sterilbänk.
 - Förbered med steriliserad pincett och petriskål på bänken.
 - Förbered pipetter i olika storlekar med filterspetsar.
 - Förbered bägare för att kasta vätskor och använda spetsar.
 - Slå på mikrocenrifugen och ställ in maskinen på 13 000 × g, 1 minut.
 - Förbered vortex med adapterplattor och ställ in tid till 10 minuter.
 - Använd handskar, sprita av med 70 % etanol vid behov.
- 1.1. Förbered spike-in DNA med hjälp av artificiella 16S och 18S rRNA gen-oligonukleotider. Se rekommenderade sekvenser i bilaga 3.
 - 1.2. Tillred stamlösningar med en koncentration av 10 ng/μl genom att tillsätt 100 μl sterilt filtrerat autoklaverat vatten, DNase/RNase-fritt vatten eller TE-buffert till den torra pelleten.
 - 1.3. Bered sedan arbetslösningar genom spädningsserier med steg om ×10, där slutkoncentrationerna av 16S och 18S spike-in DNA är 0,0002 ng/μl respektive 0,0007 ng/μl. Rör med låg DNA-bindning rekommenderas p.g.a. låga koncentrationer. Jämför och notera sedan spädningen för den slutliga koncentrationen med tabell i bilaga 3.
 - 1.4. Frys delmängder av arbetslösningen i –20 °C fram till användning.

Extraktion

Extraktion av DNA följer tillverkarens anvisade metod. Notera att specifika val gjorts i steg 5 samt steg 15 i beskrivningen nedan.

2. Tina filtren i provtagningsrören vid rumstemperatur, klipp filtret i små bitar och lägg i ett ZR BashingBead lyseringsrör (0,1 & 0,5 mm).
3. Skölj provtagningsröret med 750 µl ZymoBIOMICS lyseringslösning och överför sedan lösningen till lyseringsröret.
4. Tillsätt 10 µl av 16S- och 18S-spike-lösningarna och stäng locket ordentligt.
5. Sätt fast och säkra rör i en Vortex-Genie 2 med rörhållaradapter, vortexa med full hastighet i 10 minuter.
6. Centrifugera ZR BashingBead lyseringsrören (0,1 & 0,5 mm) i en mikrocentrifug med 13000 × g i 1 minut.
7. Montera Zymo-Spin III-F-filtret (rödmarkerat) i ett uppsamlingsrör. För över maximalt 400 µl supernatant till filtret, centrifugera med 8000 × g i 1 minut. Ta bort och släng Zymo-Spin III-F-filtret.
8. Tillsätt 1200 µl ZymoBIOMICS DNA bindningsbuffert till filtratet i uppsamlingsröret från steg 7. Blanda väl.
9. Montera en Zymo-Spin IICR-kolon i ett uppsamlingsrör. För över 800 µl av blandningen från steg 8 till kolonnen, och centrifugera med 10000 × g i 1 minut.
10. Häll ut vätskan från uppsamlingsröret och upprepa steg 9.
11. Placera Zymo-Spin IICR-kolonnen i ett nytt uppsamlingsrör.
12. Tillsätt 400 µl ZymoBIOMICS DNA-tvättbuffert 1 till kolonnen och centrifugera med 10000 × g i 1 minut. Häll ut vätskan som går igenom.
13. Tillsätt 700 µl ZymoBIOMICS DNA-tvättbuffert 2 till kolonnen och centrifugera med 10000 × g i 1 minut. Häll ut vätskan som går igenom.
14. Tillsätt 200 µl ZymoBIOMICS DNA-tvättbuffert 2 till kolonnen och centrifugera med 10000 × g i 1 minut.
15. Sätt Zymo-Spin IICR-kolonnen i ett rent 1,5 ml mikrocentrifugrör och tillsätt 50 µl ZymoBIOMICS DNase/RNase-fritt vatten till kolonnens centrum, inkubera i rumstemperatur i 1 minut. Centrifugera med 10000 × g i 1 minut för att eluera DNA.
16. Sätt ett Zymo-Spin III-HRC-filter i ett uppsamlingsrör och tillsätt 600 µl ZymoBIOMICS HRC prep-lösning. Centrifugera med 8000 × g i 3 minuter.
17. Placera Zymo-Spin III-HRC-filtret från steg 16 i ett rent 1,5 ml mikrocentrifugrör. Se till att med en permanent penna märka röret tydligt (både lock och sida) med ett unikt ID (märkningen måste klara frysning).
18. För över det eluerade DNA (steg 15) till Zymo-Spin III-HRC-filtret och centrifugera vid exakt 16000 × g i 3 minuter.
19. Frys extraherat gDNA i -20 °C eller -80 °C. Mät koncentrationen av extraherat DNA med hjälp av Qubit Fluorometer; se separat metoddokument för Qubit. DNA är nu lämpligt för PCR och andra nedströms applikationer.

Bibliotekspreparering

Tabell 2. Primerpar som skall användas för amplifiering av 16S och 18S rRNA generna.

Gen	Region	Primer par	F Primer sekvens	R Primer sekvens
16S rRNA	V3/V4	341F/805R	CCTACGGGNGGCWGCAG	GACTACHVGGGTATCTAATCC
18S rRNA	V4	TAReuk454FWD1 /V4RB	CCAGCASCYCGGTAATTCC	ACTTTTCGTTCTTGATYRR

Bibliotek med kortare fragment av DNA skapas. Normaliserade mängder av DNA används för att preparera biblioteken inför sekvensering. Amplifiering av DNA sker med hjälp av PCR i två omgångar, först en selektiv omgång med de primer-par som används för amplifiering av V3/V4 regionerna av 16S genen (Herlemann et al. 2011) och V4 av 18S rRNA genen (Stoeck et al. 2010, Balzano et al. 2015), enligt tabell 2. Efter första PCR-omgången renas produkten. Den renade produkten amplifieras en ytterligare omgång med primers som även innehåller plattform-specifika adapters (t.ex. Illumina adapters) och provindex, följt av ett ytterligare rening-steg. Kvaliteten på produkterna kontrolleras genom elektrofores på en 1 % agarosgel. Biblioteken sekvenseras t.ex. på en Illumina MiSeq plattform. Bibliotekspreparering och sekvensering finns som tjänst, rekommendationen är att använda National Genomics Infrastructure (<https://ngisweden.scilifelab.se>).

Bioinformatik

Molekylärbiologiska data kräver oftast bearbetning innan informationen kan användas för vidare analys. För streckkodsekvenser baserat på 16S och 18S rRNA gener krävs kvalitetstrimning (borttagning av lågkvalitativ sekvens), samt "avbrusning" (denoising) varvid sekvenseringsfel rättas till av en algoritm. Mjukvaran DADA2 (<https://benjineb.github.io/dada2>, Callahan et al. 2016) rekommenderas för "denoising" och producerar exakta ASVer. 16S ASVer annoteras i DADA2 mot databaserna Genome Taxonomy Database (GTDB; Parks et al. 2021), förslagsvis mot den av SBDI kurerade versionen (<https://github.com/biodiversitydata-se/sbdi-gtdb>, SBDI 2021) och 18S ASVer mot Protist Ribosomal Reference database (PR2, <https://pr2-database.org>; Guillou et al. 2013). Annoterade data kan sedan användas inom miljöövervakning av mikrobiell diversitet, och arkiveras av datavärd. Eftersom sekvenserna klassas till ASV bör data återannoteras när uppdaterade versioner av referensdatabaserna lanseras. GTDB och PR2 uppdateras minst cirka en gång per år. Återannotering innebär bl.a. att organismer som tidigare saknats i referensdatabas, men nu lagts till, kommer med i miljöövervakningsdata. All bioinformatik som är beskriven ovan kan utföras i ett automatiserat arbetsflöde med hjälp av en pipeline, som t.ex. nf-core/ampliseq (<https://nf-co.re/ampliseq>; Straub et al. 2020).

5.5 Fältprotokoll

Exempel på fältprotokoll återges i bilaga 2.

5.6 Samordning med annan provtagning

Övervakningen med hjälp av DNA-streckkodning samordnas alltid tillsammans med program som innefattar klorofyll, hydrografi, närsalter och helst växtplankton (mikroskopi-analys), primärproduktion och bakteriell syrgasproduktion, för att underlätta tolkningen av resultaten. Dessutom mäts i allmänhet siktdjup, samt väderinformation. Andra viktiga stödvariabler är temperatur, salinitet och ljusextinktion (K_{dPAR}).

6. Andra förutsättningar inför undersökningens genomförande

6.1 Säkerhetsaspekter

Var noga med att följa anvisningar för hantering av kemikalier vid extraktion av DNA.

7. Kvalitetssäkring

7.1 Fältarbete

Provtagarna bör vara vana vid provtagning i marin miljö. Metodik för provtagning bör vara ackrediterat av SWEDAC (Naturvårdsverket och Havs och Vattenmyndigheten, 2022. Systematiskt kvalitetsledningsarbete för samordnad miljöövervakning).

7.2 Laboratorieanalyser

Analyspersonal bör vara bekanta med generella arbetssätt och metoder på molekylärbiologiskt laboratorium. Laboratorie som utför DNA-extraktion bör vara ackrediterat av SWEDAC för detta (Naturvårdsverket och Havs och Vattenmyndigheten, 2022. Systematiskt kvalitetsledningsarbete för samordnad miljöövervakning).

8. Dataleverans

Utförare ska leverera råsekvensdata (sekvenserna i t.ex. FASTQ-format) till European Nucleotide Archive (ENA, <https://www.ebi.ac.uk/ena>), samt taxonomiskt annoterade data till datavärd. Obligatorisk mätvariabel är antal sekvenser (st), men möjlighet att leverera relativa abundanser (%) finns (tabell 1). Vid beräkning av relativa abundanser (%) rekommenderas att utesluta sekvenser för Metazoa från uträkningen i 18S, och sekvenser för Archaea i uträkningen i 16S. Utförare bör även leverera taxonomiskt annoterade data till Swedish ASV Portal (<https://asv-portal.biodiversitydata.se>), som är en del av Swedish Biodiversity Data Infrastructure (SBDI, <https://biodiversitydata.se>), enligt deras instruktioner. SBDI tillhandahåller även en guide om hur man levererar råsekvensdata till ENA.

Utförare ska leverera taxonomiskt annoterade data till Datavärd för Oceanografi och Marinbiologi, inklusive metadata. Data rapporteras enligt datavärdens formatmall (<https://www.smhi.se/data/oceanografi/datavardskap-oceanografi-och-marinbiologi/vagledning-for-rapportering-av-marin-miljoovervakningsdata-till-shark-1.87016>). Datavärd återannoterar data regelbundet (se avsnitt 2.3: Bioinformatik).

Datavärd för Oceanografi och Marinbiologi:

SMHI

Sven Källfelts gata 15

426 71 Västra Frölunda

Tfn: 011-495 80 00

E-post: shark@smhi.se

9. Tids- och kostnadsuppskattning

9.1 Fasta kostnader

Tabell 3. Kostnadsuppskattning utrustning. Utföraren bör använda nedan listad utrustning, eller liknande.

Utrustning	Kostnad	Artikelnummer
Mikropipetter 1000 µl, 200 µl, 10 µl, pipettspetsar med filter, t.ex. Eppendorf Reference 2	8 000 SEK	Eppendorf 4924000916
Vortex med adapter, t.ex. Vortex-Genie 2 med horisontell mikrotubhållare	6 000 SEK	Scientific Industries SI-A256, SI-H524
Centrifug för Eppendorf-rör (1.5/2 ml rotor), kapacitet av 16,000 × g	14 000 SEK	Thermo Fisher Scientific 75002430
Qubit Fluorometer	26 000 SEK	Thermo Fisher Scientific Q33240
Filtreringsanordning. Med trattar av glas eller i polysulfon (magnetisk tratt) för 47 mm-filter.		
Vakuumpump med sugflaska		

9.2 Analyskostnader

Följande kostnader uppskattade år 2021. Kostnad förbrukningsmaterial och analys: cirka 425 SEK per prov.

Tabell 4. Kostnadsuppskattning av förbrukningsmaterial. Utföraren bör använda nedan listad utrustning, eller liknande.

Utrustning	Kostnad	Artikelnummer
Filter, 0.22 µm, vita, membran av nitrocellulosa, 100 filter	1600 SEK	Merck Millipore GSWP04700
Eppendorf mikrocentrifugrör 1.5 ml, 250 rör	200 SEK	Eppendorf 0030108051
Qubit dsDNA HS assay kit, 500 analyser	2 800 SEK	Thermo Fisher Scientific Q33231
Zymobionics DNA miniprep kit, 50 extraktioner	3 100 SEK	Zymo research D4300
Kryorör, Thermo Scientific Nunc Biobanking and Cell Culture Cryogenic Tubes, 300 rör och -boxar	2 200 SEK	Thermo Scientific 363452
70 % etanol		

Bibliotekspreparering och sekvensering av 16S och 18S rRNA genernas uppskattas till 30 000 SEK för en full 96-brunnars platta på en Illumina MiSeq plattform (2 x 300 cykler). På en full platta ryms normalt 92 fältprover. Övriga positioner på plattan används för kvalitetssäkring etc.

Eftersom de flesta analyslaboratorier debiterar kostnaden för bibliotekspreparering och sekvensering per 96-brunnars platta, så är det mest kostnadseffektivt att alltid försöka fylla en platta inför sekvensering. Tänk dock på att det kan krävas ett fåtal tomma brunnar för kontroller på varje platta.

9.3 Tidsåtgång

Tidsåtgång provtagning: cirka 45 min per station.

Tidsåtgång DNA extraktion: cirka 2 h per 10–12 prov.

10. Författare och kontaktpersoner

Kontakt Havs- och vattenmyndigheten:

Enheten för Miljöövervakning

E-post: miljoovervakning@havochvatten.se

Experter och författare:

Mikael Hedblom, SMHI

Anders Torstensson, SMHI

Markus Lindh, SMHI

Bengt Karlson, SMHI

SMHI

Göteborgs eskaderns plats 3

421 71 Västra Frölunda

Tel: 011-495 80 00

Anders Andersson, KTH Science for Life Laboratory

Meike Latz, KTH Science for Life Laboratory

KTH Science for Life Laboratory

Tomtebodavägen 23 A

171 65 Solna

Tel: 08-542 820 20

Sonia Brugel, Umeå universitet

Agneta Andersson, Umeå universitet

Umeå universitet

Linnaeus väg 6

901 87 Umeå

Tel: 090-786 50 00

11. Referenser

1. Andersson, A., Karlson, B., Andersson, A.F., Brugel, S., Latz, M., Lycken, J., Hedblom, M., Torstensson, A., Lindh, M., DNA extraction protocol for plankton barcoding using Zymobiomics DNA miniprep kit (Zymo Research; D4300). Version 2022-01-14. protocols.io dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bucjnsun
2. Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., et al. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
3. Parks, D.H., et al. 2021. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic Acids Research*, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab776>
4. SBDI (2021). SBDI Sativa curated 16S GTDB database. <https://doi.org/10.17044/scilifelab.14869077>
5. Straub, D., Blackwell, N., Langarica-Fuentes, A., Peltzer, A., Nahnsen, S., Kleindienst, S. 2020. Interpretations of Environmental Microbial Community Studies Are Biased by the Selected 16S rRNA (Gene) Amplicon Sequencing Pipeline *Frontiers in Microbiology* 2020, 11:2652 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.550420>
6. Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., Boute, C. et al. 2013. The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 41:D597–604. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1160>
7. Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., Andersson, A. F. 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5, 1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
8. Lindahl, O. 1986. A dividable hose for phytoplankton sampling. *ICES. C.M.* 1986/L:26, annex 3.
9. Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M. D. M., Breiner, H.W., Richards, T. A. 2010. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology*, 19 Suppl 1, 21–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04480.x>
10. Balzano, S., Abs, E., Leterme, S. C. 2015. Protist diversity along a salinity gradient in a coastal lagoon. *Aquatic Microbial Ecology: International Journal*, 74(3), 263–277. <https://doi.org/10.3354/ame01740>
11. Naturvårdsverket och Havs och Vattenmyndigheten, 2022. Systematiskt kvalitetsledningsarbete för samordnad miljöövervakning, version 2.0. <https://www.naturvardsverket.se/493497/contentassets/aca7468a25574be2aa33d4a890f40b5e/kvalitetssystemsdok-nv-hav.pdf>

12. Uppdateringar, versionshantering

Version 1:0 2022-02-09. Första version.

Version 1.1 2024-05-02 Referens nr 11 uppdaterad. Adress till SMHI uppdaterad.

Bilaga 1. Utrustningslista

Utrustningslista för provtagning

Tabell B1. Provtagning med slang bör ske med, nedan listad utrustning, eller motsvarande:

Utrustning	Användning	Artikelnummer
Filtreringsanordning. Med trattar av glas eller i polysulfon (magnetisk tratt) för 47 mm-filter	Hela filtreringstratten (under- och överdel) sköljs med varmvatten följt steriliserat och avjoniserat vatten mellan varje prov. Använd olika filtreringstrattar för Västerhavet och Östersjön.	
Filter, 0.22 µm, vita, membran av nitrocellulosa		Merck Millipore GSWP04700
Vakuumpump med sugflaska		
Pincetter	Torkas av med 70 % etanol mellan varje prov.	
Kryorör och -boxar		Thermo Scientific 363452
70 % etanol		
Fältprotokoll		

Utrustningslista för analys

Tabell B2. DNA extraktion bör ske med, eller motsvarande, nedan listad utrustning:

Utrustning	Användning	Artikelnummer
Diskbänk	Generell tvätt	
Kylskåp +4 °C	Förvaring kemikalier och prover	
Frys -20 °C	Förvaring av kemikalier, filter mm.	
70 % Etanol	Sterilisering av bänkar och utrustning	
Glasbägare	Avfallshantering pipettspetsar, vätskor	
Mikropipetter 1000 µl, 200 µl, 10 µl, pipettspetsar med filter, t.ex. Eppendorf Reference 2		Eppendorf 4924000916
Pincett	Filterhantering	
Petriskålar	Filterhantering	
Vortex med adapter, t.ex. Vortex-Genie 2 med horisontell mikrotubhållare	Används för att (1) Lysera celler, skaka tuber med filter och pärlor (inkluderat i DNA extraktionskit) (2) Mixning under DNA extraktion	Scientific Industries SI-A256, SI-H524
Sterilbänk	Extrahering av DNA för känsliga prover	
Centrifug för Eppendorf-rör (1.5/2 ml rotor) med kapacitet av 16 000 × g, t.ex. Sorvall Legend Micro 17	Används under DNA extraktion	Thermo Fisher Scientific 75002430
Hållare för Eppendorf mikrocentrifugrör	Används under DNA extraktion	
Eppendorf mikrocentrifugrör 1,5 ml	Används för att (1) fånga upp eluerat DNA (2) rena eluerat DNA	Eppendorf 0030108051
ZymoBIOMICS DNA miniprep kit		Zymo research D4300
Qubit fluorometer med dsDNA HS (hög känslighet) Assay kit	Mäta koncentration av DNA i extrakt	Thermo Fisher Scientific Q33240, Q33231

Bilaga 2. Fältprotokoll

Fältprotokoll för provtagning, rekommendation SMHI:

Station (kod)	Station namn	Projekt (kod)	Fartyg (kod)	Serie (nr)
Latitud (gggg.mm)		Bottendjup (m)		
Longitud (gggg.mm)		Secchi-djup (m)		
Datum (åååå-mm-dd)		Klorofyllfluorescenstopp (m)		
Slang djup (m)		Tid filtrering start (tt:mm)		
Vattenprovtagare minimum djup (m)		Tid filtrering stopp (tt:mm)		
Vattenprovtagare maximum djup (m)		Filtrerad volym (ml)		
Tid slang upp/provtagning (tt:mm)		Signatur		
Antal replikat (n)				
Kommentar				

Bilaga 3. Metodbeskrivningar

Som internstandard vid DNA extraktion för kvantifiering av DNA rekommenderas följande sekvenser för 16S respektive 18S rRNA gen-oligonukleotider:

>16SrRNA_gene_1447bp_ATGCFreq_E.coli_NR_024570.1_primerbindingsites_341 F_515F_805R_806R

```
GGGGTGAACGTCGCGCGTGGGGTCACTAGTAAGAGAGAGCGGCCGGGACATCAATAGACCGGCTGA  
GTGTTGGGATAGGTAGGTCGCGATTGTGTTAAGTTTTGGCCGCCGTGCTTGAAGAAAGTCCCGGGGACA  
GGAGGAACCGACGGTGAGCGGTGGAGATGGCAACCGGAGCGCCATGAAGGAGCCAGGACTGACTG  
GCTTGGGACGAGTAATCTACGTGATTTTACAGAACCCCTCGTGGGCGCTAGAGAGGAGCATCCCGTGTCT  
CGGGCGCATCAGCAGTGAACGGTGTCACTGACCAGCATCACTGGCGTATGGCGCGGGTCTACGGGA  
GGCAGCAGACGGGCAGCTCTCGATAACCGGCGGAAGGTGGTAGCCACGGACAGGATCAGAACAATTAG  
AAGTGCCGCGAGGTGGCCAAGTCCCCCGGACACAAGACGAGGCCGGAGGCCTGGTATATACACGTAGCT  
AAGAAGAGCTCATCCAGACTGGGAACGGTGTGCCAGCAGCCGCGGTAACATCACCACAACGTATTCCGT  
CACAAATTGATCGGAGGGAGAAATCGTCCGAGGATCTCAAACCTTAACTAAGGACTAGTACTACATAGG  
CTCGAGAAGAGCTACCGTTTGCAGGGTGCAGGGTACCGCTTAACCATAAAAGATCCACTCAGGTAGCC  
GTCCAGTTTCTCTGAAATGATGGGGCGAGAAACACGGCTGGGCGTTATACGAGTGTCTTTAGAATATGA  
GGAGAGACAGGGGTATATTCAAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCGATCTCGATCTACGCTGGACGTG  
ACGTGTACATTCTGGTCGAAACGGTACAAAGATCGTTTGGAGATGGAGGGGCGCGCATAAACATGAGTC  
AGCGCACCTACTACTGCATTGACGACGAGTCAAGCGGGTTGGAACCGACCCAGGACCGTGTGCTCT  
GGGACATGCCTAGACAGGAAGGTGACGTATAGGAGACGTCGAGGGGGAGATATAGCCGTGGGTCAAAG  
CTAATCGTACCCCGCCTTCCGCTAGCTCATAATTTGCTTCTGGGACCAAGCCGCTGAGGGATTACGGTA  
TCTAGTTGCTCGGCGACTTTGGGAATAGCCACACTGATCGAGGTGAGAGGAAGGGAAGTATGTAAGTT  
TGTCTTAGGGTACCGGCAGGTGGCGCAATCTTCTCCTTGCAGGAAGGGGGGACCGAGCATGGGTCA  
GAATGACTCCGGGGCGTAGGGTACACAAGGGTGCAGCGACCAGGGCCGCGCAATTGTTGAATGCTAT  
GTATTATATCGAGTGTGCGTTGGCAGCGAACGTAAGACGTGTCGGAGCCTGCAGCTGTGAAGTTAAC  
CGTGACACCTATACAATGTTTCAAGATGGGGGTTAGTTATAGATGGTAGCCCGTTTCAACCGTTCTCG  
CGAATC
```

>18SrRNA_gene__length1261_primersites_563f/V4fw-1563(18)_TAREuk- 454FWD-1564(20)_TAREukREV3-1991(18)_V4rev-2017(18)_1132r-2157(18)_ V9dropfw_2205(22)_V9fw-2207(18)_V9droprev-2675(19)_V9rev-2676(18)

```
AAGAGAGCCATGGCGTGAAGTAGCGGGATGAGTTACCCTCCATACTAGTAAATACGGCGTGTTCCTAAAT  
GCCCCTGCCAACCTACATAGATGGGACTAAGCCAGCAGCCGCGGTAATCCCTTCGTTATCGTCACGGA  
GAGAACTGCCTTTAGCGATCTGTCTAGAGACCCGCCAAATATAAGCCTTGGGGTTATTAACAAAGACGCC  
AAACACTAGTGAATATGACAGTGAAGGGGTGTGAGATAGCTTTACTGGGTGAGAAAACACTCGTTAAAAA  
GAATTAGACCGGATAATCCCCGAGGGGCCGTAGGCATGGACTTGTGCTTGGCACCAGCATAGCGGTTT  
CGAAATAGCCGAGATGGGCACTGGCGAATTAACCCACTGGTTTATATGGATCCGATGGGTTCACTTAATA  
AGCTCGTACCAGGGATGAATAAAGCGTTACGAGAATTATAAACATGGAGTTCCATTGATTTGAGGTTAAT  
ACCGAACGGGAACATTTGTCGATCATGCTTCACATAGAGTTTAAATCAAGAACGAAAGTACAGTCTTCGAA  
GTGGATTAGATACCGCCGACCTAGTGACGCGAATATATCGATGACGATCTCCTATAACGGGAGGTCTCG  
TTAACTGACTGTGATGGTTGTCCGTGTTTCAATTAGGAGAAGGTTAAAGACTGTGATCGTGATAAATTT  
AAAGGAATTGACGGGCTTTGATTAGTAGTTCCTGTTACCTCAATTCAATTGAAATCAACCGGGGAAAGT  
CGCCGGCCAAATACAGCTTTTATTGATTAGTGGGTATTAGATTGGCAGACTGAATAGCCAACAGAGTGC  
AGTTATTTCCGTTACTTGATACTCGCTGCGACTTACCGGGCTTGGTAAGTGCACCATAACAGTGCACGT  
TTGCTCATCTACATATCAAAGTTTTGGTCTTTTGTCTGCTGGCTGATGCTGTAAAGCTCGTACGACGGGC  
CCAGTCTACAGAACGGCTTTGTCTAAGTACTGAGGCAGGGAGCATGACTTGCCGAAGTGTAGTAGTG  
GAATGTCGCCATCCGTGACAGTATAATGGGGCGAGGAGGACTTCGCTGGGTATCTTAGTACAGAAG  
AATGGCTCGGTTTTACTTGATGATTTGGCCAGTATGAAACGCTCACGCCCTGTTTAGATTCTTGGAGCG  
CAGTATGTTAATCTAGTCCACATCCTTTTGTACACACCGCCCGTTCCTTATTGGTGTGGTGGGTAG  
TGTAAT
```

Tabell B3. Rekommenderade koncentrationer av internstandard (16S respektive 18S rRNA gen-oligonukleotider) vid extraktion av DNA.

Koncentration spike-in DNA	16S spike DNA (ng)	18S spike DNA (ng)
5 %	0,00204	0,00729

Rapporten uttrycker nödvändigtvis inte Naturvårdsverkets ställningstagande. Författaren svarar själv för innehållet och anges vid referens till rapporten.

DNA-streckkodning av marina växtplankton

Ett nytt verktyg i miljöövervakningen

Växtplankton, som utgör grunden i den marina näringsväven, har länge använts för att mäta miljöförändringar. Just nu sker det en snabb utveckling av DNA-metoder för miljöövervakning.

Forskningsprojektets syfte har varit att utveckla DNA-streckkodning av marina växtplankton som ett verktyg för miljöövervakning.

DNA-metoden har visat sig ha en stor potential för att visa planktonsamhällenas sammansättning och diversitet, samt som en mätare på förändringar i miljön. Men projektet har även fångat upp förekomster av organismer som inte tillhör växtplankton.

Forskningsprojektet även visat på att metoden behöver vidareutvecklas, då den bara fångar upp 50 % av den genetiska variationen inom en växtplanktonart (ASV, amplicon sequence variants), vilket gör gränsdragningen mot andra arter svår.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag som finansierar forskning till stöd för Naturvårdsverkets och Havs- och vattenmyndighetens kunskapsbehov.