

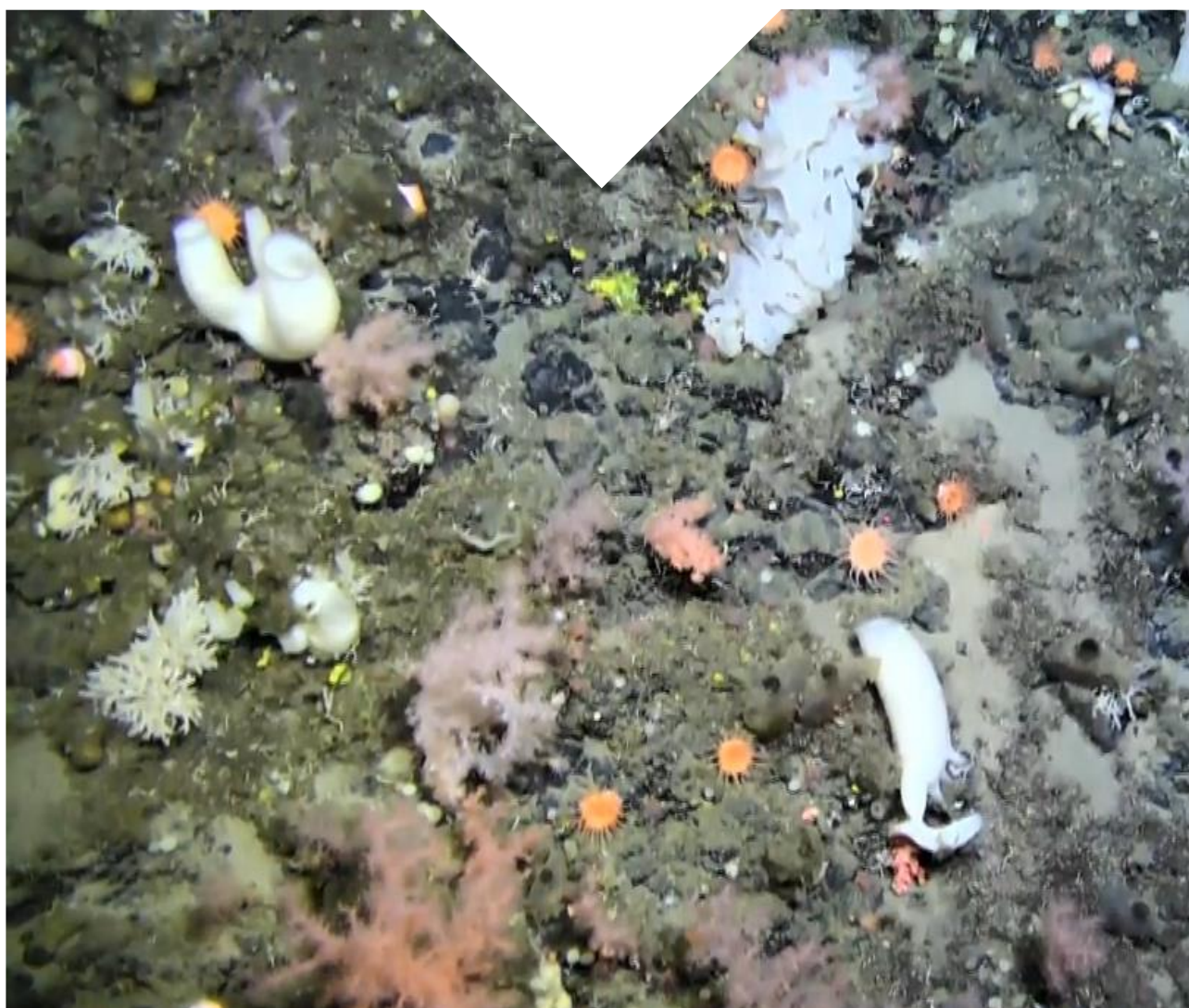


MILJØ-  
DIREKTORATET

RAPPORT

M-2062 | 2021

# Kunnskapsstatus for bruk av molekylære verktøy i kartlegging og overvåkning av biologisk mangfold i marine miljø



# KOLOFON

---

## Utførende institusjon

Universitetsmuseet i Bergen og NTNU Vitenskapsmuseet

## Oppdragstakers prosjektansvarlig

Anne Helene Solberg Tandberg, Luis Martell

## Kontaktperson i Miljødirektoratet

Sunniva Aagaard, Ingrid Bysveen

## M-nummer

2062

## År

2021

## Sidetall

76

## Miljødirektoratets kontraktnummer

20087444

## Utgiver

Miljødirektoratet

## Prosjektet er finansiert av

Miljødirektoratet

## Forfatter(e)

Dunshea, Martell et al.

## Tittel - norsk og engelsk

Kunnskapsstatus for bruk av molekylære verktøy i kartlegging og overvåkning av biologisk mangfold i marine miljø - Knowledge status for the use of molecular tools in mapping and monitoring biological diversity in marine environments.

## Sammendrag - summary

Denne rapporten er bestilt av Miljødirektoratet fra NorBOL (Norwegian Barcode of Life), et nasjonalt nettverk av forskningsinstitusjoner som koordineres av NTNU Vitenskapsmuseet. Universitetsmuseet i Bergen har hatt prosjektledelsen. Rapporten gir en oppsummering av dagens status på DNA-basert metodikk som verktøy i kartlegging og overvåking av biologisk mangfold i det marine miljø. Fokus har vært på innsamlingsmetodikk og protokoller for DNA-analyser av arter og artsgrupper. Metodikken er evaluert opp mot kartleggings- og overvåkingsaktivitet i regi av Miljødirektoratet, og kommer med anbefalinger for videre framdrift for å ta metodikken i bruk i nasjonal kartlegging og overvåking. Rapporten har også en gjennomgang og evaluering av eksisterende referansemateriale og referansesekvenser for relevante arter og artsgrupper som inngår i Miljødirektoratets kartleggings- og overvåkingsaktivitet.

## 4 emneord

Miljø-DNA, referansesekvenser, marine miljø, marint mangfold

## 4 subject words

Environmental DNA, reference sequences, marine environment, marine diversity

## Forsidefoto

Svampe- og bløtkorallskog på Schulz-banken. Universitetet i Bergen, H2020 SponGES prosjektet - ROV Ægir6000

# Kunnskapsstatus for bruk av molekylære verktøy i kartlegging og overvåkning av biologisk mangfold i marine miljø

Glenn Dunshea<sup>1</sup>, Luis Martell<sup>2</sup>, Torkild Bakken<sup>1</sup>, Nataliya Budaeva<sup>2</sup>, Torbjørn Ekrem<sup>1</sup>, Anne Helene S. Tandberg<sup>2</sup>, Thierry Baussant<sup>3</sup>, Hugo De Boer<sup>4</sup>, Jon Thomassen Hestetun<sup>3</sup>, Anders Hobæk<sup>5</sup>, Eveliina Päivikki Kallioniemi<sup>6</sup>, Aud Larsen<sup>3</sup>, Stine Svalheim Markussen<sup>6</sup>, Quentin Mauvisseau<sup>4</sup>, Jessica L. Ray<sup>3</sup>, Nigel Yoccoz<sup>7</sup>, & Endre Willassen<sup>2</sup>

1 NTNU Vitenskapsmuseet, 7491 Trondheim

2 Universitetsmuseet i Bergen, Universitetet i Bergen, Postboks 7800, 5020 Bergen

3 Norwegian Research Centre AS, Postboks 22 Nygårdstangen, 5838 Bergen

4 Naturhistorisk museum, Universitetet i Oslo, Postboks 1172 Blindern, 0318 Oslo

5 Norsk institutt for vannforskning, Gaustadalléen 21, 0349 Oslo

6 Artsdatabanken, Havnegata 9, 7010 Trondheim

7 UiT det Arktiske Universitetet, Postboks Langnes, 9037 Tromsø

# Innhold

Sammendrag .....	6
Oppsummering og anbefalinger .....	6
1. INTRODUKSJON .....	9
1.1 Hva er miljø-DNA - grunnprinsipper .....	10
1.2 Marint miljø-DNA: kilder, fysisk tilstand og variasjon .....	13
1.2.1 Kilder til marint miljø-DNA .....	13
1.2.2 Fysisk form, tids-, romlig- og substrat-variasjon av marint miljø-DNA .....	14
1.3 Introduksjon til metode .....	18
1.3.1 PCR-baserte tilnærminger .....	18
1.3.2 Metagenomikk .....	22
1.4 DNA referansebibliotek .....	23
2. TILGJENGELIG MATERIALE OG DATA FOR NORSKE MARINE TAKSA .....	24
2.1 Vitenskapelige museumssamlinger .....	24
2.2 Tilgjengelige referansesekvenser for norske taksa .....	25
2.2.1 Materiale ved samlinger i Norge .....	25
2.2.2 Norskinnsamlet materiale i samlinger utenfor Norge .....	26
2.2.3 Status for samlinger som kan ha relevante arter innsamlet utenfor Norge .....	26
2.3 Status for pågående prosjekt med innsamling av referansemateriale .....	27
2.4 Vurdering av prioriteringene for samling av referansemateriale .....	28
2.5 Vurdering av prioriteringene for “strekkodeing” av referansemateriale fra kartleggings- og overvåkingsaktivitet .....	28
2.6 Viktigheten av museumssamlinger for strekkoder .....	29
3. PROBLEMSTILLINGER MED PRØVEINNSAMLING (FRA FORSKJELLIGE HABITAT) .....	34
3.1 Pelagiske prøver .....	36
3.2 Innbentos (bløtbunn) .....	37
3.3 Hyperbentos (bløtbunn) .....	38
3.4 Hardbunn (grunn) .....	38
3.5 Oversikt over protokoller fra litteraturen .....	39
3.5.1 Protokoller for pelagisk prøvetakning .....	39
3.5.2 Protokoller for inbenthos prøvetakning (bløtbunn) .....	40
3.5.3 Protokoller for prøvetakning av hyperbenthos .....	41
3.5.4 Protokoller for prøvetakning fra hardbunn .....	41
3.6 Sammenligning av protokollene og generelle anbefalinger for prøveinnsamling .....	42
4. ANALYSER AV MILJØ-DNA I MARINT MILJØ .....	44
4.1 Forskjeller i data fra undersøkelser med miljø-DNA og tradisjonelle metoder .....	44
4.2 Metodologiske betraktninger .....	49

4.2.1	DNA-ekstraksjon.....	49
4.2.2	PCR-basert arbeidsflyt .....	50
4.2.3	Bioinformatikk for metastrekkoding.....	53
4.2.4	Statistiske betraktninger.....	54
4.3	Eksempler på studier av marint miljø-DNA anvendt for miljøforvaltning .....	56
4.3.1	Bekymringsarter .....	56
4.3.2	Overvåkning av biomangfold for anvendt konsekvensutredning.....	57
4.4	Miljødirektoratets prioritetsområder og miljø-DNA-teknikker .....	58
	Referanser .....	60
	Vedlegg.....	72

## Sammendrag

Kartlegging og overvåkning av biologisk mangfold ved hjelp av DNA-analyser på miljø-DNA har et stort potensiale ettersom det kan være tidsbesparende, skånsomt og sensitivt. Men fordi det marine miljø er så mangfoldig både når det gjelder geografi og fysisk utforming, og har et svært stort mangfold av organismer, er bruk av miljø-DNA i biologisk overvåkning i saltvannssystem svært komplisert.

Metoder og standarder for innsamling, laboratorieanalyser, bioinformatikk og statistiske analyser er avhengige av hensikten med undersøkelsene, og må tilpasses spesielt for hvert område de skal brukes. Pilot-eksperiment for hvert studium er i så måte essensielt.

Parallele innsamlinger som kan gi mulighet for sammenligning mellom tradisjonell innsamling og molekylære metoder bør være neste steg for å komme videre med metodeutviklingen. Dette betyr at både tradisjonelle metoder og molekylære metoder må benyttes samtidig for en lengre periode. Det er viktig at dette skjer over en stor geografisk skala.

For å få pålitelige og relevante resultater fra DNA-metastrekkoding trenger en oppdaterte og fullstendige referansebibliotek basert på lokalt innsamlede organismer. Dette bør være støttet av belegg av organismene oppbevart i offentlige vitenskapelige samlinger. Gode referansebibliotek er også nødvendig for utvikling av artsspesifikk PCR-diagnostikk. Referansebibliotekene bør fortsatt utvides - både med tanke på taksa og til at det trengs flere molekylære markører i bibliotekene.

I denne rapporten gir vi en detaljert kunnskapsstatus for bruk av molekylære verktøy til kartlegging og overvåkning av marint biologisk mangfold. Det legges spesielt vekt på publiserte forskningsresultater fra studier som benytter DNA fra miljøprøver i sine undersøkelser og eksperimentelle oppsett.

## Oppsummering og anbefalinger

### Oppsummeringer

- Miljø-DNA (eDNA) brukes for å beskrive DNA-innholdet både i en samleprøve (organismer eller avføring) eller en miljøprøve (for eksempel vann eller sediment). Hovedfokuset i denne rapporten er på miljøprøver, men i noen tilfeller behandles også samleprøver.
- Overvåkinger og analyser med miljø-DNA er et relativt nytt forskningsfelt som er i rask utvikling. Laboratorieprosedyrene er omfattende og har flere trinn. Vi kan generelt dele dem opp i PCR-diagnostiske tilnærminger som søker å påvise spesifikke takson-nivå (for eksempel arter eller slekter), og tilnærminger som identifiserer et bredt mangfold av taksonomiske grupper ved hjelp av DNA-strekkoding ("metastrekkoding").
- Det sies at identifiseringsmetoder basert på miljø-DNA krever mindre taksonomisk ekspertise og tid sammenlignet med tradisjonelle (morfologibaserte) metoder. De er derfor ofte sett på som mindre ressurskrevende, og kan benyttes i større utstrekning enn tradisjonelle studier gitt samme økonomiske rammer. Men det er viktig å huske på at taksonomisk kompetanse er uvurderlig i etableringen av referansebibliotek og også at det er viktige egenskaper i tradisjonell metodikk som er vanskelig å oppdage ved identifisering med molekylære metoder. Dette inkluderer (1) klarere oppfatning av romlig og temporær utbredelse til de innsamlede artene, (2) muligheten for å bekrefte tilstedeværelse og å

kunne kjenne igjen viktige morfologiske karakteristika og livsstadier, og (3) definitive tall på abundans.

- Anvendelsen av miljø-DNA i miljøovervåking må vurderes ut fra hvilke spørsmål som stilles for forvaltning av et område, og hvilke habitater som finnes i området. Det finnes ikke én løsning for bruk av miljø-DNA til all overvåking. Ulike problemstillinger krever forskjellige løsninger. For gitte forvaltningsmål i et spesifikt habitat kreves det at metodene som skal brukes gjennomgår omfattende validering og standardisering. Det gjelder alt fra felt- og laboratoriearbeid til bioinformatiske og statistiske analyser.
- Prosessen der DNA flyttes fra organisme til miljø er kompleks, og i mange tilfeller ikke godt beskrevet hverken for marine miljø, marine samfunn eller for marine taksa. Det er store taksonomiske forskjeller som er avhengige av morfologi, livshistorie og økologi for ulike taksa. Dette er spesielt viktig å ta hensyn til tatt i betraktning det store (evolusjonære) mangfoldet en har i marine miljø.
- Økologien til miljø-DNA i naturen (romlig og temporær dynamikk) er verken godt karakterisert eller forstått. Tolkningene av romlige og tidsmessige aspekt er ofte mangelfulle og i ytterste konsekvens ikke godt definert.
- Referansebibliotek er en helt nødvendig ressurs for utvikling av metoder der miljø-DNA inngår, og for identifisering av arter i miljø-DNA. For marine miljø bør slike bibliotek omfatte flere markører enn de som tradisjonelt blir benyttet i DNA-strekkoding.
- Referansebibliotek som er dokumentert med fysiske belegg (vouchere) har stor verdi - både konkret som sammenligningsgrunnlag og for revurderinger av identifiseringer. Museumssamlinger spiller en kritisk rolle for referansesamlingene. De fleste andre institusjonssamlinger er ikke kuraterte, og har kort levetid.
- Gode og relativt komplette lokale og regionale referansebibliotek gir sikrere identifiseringer enn generelle verdensomfattende referansebibliotek for hvert spesifikke prosjekt.
- Innsamlingsprotokoller for undersøkelser med miljø-DNA varierer stort med hvilke mål undersøkelsene har og med hvilke måltaksa som skal undersøkes eller letes etter. Etersom det marine miljø er så mangfoldig og publiserte rapporter ikke beskriver innsamlingsprosedyrer med tilstrekkelig grundighet, er det umulig å komme med en god sammenligning av de metodene som er i bruk på det nåværende tidspunkt. Det er nødvendig med flere og mer systematiserte studier på dette området der det blir tatt hensyn til alle nivå i innsamlingskjeden (fra antall prøver og lokalisering av prøver i tid og rom, til prøvevolum, filterporestørrelser, lagringsmedium, for å nevne noe).
- Tolkning av analyseresultater fra miljø-DNA krever at en kan spore mønster fra molekylene i miljøet tilbake til de naturlige populasjonene av organismer i samfunn. Dette krever at vi anerkjenner de iboende usikkerheten rundt den molekylære dynamikken i miljøet, og molekylenes tilknytning til de naturlige populasjonene og til organismene i disse samfunnene.
- For laboratorie- og bioinformatikkprotokoller er det flere ledd som er avhengige av eksperimentell kontroll hvis en skal bevare datakvaliteten. Samtidig er det et overveldende mangfold av protokoller i litteraturen.
- De fleste laboratorier, studier og prosjekter definerer og utvikler sine egne metoder og statistiske modeller. Det leder til at det er en stor variasjon i metodene som brukes. Dette vil nødvendigvis fortsette mens vi forsker oss frem til gode og mer standardiserte metoder.

- Ved valg av statistiske analyser av miljø-DNA-data må en ta inn over seg de spesielle egenskapene som finnes i slike datasett. I miljøforvaltningsøyemed der gjenkjenning av spesifikke taksa er kritisk, vil man måtte inkludere gjenkjennings-sannsynligheten av taksonet i både det eksperimentelle designet, feltmetodikk og molekylære- og statistiske analyser.

### Anbefalinger

- Vi anbefaler at det bygges nasjonale referansebibliotek som dekker de forskjellige taksaene sine totale utbredelsesområder. Vidt utbredte taksa i havets tre dimensjoner bør derfor være representert med flere referanser. Det krever anvendelse av integrert taksonomi der morfologiske og molekylære analyser følger hverandre, og at data er lett tilgjengelig. Tilgjengelighet må sikres ved å deponere data i åpne databaser (f.eks. i BOLD som krever belegg av vouchere), og i vitenskapelige samlinger ved universitetsmuseene.
- Vi anbefaler at det opprettes pilotstudier som kan bygge fler-loci referansebibliotek for å fylle hull i bibliotekene og teste metoder for å generere data fra de markørene som vanskelig lar seg sekvensere med Sanger-metodikk.
- Vi anbefaler at det opprettes bredt anlagte program som støtter opp under utvikling av standarder for innsamling, laboratorieanalyser og bioinformatiske analyser av miljø-DNA for forskjellige definerte forvaltningsmål.
- Vi anbefaler at all utvikling av metoder og standarder for prøveinnsamling inkluderer innføring av relevante kontroller, og rutiner for å oppdage eventuell krysskontaminering og forurensing av prøvene. Gjennomføring av pilotstudier bør bli en del av standarden for alle nye prosjekter.
- Vi anbefaler at overvåkings- og kartleggingsprogram som i dag bruker de tradisjonelle metodene fortsetter med denne innsamlingen og dokumentasjonen parallelt med utvikling av standarder for miljø-DNA. Vi anbefaler videre at resultatene fra de to tilnærmingene sammenlignes for vurdering både av muligheten for videreføring av tidsserier og for grunnsjekk (ground-truthing).
- Det er nødvendig med økt grunnleggende forskning på basale fenomen som avsetningsrate og DNA-nedbryting fra lokale taksa i norske marine miljø. Dette bør være bredt anlagt taksonomisk.



# 1. INTRODUKSJON

Formålet med denne rapporten er å presentere en faglig gjennomgang av eksisterende kunnskap om innsamling og analyse av miljø-DNA i marine leveområder. Gjennomgangen skal 1) vurdere eksisterende referansemateriale og referansesekvenser for relevante artsgruppe, 2) gjennomgå eksisterende relevant metodikk for innsamling av prøver og 3) evaluere eksisterende protokoller og eventuelle standarder, med tanke på en vurdering av om protokoller som benyttes i dag dekker de behovene Miljødirektoratet har for kartlegging og overvåking av marine miljø. Molekylær identifisering av marint biologisk mangfold er potensielt et effektivt og presist verktøy, både i eksisterende og nye overvåkingsprogrammer, og kan være betydningsfullt for bærekraftig forvaltning av marine ressurser, og kan benyttes både på encellede og flercellede organismer. I denne rapporten vil vi fokusere på de flercellede (eukaryote) organismer. Eksisterende programmer for overvåking der analyser av miljø-DNA kan være nyttig er *Mareano* (Mareano aktivitetsplan 2020), marine grunnkart i kystsonen - pilotprosjekt (*Marine grunnkart i kystsonen*), naturtypekartlegging i kystområder (*Kartlegging av marine naturtyper*), økosystemovervåking i kystvann (*Økokyst*), og petroleumsovervåkingen (*Petroleumsovervåking: Miljøovervåking på norsk sokkel*).

Bruk av miljø-DNA i marine miljø er et svært komplisert fagområde, særlig fordi marine miljø i seg selv kan bestå av mange forskjellige typer miljø med svært mange forskjellige typer organismer. Verdenshavene dekker 71% av jordens overflate, og regnes for å ha så mye som 95% av jordens tilgjengelige habitat - leveområder for dyr og planter. Hvis vi ser på arealer innenfor norsk forvaltningsområde er norske havområder (2 279 965 km<sup>2</sup>) omtrent seks ganger større i overflate enn fastlands-Norge, Svalbard og Jan Mayen tilsammen. Norge har med sin kystlinje (fastlands-Norge) på nesten 30 000 km (og total strandlinje på nesten 103 000 km) en utstrakt fjæresone som er helt forskjellig både i fysiske og biologiske bestanddeler enn for eksempel dyphavene våre, som på de dypeste punktene (Molloydypet like vest av Svalbard) når hele 5569 m under havets overflate. Svært grovt kan vi dele studier i havet inn i biologi i vannsøylen (pelagialen) og biologi ved/i havbunnen (bentos), men det er selvfølgelig en mengde forskjeller innen disse grove hovedgruppene. Hvis vi skal si noe om hvordan et fagområde kan benyttes til å gi ny eller annen informasjon i et så mangfoldig miljø, vil det nødvendigvis ikke uten videre kunne gjelde for alle deler av miljøet.

Selv om Norge er en nasjon med lange tradisjoner innen havforskning, og selv om svært store andeler av norsk økonomi kan sies å komme fra havet, vet vi betydelig mindre om livet i havet enn om livet på land eller i ferskvann. Dyrelivet i havet omfatter så godt som alle dyrerekkene, på land er kun omlag en tredjedel av dyrerekkene representert. Dette gir en svært stor morfologisk (utseendemessig) og økologisk variasjon, og det gjør det vanskelig å generalisere over "havdyr". Vi har også mye mindre oversikt over hvilke arter som finnes, også innenfor våre relativt godt studerte norske farvann, og stadig beskrives nye arter for vitenskapen. De marine mikrobielle systemene er nært sagt ubeskrevne, også i norske farvann.

Det er også viktig å merke seg at selve fagområdet miljø-DNA er et nytt fagområde som fremdeles er i rivende utvikling. Den beste fremgangsmåten i år trenger ikke å være ansett som like god neste år. Rapporten vil vise at slik miljø-DNA nå fungerer som et fag, er det et svært genetikk/molekylærbiologi-styrt område, der mye av fokuset ligger på laboratorieanalyser av prøver og statistisk behandling av resultater. Hoveddelen av dette diskuteres i rapportens kapittel 4. Det finnes noen, men ikke fryktelig mange, økologer som jobber sammen med genetikerne; de to fagretningene snakker ikke alltid samme språk. Dette vil komme fram i rapportens kapittel 3, som

omhandler innsamlinger av prøver. Tradisjonelle overvåkningsstudier har vært økologers og taksonomers domene - fagfolkene som analyserer interaksjoner mellom arter og artssamfunn, og de som beskriver det biologiske mangfoldet. Koblingen fra miljø-DNA-prøver til arts- og slektsnavn (og høyere hierarkiske nivå) avhenger av referansebibliotek for DNA-sekvensdata - disse diskuteres i rapportens kapittel 2. Under (i rapportens kapittel 1) vil vi gi en introduksjon til selve fagfeltet miljø-DNA. Spesifikke faguttrykk som er brukt i rapporten er oppsummert i Boks 1: Ordforklaringer.

## 1.1 Hva er miljø-DNA - grunnprinsipper

Miljø-DNA (eDNA) er en sammensatt blanding av genetisk materiale (DNA) fra mange forskjellige organismer funnet i en miljøprøve (Ficetola et al., 2008; Taberlet et al., 2018). Sediment og vann er de vanligste marine miljøprøvene som samles og analyseres for miljø-DNA, men konseptet "miljø-DNA" kan også inkludere andre mer begrensede biologiske eller fysiske områder som for eksempel mageinnhold eller også bulk-prøver med hele organismer (for eksempel en komplett prøve fra en planktonhåv). Opphavet til miljø-DNAet er mangfoldig, og begrepet inkluderer både intracellulært og ekstracellulært DNA (Pietramellara et al., 2009; Taberlet et al., 2012). Ekstracellulært DNA kan for eksempel komme fra hud eller skinn, sekret, kjønnsceller, avføring, blod, sporer og råtnende kropper av større organismer, og være nedbrutt gjennom fysiske, kjemiske eller biologiske prosesser. Etter at det er sluppet fri vil slikt ekstracellulært DNA kunne bli tatt opp av uorganiske eller organiske partikler med reaktiv overflate som sand og leire, og slik samles opp i marine sedimenter. Intracellulært DNA stammer fra levende celler eller levende flercellede organismer som er tilstede i miljøet (Barnes & Turner, 2016; Taberlet et al., 2018). Produksjonen av både intra-og ekstracellulært miljø-DNA avhenger av biomassen, alderen og spiseadferd så vel som fysiologi, livshistorie og organismenes miljøbruk (Barnes & Turner, 2016; Goldberg et al., 2016; Hering et al., 2018). Miljø-DNA kan samles fra miljøprøver gjennom en mengde teknikker og metoder, og kan så bevares, ekstraheres, oppformerer (amplifiseres), sekvenseres og kategoriseres (Deiner et al., 2015). Informasjonen vi får fra dette kan brukes til å detektere og identifisere artene som er tilstede i en spesifikk miljøprøve.

Selv om definisjonen over kan virke liketil, er bruken av begrepet "miljø-DNA" tidvis kontroversiell, spesielt i sammenligning med begrepet "samfunns-DNA" som tidvis blir brukt om intracellulært DNA fra bulkprøver av organismer (Ruppert et al., 2019). I tillegg har inkluderingen av genetisk materiale fra avføring og mageinnhold blitt kritisert, selv om det i dag for det meste blir inkludert i definisjonen av miljø-DNA (Deiner et al., 2017). Strengt tatt indikerer samfunns-DNA tilstedeværelse av en organisme på et spesifikt sted og tidspunkt, mens DNA i en miljøprøve kan ha kommet fra et annet sted og være et ekko av tidligere tilstedeværelse. Å skulle lage et entydig skille mellom samfunns- og miljø-DNA er i praksis oftest umulig (Creer et al., 2016; Deiner et al., 2017). På grunn av dette har vi i her valgt å bruke en definisjon av miljø-DNA som inkluderer samfunns-DNA, slik det er vanlig i kontemporær faglitteratur.

Målet med miljø-DNA-studier er som oftest å skaffe til veie den mest mulig omfattende artslisten eller økologiske funksjonen organismene i et habitat har ved hjelp DNA-basert identifisering. Selv om dette er en relativt ny tilnærming til slike problemstillinger, har analyser av miljø-DNA allerede vist stort potensiale i biologisk overvåkning. De tradisjonelle metodene for å beregne artsmangfold og artsrikhet er både tidkrevende og ofte avhengige av en rekke spesialister for å få presise data. En analyse med miljø-DNA vil, når den er basert på et solid eksperimentelt oppsett, kunne utfylle de tradisjonelle metodene, i tillegg til å senke kostnadene og tidsrammen for analyser (Deiner et al., 2017; Ruppert et al., 2019). Det er så langt ikke mulig å erstatte de tradisjonelle økologiske metodene med analyser der en benytter miljø-DNA i marine miljø. En viktig grunn til dette er at

referansebibliotekene ikke er gode nok til å pålitelig skille og identifisere de vanligste marine taksa som i dag benyttes i marin overvåking (Weigand et al., 2019).

Miljøprøver kan målrettet undersøkes for tilstedeværelse eller fravær av en enkelt spesifikk organisme, eller man forsøker å lage en liste over alle tilstedeværende taksa i prøven. Hvis målet er å lete etter en spesifikk organisme, kan kvantitativ PCR av miljø-DNA benyttes (se for eksempel Muha et al., 2019). Alternativt kan man benytte en mer generell tilnærming for å gi en oversikt over hvilke taksa som er i en prøve. Dette kalles DNA-metastrekkoding (DNA metabarcoding) og kan defineres som en simultan DNA-basert identifisering av mange taksa i den samme miljøprøven. Denne metoden har blitt brukt lenge i mikrobiologi, men i senere år har den i økende grad også blitt benyttet til identifisering av marine makroorganismer (Taberlet et al., 2018; Ruppert et al.; 2019).

## BOKS 1: ORDFORKLARINGER/DEFINISJONER

**DNA-metastrekkoding (DNA metabarcoding):** DNA-basert identifisering av mange taksa funnet i samme (miljø)prøve ved bruk av parallell sekvenseringsteknologi (high throughput sequencing).

**Høygjennomstrømningsteknologier - HTS (High throughput sequencing):** Teknologi som kan sekvensere store mengder ulike DNA fragmenter samtidig i én reaksjon. Bioinformatikk brukes for å hente ut de sekvensene som er av interesse for studiet.

***In silico* analyse:** Modellering eller simulering av en prosess med datamaskin

**(inn)Samlingsprotokoll (Sampling protocol):** Metoder brukt til å finne, samle og transportere miljø-DNA til laboratoriet.

**Markør (Marker):** Et navngitt DNA-fragment. Kan, men må ikke, være en del av et gen.

**Metagenomikk:** Sekvensering av genomisk DNA i en prøve med flere taksa uten bruk av PCR.

**Metastrekkode (Metabarcodes):** En kort og taksonomisk informativ region av DNA som er flankert av to konserverte regioner der taksonomisk generelle primere kan feste seg under PCR.

**Miljø-DNA (Environmental DNA (eDNA)):** En kompleks blanding av genetisk materiale (DNA) ulike organismer i en miljøprøve.

**Miljøprøve (Environmental sample):** Hovedsakelig prøver av livsmedium slik som sediment, vann og luft, men også prøver direkte fra individer (for eksempel avføring, mageinnhold eller etterlatenskaper fra fødeinntak).

**Mål-DNA:** Spesifikk del av DNA som studeres og søkes etter

**PCR:** Polymerasekjedereaksjon (polymerase chain reaction). Oppformering av utvalgt DNA-fragment ved hjelp av primere og enzymet polymerase.

**PCR bias:** Feil i PCR-resultater som skyldes at primerne som er brukt oppformerer noen taksa bedre enn andre (og noen ganger ikke i det hele tatt!).

**PCR diagnostikk:** Her: Identifisering av arter eller høyere taksa ved bruk av artsspesifikke eller gruppespesifikke primere og PCR.

**Primer:** Et kort enkelttrådet DNA-fragment som binder seg til utvalgt område på mål-DNA under PCR. Nødvendig for at polymerase skal kopiere og oppformere utvalgt markør.

**qPCR:** Kvantitativ PCR. Metode for å detektere og kvantifisere PCR-produkt i sanntid.

**Referansebibliotek (Reference database:)** Et (ideelt sett) uttømmende, ikke-redundant, velbeskrevet, kuratert sett av sekvenser med tilhørende metadata som kan brukes til identifisering av taksa i en prøve.

**“Shotgun” sekvensering:** En metode for sekvensering, som i motsetning til primer-basert sekvensering finner nukleotidsekvenser for mange, mer eller mindre tilfeldige fragmenter av DNA, som deretter kan settes sammen til lengre sekvenser.

**Takson:** Et takson er en ikke-hierarkisk betegnelse på en gruppe organismer, og kan brukes for å omfatte art, slekt, familie, orden, rekke, osv.

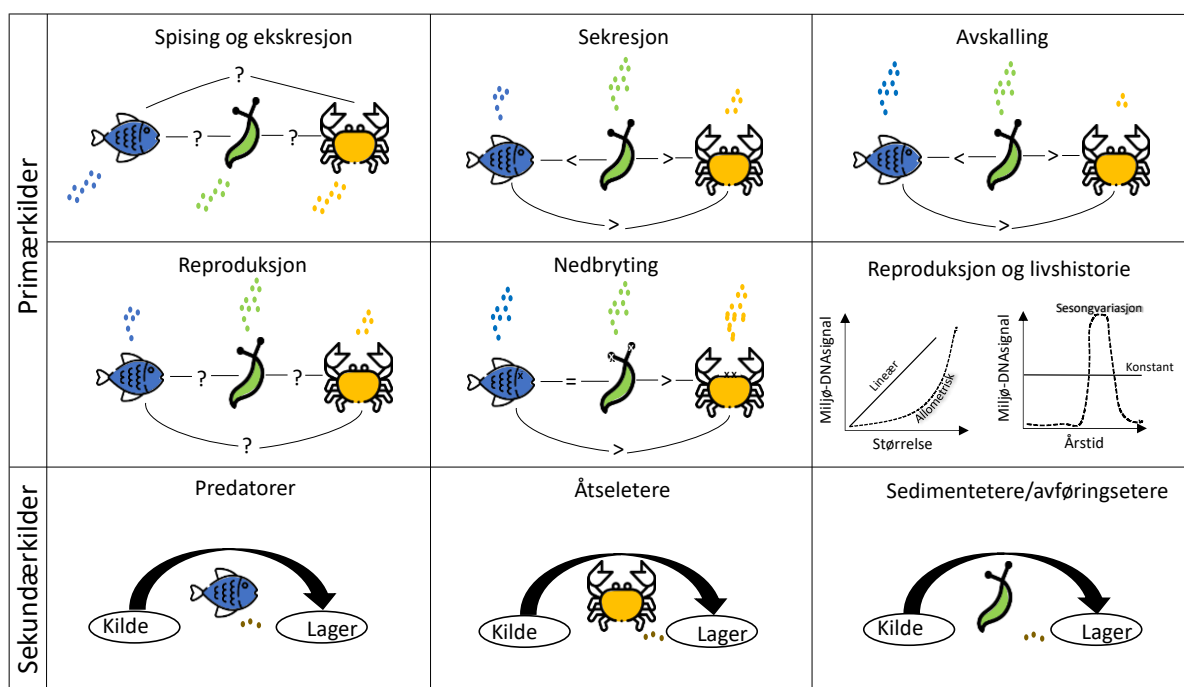
## 1.2 Marint miljø-DNA: kilder, fysisk tilstand og variasjon

### 1.2.1 Kilder til marint miljø-DNA

DNA i miljø slik som vann og sediment kan komme fra primære og sekundære kilder (Barnes & Turner, 2016; Figur 1). Primære kilder er DNA fra vev og celler som avsettes fra levende individer så vel som DNA fra nedbryting av organismer. DNA fra levende organismer kommer gjerne fra ekskresjon, sekresjon, avskalling og reproduksjon (Figur 1). Ettersom marine taksa har en ekstrem variasjon i taksonomi, morfologi og livshistoriestrategier, er det vanskelig å si hvilke primærkilder som er viktigst for marint miljø-DNA. Det er få studier som har kvantifisert den relative viktigheten av slike kilder både på tvers av taksonomiske grupperinger eller for spesifikke taksa. Ekskresjon og utsondringer er mest sannsynlig en svært viktig kilde for miljø-DNA fra en rekke ulike taksa i det marine miljø (Thomsen et al., 2012b). Reproduksjon er sannsynligvis også en viktig kilde til miljø-DNA siden mange marine taksa (spesielt virvelløse dyr) reproducerer ved å slippe millioner av kjønnsceller ut i vannsøylen (såkalte sprutere, "broadcast spawning"). Generelt kan vi også anta at marine virvelløse dyr som mangler et hardt eksoskjelett eller stivt skall (for eksempel en del bløtdyr, maneter, slimormer og børstemark) avgir mer DNA til miljøet gjennom sekresjon og avskalling enn for eksempel krepsdyr av tilsvarende størrelse (Figur 1.1). Ferskvannsorganismer med slimete overflater som amfibier og fisk har vist seg relativt enkle å detektere med miljø-DNA (Barnes & Turner, 2016), mens krepsdyr avsetter DNA til omgivelsene i mindre omfang sammenlignet med fisk og maneter. Dette støtter oppfatningen om ulike avsetningsrater fra dyr med et mykt ytre sammenlignet med de med et hardt ytre, men det er viktig å påpeke at alle beregnede avsetningsrater er svært upresise (Allan et al., 2020). Grove morfologiske trekk kan også påvirke nedbrytingen slik at bløte organismer og harde organismer av samme generelle masse brytes ned i forskjellige hastigheter. Morfologi, livshistorie, naturhistorie og fenologi påvirker ressursbruk og reproduksjon og vil avgjøre hvor og når de forskjellige mekanismene er den viktigste kilden til miljø-DNA. Variasjonen mellom ulike taksa og mellom forskjellige habitat og biologiske samfunn er derfor betydelig og vil påvirke hvordan vi kan fortolke romlig fordeling av miljø-DNA-signaler.

Sekundærkilder for marint miljø-DNA er fra DNA fra organismer som er blitt spist og fordøyd og som kommer ut av fødeorganismen med avføringen (Figur 1.1.) Siden DNAet har gått gjennom en fordøyelsesprosess vil det være svært degradert, og for det meste bestå av veldig små biter (Deagle et al., 2006). I mange tilfeller vil det relative bidraget fra sekundærkilder av miljø-DNA være minimalt sammenlignet med primærkilder. Allikevel er de viktige å ta med fordi en del molekylære metoder er så sensitive at de kan registrere slike små mengder (se seksjon 1.3). Sekundært miljø-DNA er også et eksempel på hvordan en art oppdaget med miljø-DNA ikke trenger å komme fra en organisme som har vært i området miljøprøven er hentet fra. Opphavet til arten er derimot, avhengig av hvilken organisme som spiste den og dens adferdsøkologi.

Valg av eksperimentelt design for oppdagelse av bestemte arter, og fortolkning resultatene man får, er avhengige av en god forståelse av hvor DNA i marine miljø kommer fra. Kunnskap om sammenhengen mellom dannelsen av miljø-DNA, dets egenskaper, livshistorie og økologi i forhold til miljøsykluser, samt variasjonen av disse mellom taksa er svært viktig både for eksperimentelt design og fortolkning av resultater.



**Figur 1.1:** Primær- og sekundærkilder til miljø-DNA i marint miljø på tvers av marine taksa med ulik generell morfologi (fisk, snegl og krepsdyr). Primærkilder: Gitt samme biomasse er den hypotetiske relative forskjellen i avsatt DNA fra organismene vist (<, >, =) fra antagelser basert på enkle morfologiske og fysiologiske forskjeller (hardt skall, slimproduksjon, osv). Rutene til høyre og i midten viser veldokumenterte biologiske egenskaper som for eksempel allometrisk eller lineær sammenheng med fruktbarhet og reproduksjon, osv., og dennes påvirkning på avsetning av miljø-DNA. Tilsvarende allometrisk og fenologisk variasjon vil mest sannsynlig eksistere på tvers av alle primærkilder til miljø-DNA, en variasjon som også vil være avhengig av taksonets natur- og livshistorie. Sekundærkilder: Sekundærkilder til miljø-DNA kommer fra DNA i avføringen til predatorer, åtseletere, sedimentspisere, vegetarianere og de som spiser avføring.

### 1.2.2 Fysisk form, tids-, romlig- og substrat-variasjon av marint miljø-DNA

DNA i en miljøprøve kan være intracellulært eller ekstracellulært. Forskjellen mellom disse to typene kommer av måten primærkilder for miljø-DNA avsetter celler til miljøet og hvordan disse brytes ned og frigir DNA. Siden miljø-DNA fra sekundærkilder allerede har gått gjennom et fordøyelsessystem, vil de i all hovedsak være i ekstracellulær form. Kun noen få studier skiller mellom disse to fysiske formene ved analyser av marint miljø-DNA. Det er sannsynlig at begge former fanges opp av de fleste metodene som brukes for å isolere DNA fra miljøprøver (Sassoubre et al., 2016), selv om dette til sist vil avhenge av prøvesubstratet (for eksempel vann eller sediment) og spesifikke detaljer i metodene (porestørrelse på filter brukt med vannprøvene osv.). I ferskvannssystem ser det ut som at miljø-DNA i hovedsak eksisterer i løste celler eller celleorganeller som har DNA (for eksempel mitokondrier) (Turner et al., 2014). Dette er sannsynlig også gjeldende for marine systemer. I stedet for å fokusere på relativ viktighet av primær- eller sekundærkilder og intra- eller ekstracellulære former for DNA, har de fleste studier av marint miljø-DNA fokusert på generelle avsetningsrater innen og mellom forskjellige taksa, samt hvilke faktorer som påvirker holdbarheten (eller egentlig nedbrytingen) av DNA i marine miljø.

Hvor raskt DNA avsettes og brytes ned er viktig for deteksjon av arter basert på marint miljø-DNA. En oppsummering av studier som beskriver dette er gitt i Tabell 1.1, men det er vanskelig å generalisere gitt den store variasjonen av eksperimentelle forhold og laboratorie- og analysemetoder som er brukt. Det er vanskelig å skaffe til veie presise anslag på avsetningsrater, noe som begrenser muligheten for sammenligninger mellom individer og taksa i et og samme eksperiment, og umuliggjør sammenligning på tvers av studier. Selv om høyere biomasse ser ut til å gi høyere avsetningsrate innen et takson (Tabell 1.1.), blir dette lett tilslørt av størrelses- eller

årsklasser. I en sammenligning av DNA-avsetninger mellom voksen og juvenil ferskvannsfisk viser Maruyama et al. (2019) at hvis man tar hensyn til masse, har mindre individer en litt høyere avsetningsrate enn større individer av samme art. Dette indikerer at metabolismen også kan ha en innvirkning på avsetningsraten. Signalet fra miljø-DNA brytes ned eksponentielt med tiden etter at målindividet er tatt bort fra prøveakvarier, likevel varierer halv-livs estimater for DNA (nedbrytingsrate) fra 1 til 71 timer (Tabell 1.1). Selv om sammenhengen mellom DNA-nedbryting og abiotiske variabler (temperatur, konduktivitet og oppløst oksygen) er vist i flere akvariestudier, er viktigheten av dette i felt uklart, spesielt siden innsamlingsmetodikken varierer (for eksempel bruk av filtrert og UV-sterilisert vann versus kun filtrert vann i akvariene). Ved hjelp av radioaktiv sporing er det vist at den viktigste abiotiske variabelen som påvirket variasjon i oppløst ekstracellulært DNA i et pelagisk system var fosfatbegrensinger. Dette antyder at mikrobiell utnyttelse av miljø-DNA er en organisk kilde til fosfatsubstrat (Salter, 2018). Selv om abiotiske variabler ofte er et hovedfokus i eksperimenter siden de er relativt enkle å kontrollere, viser Salter (2018) at mikrobiell-molekylære sesong-interaksjoner også er en sannsynlig hovedårsak til variasjoner av miljø-DNA i felt. Abiotiske, fysiske transportprosesser som nedfall, diffusjon og adveksjon vil påvirke både tidsmessig og geografisk variasjon av DNA-avsetning i tillegg til de biotiske og abiotiske faktorene (Barnes & Turner, 2016).

I motsetning til det sterke fokuset på kontrollerbare miljø i studier av miljø-DNA variasjon over tid, er de fleste studier som undersøker geografisk variasjon innen marint miljø-DNA feltbaserte. På grunn av sammenhengende habitat og de sterke fysiske kreftene fra tidevann, havstrømmer, vind og bølgeaktivitet kunne en forvente at marint miljø-DNA er godt blandet og homogent over store avstander. Det viser seg imidlertid at marint miljø-DNA har sterk romlig struktur innen sammenhengende habitat på overraskende små skalaer. Dette gjelder både horisontalt (Port et al., 2016; O'Donnell et al., 2017; Jeunen et al., 2019; Stat et al., 2019; Gold et al., 2020; West et al., 2020) og i dypdesjikt (Andruszkiewicz et al., 2017a; Yamamoto et al., 2017; Lacoursiere-Roussel et al., 2018; Jeunen et al., 2020). Samtidig ser vi at det er minimal effekt av sykliske vannbevegelser (for eksempel tidevann: Kelly et al., 2018; Lafferty et al., 2020), noe som leder oss til å konkludere at miljø-DNA i vann ser ut til å være lokalt forbundet til stedet og vannmassene det er samlet fra (Kelly et al., 2018). Mens disse studiene tydelig viser en romlig struktur på marint miljø-DNA vet vi fremdeles lite om hvordan og i hvilke skalaer dette henger sammen med organismer i sine naturlige samfunn. Studier som sammenligner miljø-DNA direkte med andre overvåkningsmetoder (for det meste på fisk - se Thomsen, et al., 2012a; Thomsen et al., 2016; DiBattista et al., 2017; Shelton et al., 2019; Stat et al., 2019) gir blandet resultat på sammenlignbarheten mellom metodene. Mens resultater basert på miljø-DNA ofte viser et tilsvarende eller større artsmangfold sammenlignet med undersøkelser basert på tradisjonell innsamling, er det flere tilfeller der vanlige og tallrike organismer identifisert med andre metoder ikke registreres med miljø-DNA (DiBattista et al., 2017; Stat et al., 2019; Alexander et al., 2020). I miljø-DNA studier brukes ofte uttrykket "site" (sted) tvetydig, og den spesifikke bruken avhenger av romlig design for en gitt studie. Hvis en studie har samlet miljø-DNA fra et spesifikt "sted" og signalet knyttes til tilstedeværelse av en organisme, er det uklart i hvilken romlig skala den mulige organismen vil kunne forventes å finnes (Hansen et al., 2018). Veldig få studier har undersøkt dette i detalj. Ved å samle vannprøver direkte etter å ha observert individer fant Baker et al., (2018) at spekkhugger-DNA kunne måles opp til to km unna og to timer etter første observasjon. Ved å ha fisk i bur og så ta prøver i en geografisk og tidsmessig matrise under og etter at burene stod ute, fant Murakami et al., (2019) at miljø-DNA fra fisk som regel kunne spores i en 30 m radius fra burene og innen en time etter borttagning (men det var også prøver som var samlet nærmere enn 30 m og som ikke inneholdt miljø-DNA av fisken). Vår forståelse av hvordan variasjonen i miljø-DNA fra primærkilder (for eksempel utslipp/utsondringer, sekresjon, avskalling av celler og reproduksjon) påvirker sammenhenger i romlige miljø-DNA er enda mindre, men det er tydelig at sesongvariasjoner i biologisk aktivitet er knyttet til en del

**Tabell 1.1**

Oppsummering av studier av DNA-avsetning og -nedbryting fra marine taksa i vannprøver (tilpasset fra Allen et al., 2020). Kun funn som er relatert til avsetning og nedbryting av marint miljø-DNA er inkludert, selv om en del av studiene inkluderte flere aspekter.

Studie (referanse)	Beskrivelse/Habitat* {breddegrad}+ (Molekylær metode)	Taksa	DNAavsetning /nedbrytings-rater	Dataoppsummeringer / undersøkte variabler	Hovedfunn
Thomsen et al., (2012a)	Akvariebasert, temperert kyst {56°N} (qPCR)	Actinopterygii	Nedbryting	Kopier	- Eksponensiell nedbryting av miljø-DNAsignal med tid - DNA half-life estimater: 71 timer
Sassoubre et al., (2016)	Akvariebasert, temperert kyst {37°N} (qPCR)	Actinopterygii	Avsetning Nedbryting	Pg/time Pg/time/g Pg/time/individ	- Hvordan data blir oppsummert endrer rangeringen av avsetningsraten - Tilstedeværelse av flere arter påvirker ikke avsetningsraten - Eksponensiell nedbryting av miljø-DNAsignal med tid - DNA half-life estimater: 7-13 timer
Andruszkiewicz et al., (2017a)	Akvariebasert, temperert kyst {41°N} (qPCR, metastrekkoding)	Actinopterygii	Nedbryting	Pg/ml Soleksponering (overflate el. dyp) Taksa tilstede i multitaksjonanalyse	- Eksponensiell nedbryting av miljø-DNAsignal med tid - Eksponering til sollys påvirker ikke nedbrytingsrate - Tilstedeværelse av taksa i flertaksjon-analyse avhengig av tid men ikke av eksponering til sollys - DNA half-life estimater: 18 timer
Jo et al., (2017)	Akvariebasert, temperert kyst	Actinopterygii	Nedbryting	Relativ konsentrasjon (kopier/2µL i hver reaksjon) DNA fragment størrelse	- Eksponensiell nedbryting av miljø-DNAsignal med tid - Større DNAfragment se rut til å ha høyere nedbrytingsrater sammenlignet med kortere fragment - DNA half-life estimater: 7-16 timer
Minamoto et al., (2017)	Akvariebasert, temperert kyst {35°N} (qPCR)	Scyphozoa	Avsetning & Nedbryting	Kopi/time/individ	- Avsetningsrate varierer sterkt mellom individer - DNA half-life estimater: 21 timer
Sigsgaard et al., (2017)	Bøtte, Subtropisk {26°N} (qPCR)	Chondrichthyes	Nedbryting	Kopier/L Soleksponering (sol vs. skygge)	- Eksponensiell nedbryting av miljø-DNAsignal med tid - Sunlight exposure did not affect decay rate - DNA half-life estimates: 16-19 hrs
Weltz et al., (2017)	Akvariebasert, temperert kyst {42°N} (qPCR)	Chondrichthyes	Nedbryting	Relativ konsentrasjon (ng/µL i hver reaksjon) DO (oppløst oksygen)	- Eksponensiell nedbryting av miljø-DNAsignal med tid - Lavere nedbrytingsrate ved lavere oppløst oksygen (DO) - DNA half-life estimates: 35-63 timer
Collins et al., (2018)	Akvariebasert, temperert men med kystvann og offshore feltlokalteter {50°N} (qPCR)	Actinopterygii, Malacostraca	Nedbryting	Kopier/L Årstid Habitat (kyst, offshore & blandet) pH -konduktivitet (salinitet) -Bakgrunnskonsentrasjon av DNA	- Eksponensiell nedbryting av miljø-DNAsignal med tid - Høyere nedbrytingsrater i kystvann sammenlignet med offshore-vann. - Sammenheng mellom konduktivitet og DNA nedbryting, men ikke pH eller bakgrunnskonsentrasjon av DNA - DNA half-life estimater: 21-45 timer



**Tabell 1.1**

Oppsummering av studier av DNA-avsetning og -nedbryting fra marine taksa i vannprøver (tilpasset fra Allen et al., 2020). Kun funn som er relatert til avsetning og nedbryting av marint miljø-DNA er inkludert, selv om en del av studiene inkluderte flere aspekter.

Studie (referanse)	Beskrivelse/Habitat* {breddegrad}+ (Molekylær metode)	Taksa	DNAavsetning /nedbrytings-rater	Dataoppsummeringer / undersøkte variabler	Hovedfunn
<b>Cowart et al., (2018)</b>	Akvariebasert Antarktisk vann {65°S} (qPCR)	Actinopterygii	Nedbryting	-Kopier/L	- Eksplosjonsmessig nedbryting av miljø-DNA-signal med tid - DNA half-life estimater: 71 timer
<b>Jo et al., (2019)</b>	Akvariebasert, temperert kyst {35°N} (qPCR)	Actinopterygii	Avsetning & Nedbryting	-Kopi/time -Kopi/timer/g -Vanntemperatur -Biomasse	- Høyere biomasse = høyere avsetnings- og nedbrytningsrate - Høyere temperatur = høyere avsetnings- og nedbrytningsrate - Eksplosjonsmessig nedbryting av miljø-DNA-signal med tid - DNA half-life estimater: 1-19 timer
<b>Allan et al., (2020)</b>	Akvariebasert, temperert kyst {41°N} (qPCR)	Actinopterygii, Malacostraca, Scyphozoa	Avsetning & Nedbryting	-Pg/time -Pg/time/g -Pg/time/individ	- Hvordan data blir oppsummert endrer rangeringen av avsetningsraten - Forskjellige taksa har sannsynlig forskjellige avsetningsrater, hovedforskjellen ligger mellom Malacostraca og de andre - Eksplosjonsmessig nedbryting av miljø-DNA-signal med tid (høyere orden modeller er bedre egnet enn enkel eksponensiell modell) - Høyere temperatur = høyere nedbrytningsrate men variabelt mellom taksa (ingen sammenheng i Scyphozoa) - DNA half-life estimater: 5-52 timer
<b>Kutti et al., (2020)</b>	Akvariebasert, temperert kyst {60°N} (qPCR)	Anthozoa	Avsetning	-Relativ konsentrasjon (kopier /μL i hver reaksjon) -Biomasse	- Høyere biomasse = høyere miljø-DNA konsentrasjon
<b>(Wood et al., 2020)</b>	Akvariebasert, temperert kyst {37°S} (ddPCR)	Polychaeta, Ascidiacea	Nedbryting	-kopier/ml av både eDNA and eRNA	- miljø-RNA kunne spores selv om det var tilstede i færre kopier/mindre volum enn miljø-DNA - Eksplosjonsmessig nedbryting av miljø-DNA og miljø-DNA-signal med tid - Ingen tilsynelatende forskjell i nedbrytningsratene mellom DNA og RNA - DNA half-life estimater: 2-6 timer

\* På grunn av den store variasjonen i eksperimentelle oppsett (for eksempel filtrert, UV sterilisert tankvann, ubehandlet tankvann, temperaturkontrollert/ikke kontrollert osv.) er habitat vurdert i brede kategorier av generell klimasone og kyst/ offshore osv. + breddegrad som indikasjon på hvor studien ble utført (hvor organismene og kildevannet til akvariene ble samlet)

primærkilder (for eksempel gytesesong), og dermed vil påvirke romlige variasjoner (se de Souza et al., 2016 for et ferskvannseksempel). Et fellestrekk om årsaker til romlig variasjon går igjen i flere studier, men ettersom det ofte er grunnleggende forskjeller i studiedesign, metoder, måltaksa og målt mangfold, er det umulig å trekke endelige konklusjoner. Skalaen på romlig struktur som blir observert er avhengig av konteksten til det studerte habitatet, studiedesignet og de molekylære metodene som har blitt brukt (se ovennevnte publikasjoner), og de fleste studiene av tids- og romlig variasjon av marint miljøDNA fokuserer på beinfisk. På bakgrunn av dette er det vanskelig å integrere kunnskapen som finnes om variasjon i kilder til miljø-DNA og tidsvariasjoner i miljø-DNA for å tolke signaler på romlig utbredelse av DNA i marine miljø. Kan man for eksempel si at hvis DNA fra forskjellige organismegrupper - som fisk og krepsdyr - er funnet i samme prøven, så har de har vært tilstede i miljøet i samme tidsperioder eller i de samme større romlige områdene? I tillegg til kilde, tidsmessig og romlig variasjon av miljø-DNA-signalet vil substrat-type som DNA er hentet fra (for eksempel vann, sand eller mudder) i stor grad påvirke resultatene (Koziol et al., 2019). Flere studier viser at miljø-DNA fra vann og sediment fra samme lokalitet og til samme tid registrerer ulike organismsamfunn (Koziol et al., 2019; Holman et al., 2020). Koziol et al. (2019) viser også at det er forskjeller mellom registrerte organismsamfunn i planktonprøver, vekstplater, sediment og vannprøver.

## 1.3 Introduksjon til metode

For å forstå mulig bruk og begrensninger av miljø-DNA i overvåkning og forvaltning av marine miljø må en ha grunnleggende kunnskap om de molekylære analysemetodene og hvordan disse kan påvirke resultatene. Som vist i Figur 1.2, ligger en stor del av arbeidet og de kritiske avgjørelsene i slike studier i fasene som inneholder molekylært laboratoriearbeid og bioinformatiske analyser. Dette er annerledes i tradisjonell overvåkning der den største delen av arbeidet foregår i felt og i våt-laboratorier. Vi gir derfor en kort introduksjon til de vanligste metodene som brukes for å analysere miljø-DNA i marine økosystem. Dette er basert på tilnærminger med polymerasekjedereaksjon (PCR) som PCR diagnostikk og metastrekkoding, og metagenomikk. Denne introduksjonen er en generell innføring i vanlige konsepter som vil bli videre diskutert i forbindelse med spesifikk bruk i seksjon 4 og inneholder de aspektene ved prøveanalyser som etterfølger DNA-ekstraksjon.

### 1.3.1 PCR-baserte tilnærminger

PCR-baserte metoder kan deles opp i to grunnleggende typer: (1) der PCR blir brukt på ekstrahert miljø-DNA og produktet brukes til diagnostikk for å indikere tilstedeværelse, og mulig kvantifisering, av DNA til en spesifikk art eller høyeretaksjon av interesse ("PCR diagnostikk"), eller (2) der PCR blir brukt på ekstrahert miljø-DNA og produktet blir sekvensert ved hjelp av parallell sekvenseringsteknologi (high-throughput sequencing), med en etterfølgende bioinformatisk analyse og taksonomisk identifikasjon ("DNA-metastrekkoding": Figur 1.2). PCR oppformerer spesifikke målområder av DNA ved at en "PCR-primer" binder seg til komplementært område på mål-DNA og gjør det mulig for enzymet DNA polymerase å kopiere målområdet gjennom gjentatte PCR-sykler.

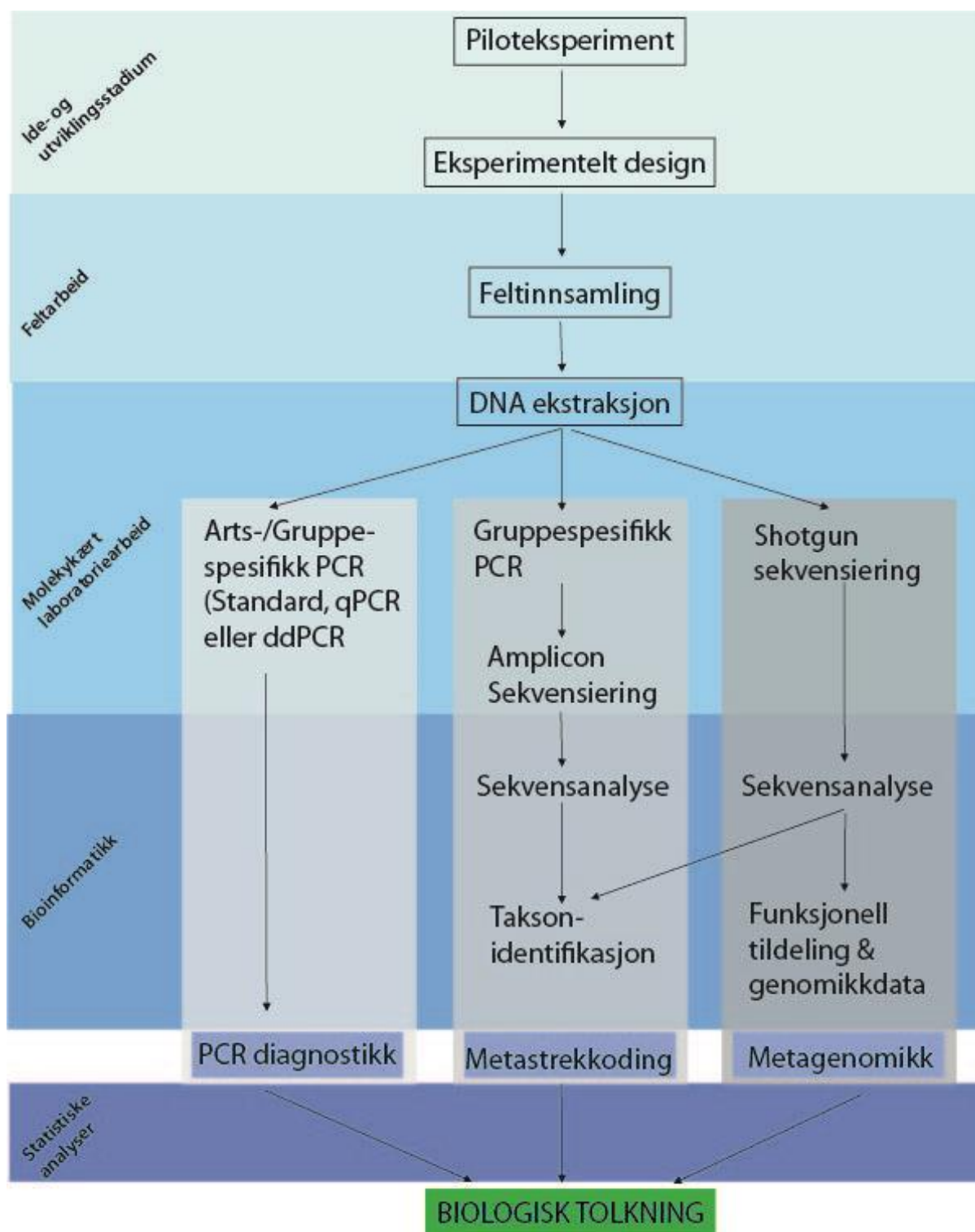
Det er flere egenskaper som er felles for PCR-baserte tilnærminger. I forhold til bruk på miljø-DNA, er PCR-analyser generelt brukt for å oppformere små fragmenter av lett tilgjengelig DNA, som for eksempel mitokondrielt DNA (mtDNA). MtDNA finnes i ti til tusentalls kopier for hver eukaryote celle avhengig av takson, vevstype og individuelle aspekter slik som alder (Cole, 2016). Nukleært ribosomalt DNA (rDNA) er også et populært mål i eukaryote prøver, blant annet fordi det har mange kopier i hvert genom. På grunn av den hurtige nedbrytingen av genomisk DNA i miljøet, er DNA fragmentet som oppformerer i miljø-DNA-studier kort og fra en del av genomet som finnes i mange

kopier. På den måten kan DNA som er tilstede bli oppformert selv om det i utgangspunktet har lav konsentrasjon og er svært nedbrutt. PCR analyser ved bruk av PCR-primere er designet til å være artsspesifikke eller gruppespesifikke (Figur 1.3). Det er derfor viktig å huske at det kan være vanskelig å finne godt fungerende felles primere for evolusjonært fjernt beslektede grupper siden disse ofte viser ulike DNA sekvenser i området der primerne skal binde seg. En primer festes lettere til et område som passer bedre med primerens sekvens. (Figur 1.3). Dette kan føre til at én eller noen få DNA-sekvenser vil oppformeres mer i forhold til andre, eller i verste fall at DNA fra enkelte arter ikke oppformeres. Dermed kan analysen føre til falske negative eller forskyvede resultater. Dette kalles “primer-bias” og kan forskyve resultatene fra DNA-metastrekkoding og gjøre det vanskelig å karakterisere eller kvantifisere arter i et samfunn, spesielt når det består av mange fjernt beslektede grupper.

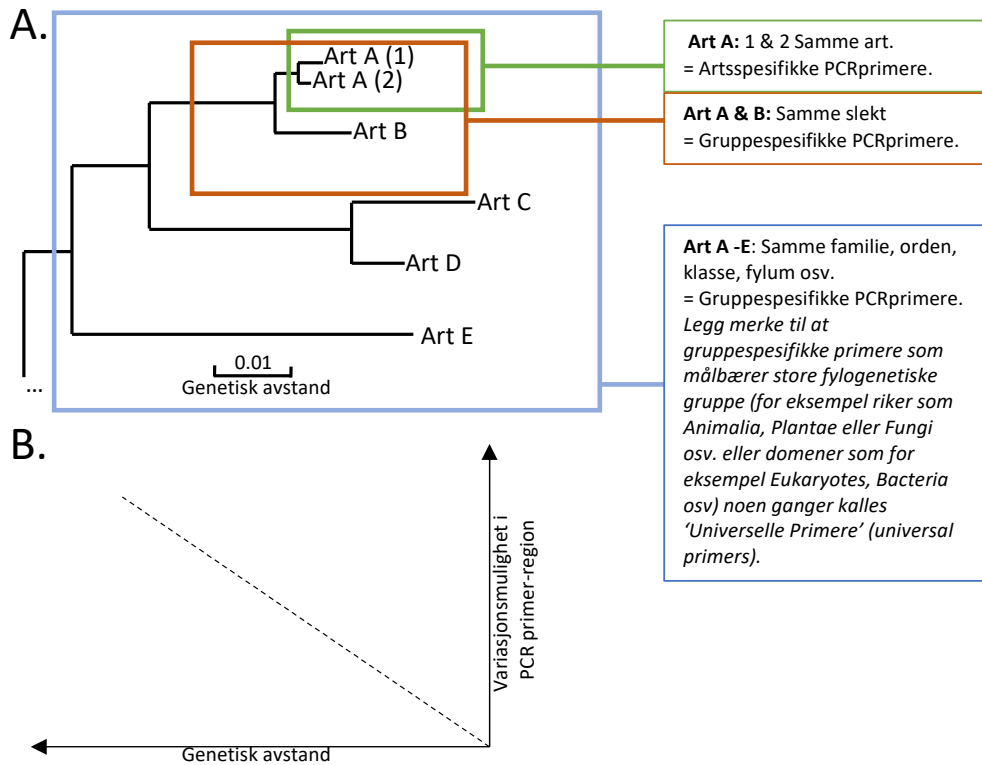
### 1.3.1.1 PCR-baserte tilnærminger - DNA-metastrekkoding

DNA-metastrekkoding er parallell sekvensering av resultatet fra PCR av der gruppespesifikke PCR-primere har blitt brukt til å oppformere en bestemt DNA-region i prøven. En ideell metastrekkodingsregion har følgende egenskaper (tilpasset fra Taberlet et al., 2018): (1) er av en lengde som passer med sekvenseringsteknologi og mål for studien, (2) viser stor variasjon mellom arter (eller lavere taksonomisk nivå) og er flankert av to sterkt konserverte regioner som kan fungere som bindested for PCR-primere, (3) PCR-primer regioner er 100% konservert (ikke endret) for målgruppen slik at primerne vil binde seg perfekt til komplementære sekvenser i alle måltaksa uten effektene av primer-bias. Samtidig bør de være tilstrekkelig forskjellig fra taksa som ikke tilhører målgruppen, og (4) er lokalisert i en genomisk region som er gjennomgående godt dekket i eksisterende referansedatabaser. I realiteten vil en valgt metastrekkodingsregion sjelden inneha alle egenskapene, og ulike kompromisser gjøres også for de beste alternativene. For eksempel er de beste tilgjengelige referansebibliotekene for flercellede dyr (metazoa) basert på en del av det mitokondrielle genet cytochrome c oxidase underenhet 1 (COI). Allikevel er ikke COI alltid ideelt som metastrekkodingsmarkør fordi det er et proteinkodende gen og derfor har stor variasjon normalt for hvert tredje nukleotid (på grunn av hvordan den genetiske koden fungerer). Dermed er det høy sannsynlighet for variasjon i regionene der PCR-primere fester seg, spesielt for fjernt beslektede organismegrupper (Deagle et al., 2014; Taberlet et al., 2018). I mange tilfeller er det derfor ikke tilstrekkelig å benytte én genetisk markør for å få et godt bilde på artssammensetningen i en miljøprøve, og det anbefales at metastrekkodingsanalyser benytter to eller flere markører også for å redusere muligheten for falske negativer (Alberdi et al., 2018; Eble et al., 2020).

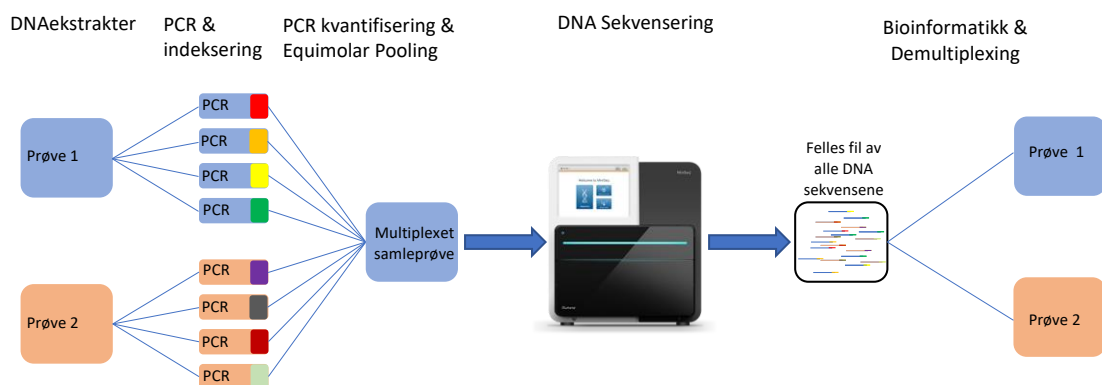
Den grunnleggende arbeidsflyten i alle metastrekkodingsprosjekt er illustrert i Figur 1.4. Et nøkkelprikk er å bruke flere PCR-replikater for hver markør og hver prøve slik at man minimerer den stokastiske effekten i PCR (Figur 4). Fordi sekvensering av mange prøver skjer samtidig på hvert enkelt sekvenseringsløp, blir PCR-produkt fra individuelle prøver kvantifisert og kombinert likt (multiplexing) i en enkelt meta-prøve. Derfor må prøvene, ideelt sett hver enkelte PCR-replikat, bli indeksert med små unike DNA-sekvenser slik at sekvensene fra et sekvenseringsløp kan kobles til den opprinnelige prøven eller PCR-replikat gjennom bioinformatiske analyser (Figur 4.). Se seksjon 4 for en mer detaljert beskrivelse av hovedstegene, rutine og “best practice” for kvalitetskontroll i laboratorie- og bioinformatiske analyser.



Figur 1.2: Arbeidsflyt for felt-innsamlede miljø-DNA studier. Store steg (blå bokser, diagonal tekst til venstre) og de tre brukte laboratorietilnærmingene (grå bokser) fra beskrivelse av prosjekt til analyse av resultater. Shotgun sekvensering (høyre grå boks) kan gi forskjellig resultat (taksonomisk og funksjons-genomikk) på bakgrunn av hvilken bioinformatiske tilnærming som blir brukt. Tilpasset fra Taberlet et al., (2018).



**Figur 1.3:** Hvordan fylogeni påvirker PCR-strategier for observasjon av DNA i blandede prøver (for eksempel miljø-DNA) når en bruker PCR-baserte metoder. A: hypotetisk fylogeni og forskjellige PCR-strategier (fargete bokser) som målbærer taksa på forskjellige hierarkiske nivå i fylogenen. B: forholdet mellom fylogenetisk hierarki, genetisk distanse og potensiell sekvens-variasjon i PCR-primer regionene. Jo høyere opp i fylogenetisk hierarki målgruppen er, jo større parvis genetisk distanse mellom måltaksa og derfor jo større sannsynlighet for ikke-perfekte koblinger mellom måltakson DNA og PCR-primere, noe som potensielt fører til problemer med feilaktige negative resultater, eller resultater påvirket av primer bias.



**Figur 1.4:** Forenklet arbeidsflyt for metastrekkoding. De grunnleggende nøkkelstegene er felles for alle tilnærmingene i metastrekkoding. DNA-sekvenser må kunne bli tilegnet individuelle prøver, eller helt individuelle PCR-replikater for hver prøve (farger). For å gjøre dette må prøver (eller individuelle PCR-replikater) være unikt indeksert (helst på begge ender av PCR-oppformeringene) under eller etter PCR-prosessen, med korte DNA-sekvenser (typisk >5-10 nukleotider lange). Disse unike indeksene brukes så til å tilegne sekvenser tilbake til prøver (eller PCR-replikater) gjennom bioinformatiske analyser.

### 1.3.1.2 PCR-baserte tilnærmelser - PCR diagnostikk

For å kunne gjenkjenne og måle tilstedeværelse/fravær og nøyaktig kvantifisere mengden DNA fra et spesifikt takson i en miljø-DNA-prøve brukes ofte PCR diagnostikk. Analysene er designet for å dokumentere arter, men de samme prinsippene kan også brukes høyere opp i det systematiske hierarkiet (for eksempel på slekt) hvis det er mer interessant og det er mulig å verifisere oppsettet for alle artene i gruppen. PCR-diagnostikk gjøres ved hjelp av to litt ulike teknikker som begge bruker fluorescerende DNA-merkelapper sammen med sensitive optiske instrument som følger oppformeringene i PCR i sanntid. Kvantitativ PCR (qPCR) er i vanlig bruk (Tabell 1.1) og er en solid indikasjon på tilstedeværelse/fravær når analysene har blitt verifisert og optimalisert, men har blitt kritisert for å ikke gi en god absolutt kvantifisering av DNA-mengden i en prøve. Dette er på grunn av at standardkurver brukes i interpolasjon, og i tillegg er det variasjoner som i laboratorieprosedyrer og individuelle PCR-løp som kan påvirke sluttresultatet (Bustin, 2010). Droplet digital PCR (ddPCR) fordeler prøve-DNA på titusener av individuelle små-dråper som går gjennom PCR-syklene samtidig. Andel positive dråper leses av optisk og brukes i beregningen av absolutt mengde DNA-molekyl i prøven. Analysemetoden har ekstremt høy sensitivitet, med mulighet til å gjenkjenne så små deler som et enkelt molekyl for hver dråpe, og tar også bort behovet for en standardkurve (Eble et al., 2020). Felles for begge teknikkene er at de valgte PCR-primere kun oppformerer DNA fra mål-taksonet, og at de gjør dette så effektivt at de kan gjenkjenne mål-DNA selv i lave konsentrasjoner. PCR-primernes spesifisitet sikrer at det ikke blir registrert falske positive, og optimalisert sensitivitet er viktig for å redusere eksperimentelle artefakter som kan introdusere falske negative. I tillegg til behovet for kontrollerte, optimaliserte og standardiserte laboratorieprosedyrer for verifisering av analysene (spesifisitet og sensitivitet) og sikring av repeterbarhet, er PCR-diagnostikk også avhengig av gode referansedatabaser både for å kunne konstruere optimale primere og for å teste spesifisiteten *in silico*.

### 1.3.2 Metagenomikk

I metagenomikk sekvenseres tilfeldig DNA fra en blandet prøve (kjent som “shotgun sequencing”), istedenfor å først oppformere en ønsket del av DNA ved hjelp av PCR (Glenn, 2011). De vanligste teknologiske plattformene for parallell DNA-sekvensering (“high throughput DNA sequencing techniques”) som benyttes i miljø-DNA studier er alle “kortleste” (f.eks. Illumina). Det er derfor nødvendig å klippe lengre DNA til mer passende størrelsesklasser. Slik klipping er ikke påkrevd hvis “Single Molecular, Real time” (SMRT) sekvenseringsteknologier som for eksempel Nanopore eller PacBio Hi-Fi sekvensering blir brukt. Man bør merke seg at SMRT-teknologier sjelden er brukt i miljø-DNA studier, og de eneste eksemplene vi vet om er i forbindelse med DNA-metastrekoding (Truelove et al., 2019; Egeter et al., 2020). På samme måte som metastrekoding, krever metagenomikk indeksering av individuelle prøver slik at sekvensene kan bli tilordnet sine spesifikke prøver. Den store forskjellen ligger i de bioinformatiske analysene, der metagenom-data i metastrekoding er sekvenser, mens det i metagenomikk er sammenhengende sekvenser av hele seksjoner av genomer (“contigs”). En hovedingrediens i metagenomisk bioinformatikk, som ikke gjøres i metastrekoding, er dyptgående analyser av hver individuelle prøve for å “sy sammen” sammenhengende DNA-sekvenser fra artene i prøven til hele contigs. Som vist i Figur 2 kan metagenomikkdata gi både taksonomisk informasjon fra en prøve i tillegg til funksjonell informasjon ved at man analyserer hvilke gener som er tilstede. Studier av metagenomikk i marint miljø-DNA utføres nesten kun i mikrobiell økologi (Sunagawa et al., 2015, 2020). En studie fra Antarktis har brukt metagenomikk-teknikk til å undersøke makrofaunasamfunn, og resultatene er lovende (Coward et al., 2018). Metagenomikkmetoder har den klare fordel at de ikke lider under noen primer-bias fra PCR, og kan således gi et mer presist bilde på ulike arters biomasse og eventuelt abundans. Men de har behov for mer ekstensive referansebibliotek for identifisering ettersom større deler av genomet må være kartlagt for artene i prøven om metoden skal være effektiv og presis, og det er et problem med støy fra mikrober når målgruppen er makroorganismer.

## 1.4 DNA referansebibliotek

DNA referansebibliotek spiller en svært viktig rolle. Først og fremst i den molekylære identifiseringsprosessen, men også for utvikling av analyser og for verifisering av metoder. De nasjonale og internasjonale initiativene for å utvikle åpne referansebibliotek for DNA strekkoder (f.eks. BOLD) har bidratt enormt til både metodeutvikling og vår forståelse av det biologiske mangfoldet i marine miljø. Samtidig har studier vist at metastrekkoding av marint liv basert på en markør (f.eks. COI) ikke er tilstrekkelig om en ønsker et best mulig bilde av komplekse artssamfunn (Morey et al., 2020). På bakgrunn av dette bør DNA-referansebibliotek for identifisering av marine arter med miljø-DNA ha et bredere fokus enn kun formelt aksepterte strekkoderegioner. Med raskt synkende priser på DNA-sekvensering kan metoder som “genome skimming” (grunne shotgun sekvenseringer av DNA-ekstrakter fra referansemateriale; Coissac et al., 2016) produsere hele organellegenomer så vel som høy-kopi nukleære regioner uten enorme ekstrakostnader. Slike referansebibliotek bør være innenfor rekkevidde for lokale prosjekter fokusert på bruk av marint miljø-DNA til beskrivelse og overvåkning av utvalgte organismegrupper (Eble et al., 2020). Slike tilnærminger vil komplimentere og ikke konkurrere med DNA-strekkoding, ettersom også standardiserte markører kan hentes ut av sekvenserte organellegenomer og gjøres tilgjengelig i åpne databaser for komparativ bruk i større skala.

## 2. TILGJENGELIG MATERIALE OG DATA FOR NORSKE MARINE TAKSA

Gode referansebibliotek er en forutsetning for at de bioinformatiske analysene av sekvenser fra miljø-DNA skal kunne kobles mot navngitte taksa. Dette vil knytte det genetiske signalet opp mot all økologisk, geografisk og livshistorie-informasjon vi har om et takson. Uten representasjon i referansebiblioteket vil resultatene fra den genetiske analysen kun være et antall taksa av ubestemt hierarkisk nivå (art, slekt, familie, osv). Vår taksonomiske kunnskap utvikler seg hele tiden. Nye arter blir stadig beskrevet, og dette er spesielt sant for det marine miljø, der flere habitat har vært, og fremdeles er, vanskelig tilgjengelige for innsamling. Samtidig gir disse nye genetiske metodene oss bedre innsikt, og vi kan gi klarere avgrensinger av artene vi har kjent fra tidligere. Derfor er referansebibliotekene heller ikke en statisk masse som kan sies å være helt “ferdig”, selv om man må kunne sette et nivå for “brukbart” for spesifikke geografiske habitat ved god nok innsamling.

Det er også verd å ta med seg at referansebibliotek som tilordner genetiske data til en (ofte morfologisk definert) art selvsagt er avhengig av hvilket artsbegrep (hvilke avgrensinger som brukes for å definere arten) som legges til grunn for navnekoblingen. Hver gang det samles inn genetiske data om et takson utvides kunnskapen vår om både interspesifikk (innen art) og intraspesifikk (mellom arter) genetisk variasjon, noe som over tid ofte endrer forståelsen vår av artenes avgrensinger. Alle metoder som legger databankene til grunn for taksonomisk bestemmelse vil derfor være avhengig av hva de som har registrert taksa med navn for sine genetiske data har av forståelse av artenes avgrensinger.

### 2.1 Vitenskapelige museumssamlinger

Det påligger universitetene å ha fysiske samlinger av representativ flora og fauna. Alle arter som er vitenskapelig beskrevet skal ha registrert typemateriale; individer som ligger til grunn for beskrivelsen. Typematerialet skal være tilgjengelig for vitenskapelige studier og slike typesamlinger er en viktig del av museenes samlinger.

Samlinger av materiale som er identifisert av spesialister, også det som ikke er typemateriale, er viktig sammenligningsgrunnlag for nyinnsamlet materiale og som opplæringsmateriale og brukes mye til verifisering av nye identifiseringer. Materiale fra slike kuraterte samlinger, som i tillegg er tilgjengelig for genetisk sekvensering, er det eneste vi kan bruke for å lage kuraterte referansesamlinger av genetiske sekvenser. Ideelt sett skal en stor nok del av individene det genetiske materialet er tatt fra være igjen til at man også siden kan gå tilbake til det spesifikke individet og enten sjekke detaljer eller sammenligne med annet materiale. Slike vouchere gjør sekvensene mye mer verdifulle. Genetiske sekvenser som ikke er knyttet til en voucher kan heller ikke verifiseres at har korrekt taksonomisk identifikasjon. Genetisk karakteriserte individer i sin tur til riktig identifisering og navnetting av individer identifisert basert på morfologiske karaktertrekk. Disse kan da ettersjekkes og oppdateres med tanke på identitet. Det er nøkkelen i kuraterte samlinger som gjør de dynamiske, ny og mer kunnskap bidrar til oppdatert informasjon knyttet til



hvert enkelt objekt i referansesamlingen. En bredere diskusjon av museumssamlingenes viktighet kommer i seksjon 2.6.

## 2.2 Tilgjengelige referansesekvenser for norske taksa

Referansesekvenser for norske eukaryote taksa - både taksa som er samlet inn innenfor norske geografiske områder, og av taksa som har vært registrert i Norge men er samlet inn utenfor norske grenser - finnes både i norske og internasjonale databanker. For alle referansebibliotek er det viktig å merke seg at det ikke nødvendigvis er nok at et takson er registrert med en prøve - det er ofte slik at geografisk vidt spredte taksa viser svært forskjellige genetiske signal i forskjellige områder av utbredelsesområdet (Georgieva et al., 2015).

Et grovt estimat av norske navngitte arter fra det marine miljø gir ca. 13 800 eukaryote flercellede arter. En nylig publisert studie som sammenligner hva det finnes sekvenser fra i flere internasjonale referansebibliotek med publiserte artslistene for Nordsjøen (et område vi har gode forvaltningstradisjoner i, og som det har vært gjort målrettede forsøk på å sekvensere arter fra) viser at ca. halvparten av artene ikke hadde data for det mest vanlige genet COI, med 18S var kun representert med maksimum 36% av artene (Hestetun et al., 2020). Det er tydelig at vi enda ikke har gode nok referansedatabaser til å få fullstendige oversikt over organismesamfunn basert på genetiske data.

### 2.2.1 Materiale ved samlinger i Norge

Norge har siden starten av iBOL (International Barcode of Life, [www.ibol.org/](http://www.ibol.org/)) hatt en egen nasjonal node (NorBOL - Norwegian Barcode of Life - [www.norbol.org](http://www.norbol.org)) der målet er å DNA-strekkode så mange norske arter som mulig. Ved utgangen av 2020 finnes det samlet sett DNA-strekkoder fra rundt 21 500 norske arter i databasen Barcode of Life Data Systems (BOLD, [www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)) hvor de aller fleste stammer fra partnere i NorBOL. Per desember 2020 er det også registrert 15 664 såkalte Barcode Index Numbers (BINs) fra Norge. BINs er et system for genetisk gruppering og navngiving av like sekvenser, og blir ofte sammenlignet med arter eller sett på som "mulige arter" (Ratnasingham & Hebert, 2013). BIN-systemet finnes bare for dyr. Hoveddelen av de norskregistrerte strekkodene er ikke marine, ettersom NorBOL ikke er spesifikt fokusert på marine arter. I det nasjonale nettverket er det allikevel flere aktører som har marine arter som sitt naturlige hovedfokus.

Nettsiden [search.norbol.org](http://search.norbol.org) inkluderer arter med interrimt navn og lister 25 579 taksa på artsnivå merket som samlet i Norge (per 24.08.2020). Denne oversikten inkluderer private data (data som enda ikke er offentliggjort) i BOLD. På samme dag ga et søk i BOLD-databasen med søkeord "Norway" 82 220 offentlig tilgjengelige poster, representert med 13 171 arter. Materiale av disse skal ifølge BOLD være deponert ved 129 ulike institusjoner i inn- og utland. En overveiende del av dette materialet er terrestre og ferskvannsorganismer, særlig planter, sopp og insekter, men rundt 3600 marine arter er registrert fra Norge i BOLD. Av disse har rundt 2500 arter assosierte DNA-sekvenser. Blant de samlinger som har flest registreringer er NTNU Vitenskapsmuseet, Naturhistorisk museum ved Universitetet i Oslo, Norges arktiske universitetsmuseum, Universitetet i Tromsø, NINA, BioFokus. Universitetsmuseet i Bergen, Universitetet i Helsinki, Kai Berggrens samlinger, og Universitetet i New Brunswick. Sistnevnte har spesielt bidratt med strekkoding av marine makroalger. Ca. 5% av disse postene er sekvenser som BOLD har importert fra Genbank.

Universitetsmuseet i Bergen har ansvar for å fasilitere innsending av strekkoder fra de marine dyrene, herfra er det til nå sendt inn ca. 10 000 marine prøver til sekvensering. Dette representerer ca. 2200 forskjellige taksa. Marine taksa har sammenlignet med flere terrestre taksa mye lavere suksessrate når det gjelder å få fram sekvenser fra en prøve, og fra de ca. 10 000 innsendte prøvene har det kommet rundt regnet 6000 sekvenser. Disse fordeler seg på 1700 BINs. Her er det videre verd å merke seg at flere av de 1700 marine (Animalia) BINs vi har strekkodesekvenser for i NorBOL ikke representerer 1700 av de 2200 taksa som det har blitt innsendt prøver fra. En av de mange vitenskapelige avsløringene dette prosjektet har gitt oss, er at mye av det vi har tenkt på som en “art” ikke er kun én art, men representerer flere. Dette kan være nye arter eller tidligere beskrevne arter som er nå er synonyme.

Universitetsmuseet i Bergen, Institutt for Biologi ved UiB og NTNU Vitenskapsmuseet har og har hatt flere marine prosjekter støttet av Artsprosjekt som alle søker å DNA-strekkode så mange taksa som mulig fra norske farvann. Det er en forutsetning for alle slike prosjekt at de leverer genetiske sekvenser via NorBOL til BOLD. Flere mastergrader og PhDer har også fulgt de samme prinsippene for innlevering av sekvenser. Selv om de aller fleste prosjektene er om marine makro-størrelse dyr, er marine makroalger også dekket fra UiB (Bringloe et al., 2019).

Norges arktiske universitetsmuseum, Universitetet i Tromsø har medansvar for de marine makroalgene og alle de marine soppene. Vouchere for innsendt materiale er beholdt i forskjellige samlinger i Norge, dette er nesten utelukkende museumssamlinger. Marine mikroalger fra arktiske farvann er dekket av Universitetet i Oslo, Naturhistorisk museum gjennom prosjektet TaxMarc (taxmarc.scrol.net).

### 2.2.2 Norskinnsamlet materiale i samlinger utenfor Norge

Mesteparten av materialet som har fremskaffet sekvenser gjennom NorBOL-nettverket, har DNA-ekstrakter oppbevart ved Center for Biodiversity Genomics i Guelph, Canada. Disse har (nesten) alt beleggmateriale (vouchere) ved de forskjellige hjeminstusjonene for sekvensene. Universitetet i New Brunswick har mye tidlig norsk materiale, samt mye marine makroalger. Alt sekvensert materiale er tilgjengelig via BOLD og/eller GenBank. BOLD har også mye data fra taksa som finnes i Norge, men som er basert på materiale som ikke er samlet inn innenfor norske grenser.

Det tyske Alfred Wegener Institut (AWI) har hatt mange innsamlingstokt i Norskehavet og ved Svalbard. Instituttet har egne forskningsgrupper i genetikk, paleogenetikk og bioinformatikk. Instituttet har egne voucher-samlinger, og alle sekvenser gjøres tilgjengelig i “standard repositories”.

### 2.2.3 Status for samlinger som kan ha relevante arter innsamlet utenfor Norge

SweBOL (swebol.org) er det svenske nettverket for DNA-strekkoding. De to nordiske prosjektene har hatt et utstrakt samarbeid. Spesielt den marine fauna og flora fra den svenske vestkysten forventes å være svært lik den vi har i Skagerrak og langs Oslofjorden.

Det tyskledete IceAGE-prosjektet (Icelandic marine Animals: Genetics and Ecology - [www.iceage-project.org](http://www.iceage-project.org)) har som hovedmål å ikke bare gjenbesøke innsamlingsstasjonene fra Biolce-prosjektet (som samlet bunndyr rundt Island til morfologi, på formalin), men å bruke havområdene rundt Island til å forstå økologisk og genetisk spredning av bunnlevende marine organismer. De har til nå hatt 4 dedikerte innsamlingstokt med (desember 2020) til sammen noe over 2500 sorterte prøver av benthos inneholdende like under 780 000 individer som er tilgjengelige for genetiske analyser. Områder som er spesielt interessante for Norske formål er nok aller mest Ægirryggen og Norskehavet (delen Norwegian Basin) som begge er innenfor norske forvaltningsområder, men ettersom norske farvann grenser direkte opp til Islandske og Færøyske farvann vil materiale fra hele IceAGE-prosjektet kunne sies å være relevant. Flere norske forskere er involvert i IceAGE-

prosjektet, og deler av materialet opparbeides derfor i Norge. Alle innsamlede taksa er forventet å skulle sekvenseres. Fokuset så langt er COI, 16S, 18S og til en viss grad 28S men materialet er tilgjengelig for flere markører. Alle sekvenser deponeres i BOLD og GenBank.

Prosjektet The Darwin Tree of Life ([www.darwintreeoflife.org](http://www.darwintreeoflife.org)) har satt som mål å sekvensere genomet til alle eukaryote arter i Storbritannia og Irland av materiale som er samlet inn innenfor deres grenser, og er en node i Earth BioGenome Project. Prosjektet er drevet via the Wellcome Sanger Institute i Cambridgeshire, og rådata (ikke ferdig kuratert) kan hentes fra github-siden <https://github.com/darwintreeoflife/darwintreeoflife.data> - annoterte og kvalitetskontrollerte data kan finnes på European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>), i tillegg til GenBank og DDBJ. Sekvensiering utføres på ferskt materiale som snapfryses (legges levende i) i -80° C eller flytende nitrogen for transport til laboratoriet. Det er derfor ingen vouchere som hører til genomene annet enn fotografier av de levende individene. Innsamlede objekter som ikke kan brukes til helgenomsekvensering av tekniske årsaker (at de dør før snapfrysing), blir DNASTrekkodet så langt det lar seg gjøre, og da med tilhørende vouchere ved museer eller institusjoner. Natural History Museum i London er hovedansvarlig for de marine gruppene (Price et al., 2020). Det er enda ikke registrert noen marine taksa i prosjektet, men det er å håpe at de om en del år vil ha en viss mengde arter. Marine fisk er inkludert i fase 1, mens marine evertebrater og planter vil komme i fase 2 og 3. Norge og Storbritannia har tilgrensende geografiske arealer i Nordsjøen og Norskehavet, så flere av artene vil potensielt være relevante for Norge. Prosjektet tar utgangspunkt i at det totalt er 60 000 eukaryote arter i området, majoriteten vil være insekter og planter.

Det russiske havforskningsinstituttet PINRO tar prøver både til egne databanker og til den norsk-russiske økosystemkartleggingen (samarbeid med Havforskningsinstituttet), men ingenting er enda lagt ut i tilgjengelige databanker. Dette vil være materiale av taksa som finnes i Norge, men som ikke er samlet inn innenfor Norges grenser.

## 2.3 Status for pågående prosjekt med innsamling av referansemateriale

Mareano-prosjektet (Mareano.no) samler ekstensivt langs Norskekysten, i Barentshavet og rundt Svalbard. Fysiske prøver samles inn med vanVeen grab, bomtrål og epibentisk slede, og av dette blir materialet fra epibentisk slede, samt en del utplukk, preservert i etanol slik at genetisk sekvensering er mulig. Alt materialet identifiseres så nært mulig til art. Relevant materiale blir så levert til Universitetsmuseet i Bergen. Mye av materialet benyttes videre til bl.a. sekvensering. Alt sekvensert materiale (COI i utgangspunktet) registreres via NorBOL i BOLD.

EU-prosjektet SponGES ([www.deepseasponges.org](http://www.deepseasponges.org)), ledet av Universitetet i Bergen, ble avsluttet i siste kvartal 2020. Et av målene (deliverable 5.2) var en annotert metagenom-database for en del av de mest vanlige svampene i Nordatlantiske farvann. *Geodia barretti* fra Korsfjorden er en av artene som nå er kartlagt. SponGES har hatt en rekke dedikerte innsamlingstokt, hvorav seks i Norskehavet og langs norskekysten. Alle innsamlede arter svamper er sekvensert og en kombinasjon av helgenomer, mitokondrielle genomer, SNP-er og separate loci er levert (og vil fortsette å leveres i løpet av avslutningen av flere akademiske arbeider) til GenBank og PANGAEA. Lenke finnes også direkte fra SponGES webside.

En rekke småprosjekter finansiert av Artsprosjektet har som mål å samle inn og sekvensere (minimum COI, men i noen tilfeller også 16S, 18S) forskjellige artsgrupper eller spesifikke habitat i

Norge. En komplett oversikt kan finnes på Artsprosjektet sine nettsider. Selv om det har vært mange slike prosjekter siden Artsprosjektets oppstart, gjenstår det svært store deler av den marine faunaen selv hvis vi kun skal dekke hver art med 5 individer. Det er spesielt de artene som økologisk klassifiseres som spredte eller som ikke er så lett å samle inn, eller i det hele tatt finne, som mangler, i tillegg til de artene vi nasjonalt, og for en del arters gjeldende til og med internasjonalt, ikke har taksonomer som kan identifisere.

Alle universitetene med marinbiologiske studieretninger samler inn mye materiale i forbindelse med undervisning og akademiske grader. En del av dette materialet sekvenseres i forbindelse med undervisningen og oppgaveskrivinger, en del av disse sekvensene lastes opp i internasjonale databanker, men det er ikke noe systematikk over dette.

## 2.4 Vurdering av prioriteringene for samling av referansemateriale

Kravene til norske kartleggings- og overvåkingsprosjekt er ofte at innsamlet materiale skal tas vare på i et kortere tidsrom (vanligvis fem år). Etter dette er det med ujevne mellomrom oppryddinger der materialet enten avhendes eller unntaksvis tilbys vitenskapelige samlinger. Det er viktig at det, sammen med materiale som tilbys museenes vitenskapelige samlinger, følger midler til kuratering, siden ikke-kuraterte samlinger har svært liten bruksverdi. Både tidsserier fra områder som overvåkes samt representative samlinger av taksa som finnes gjennom ulike prosjekter er viktige å ha i vitenskapelige samlinger. For at samlingene skal være relevante for analyser med miljø-DNA, bør også bulkmateriale fikses på en DNA-vennlig måte slik at det kan sekvenseres på et senere tidspunkt.

## 2.5 Vurdering av prioriteringene for “strekking” av referansemateriale fra kartleggings- og overvåkingsaktivitet

Mesteparten av materialet som samles inn i kartlegging, men spesielt overvåkningsaktivitet, fikses på formalin, og er sånn sett utilgjengelig for sekvensering og sammenligning med miljø-DNA. Materiale som fikses på etanol er mer tilgjengelig for sekvensering. Marine makroalger tørkes ofte, og dette materialet vil være tilgjengelig for DNA-strekking. Ved materiale som er tilgjengelig for genetisk sekvensering (både flora og fauna) bør ikke bare de vanlige artene sekvenseres, men også arter som er sjeldne, samt arter som historisk har vært tilstede (Finstad et al., 2020).

For overvåking av fremmede og invasive arter er det viktig å sekvensere materiale av dørstokkarter, samt å ha materiale fra nære populasjoner av arter vi forventer vil komme til Norge. Det vil her være viktig med gode og oppdaterte oversikter over hvilke arter som vurderes som dørstokkarter, og det må arbeides målrettet for å dokumentere referansesekvenser for slike arter. Fordi det ofte finnes ulike begrensninger ved bruk av bare én markør, bør det også produseres referansesekvenser for flere markører, slik at sikkerheten i artsidentifikasjonen økes (Westfall et al., 2020). For å få et fullverdig referansebibliotek, må materiale av artene som ennå ikke er i Norge samles fra andre områder utenfor landets grenser. Selv om DNA-sekvenser fra slike arter allerede kan forekomme i

åpne nett-databaser, gjelder de samme forsiktighetsregler ved bruk som de som påpekes i databasen WRiMS (Rius et al., 2021). Feilidentifikasjoner kan forekomme i kildematerialet og det kan være usikkerhet om artenes naturlige forekomst. Det internasjonale samarbeidet om strekkodedatabaser har i stor grad tydeliggjort disse to poengene og framgår, for eksempel, av mange taksonomiske uoverensstemmelser i de såkalte BINs i BOLD-databasen.

## 2.6 Viktigheten av muséumssamlinger for strekkoder

En god fortolkning av resultater fra metastrekkoding krever bevissthet om ulike forhold som på ulikt vis kan påvirke konklusjonene. Det mest grunnleggende spørsmålet er om de produserte sekvensene allerede er kjent som diagnostiske kjennetegn for gitte taksa. Identifikasjon av en art med DNA-sekvenser krever at arten er representert i et referansebibliotek (Ekrem et al., 2007). Arbeidet med å produsere forbindelsen mellom takson og strekkode har vist at mange marine evertebrater har vært vanskelig å sekvensere med de standardprotokoller og (langt fra universelle) primere som har blitt benyttet for å fremskaffe artsbestemte strekkoder. En lav suksessrate for mange artsgrupper gjenspeiles i BOLD-databasen ved at arten finnes med bilde og metadata, men mangler sekvenser eller fullverdig strekkode.

Et annet problem er at mange sekvenser i referansedatabaser har usikre taksonomiske angivelser. Slik usikkerhet kommer ikke nødvendigvis fram i identifikasjonssøk, men kan avsløres ved såkalt "BIN-discordance" der like sekvenser forekommer med mer enn ett navn. Å korrigere slike tilsynelatende feil kan være et omfattende arbeid fordi det ofte kreves dyptgripende nyfortolkning av taksonomisk status og tilhørende økologisk empiri.

Publikasjoner som promoterer metastrekkoding uttrykker ofte at foreliggende sekvensdatabaser som GenBank og BOLD har tilstrekkelig representasjon av aktuelle taksa til at sekvenssammensetningen i miljøprøver kan gi et godt bilde av hvilke organismer som forekommer i økosystemet. Dette kan nok være tilfelle med hensyn til problemstillinger med begrensede målgrupper, men for komplekse marine systemer er det viktig å vite at den taksonomiske forståelsen av mange grupper er i endring og at denne dynamikken vil ha betydning for pågående endringer i fortolkninger av artenes utbredelse og økologi.

Et viktig aspekt ved IBOL-initiativet er at strekkoder bør dokumenteres med prøver (vouchere) av de sekvenserte organismene. Disse vouchere bør være tilgjengelige for andre forskere (så i samlinger som er åpne for studiebesøk eller lån), slik at både strekkoden (det genetiske resultatet) og den taksonomiske identifikasjonen av organismen kan etterprøves. I hvilken grad prøvene som summeres i denne statistikken i praksis er tilgjengelig for studier av forskere utenfor de institusjonene der prøvene skal befinne seg er et åpent spørsmål.

### Manglende sekvensdata

For å belyse noen problemer knyttet til taksonomisk dekning og tilstand for referansedata, undersøkte vi hvordan arter som tradisjonelt er benyttet i bunndyrstudier er representert i BOLD. Framgangsmåten tilsvarer i utgangspunktet den som ble benyttet av Weigand et al. (2019) i undersøkelsen av status for akvatiske arter i Europa.

Vi brukte sjekklister-funksjonen i *Boldsystems.org* for å laste opp en sammenstilling av 386 indikatorarter for marin miljøtilstand fra "Norwegian Sensitivity Index (NSI)" (Rygg & Norling 2013: URL <http://hdl.handle.net/11250/216238>). Med sjekklister kan en lage en progresjonsrapport (Figur 2.1) som viser at 81,87% av de gjeldende artene har COI-strekkoder i BOLD. Ytterligere 1,81%

har sekvenser som ikke fyller kriteriene for strekkoder. I sum skal det forekomme sekvenser for 83,68% av de gjeldende artene i BOLD. Blant de artene som mangler strekkode, mangler det materiale av 45 arter; 18 arter med materiale mangler sekvenser og 7 har sekvenser som ikke er fullverdige strekkoder. En umiddelbar tolkning er at den første kategorien kan representere arter som er vanskelige å finne. De to andre, 18 og 7, kan være arter som ikke svarer godt på standard Sanger-sekvensering. Her finner vi, for eksempel, børstemarken *Amage auricula*, som har 17 prøver i databasen, men ingen sekvenser. Det er kjent at standard markør for DNA-strekkoding (COI) ikke fungerer tilfredsstillende for enkeltarter, og i noen tilfeller for hele organismegrupper.

7/26/2020

Checklist Progress Report for CL-NISI | BOLDSYSTEMS

## Checklist Progress Report for CL-NISI

### Progress Report Results

[Download Progress](#)

Progress Report provides results of the comparison between checklist CL-NISI and all data on BOLD.

#### Summary of Results

Taxon Level	Total	%Sampled	%Sequenced	%Barcoded
Species	386	88.34%	83.68%	81.87%
Genus	270	95.19%	90.74%	89.63%
Family	147	95.92%	95.24%	94.56%
Order	55	70.91%	70.91%	70.91%
Class	16	81.25%	81.25%	81.25%
Phylum	8	100.00%	100.00%	100.00%

**Figur 2.1:** Utdrag av progresjonsrapport fra Boldsystems.org viser at det forekommer COI-sekvenser for 83,68% av de 386 artene som finnes i norsk sensitivitets-indeks (NSI) for marine makrovertebrater. Artsidentifikasjon basert på sekvenser i database bør imidlertid ta forbehold om uavklarte taksonomiske problemer og mulige feil i artsbestemmelsene i databasen.

### Taksonomiske uoverensstemmelser og upresis taksonomi

Fra disse observasjonene kan en tenke at ytterligere innsats i innsamling og PCR-optimalisering vil kunne komplettere databasen med de 70 resterende artene. Men en bør også være oppmerksom på at det kan hefte ulike typer problemer med de allerede foreliggende referansedata. For det første er data produsert av ulike bidragsytere, som ikke nødvendigvis er samstemte i sin forståelse av artene. Det innebærer at arter kan være feilbestemte eller at ulike kunnskapsmiljø opererer med ulike taksonomier. Dessuten har sekvensering vist at svært mange evertebratarter, som tradisjonelt er definerte med morfologiske kjennetegn, har langt større genetisk diversitet enn forventet. Det kan fremtvinge behov for taksonomisk revisjon og for nye utredninger av økologiske signaturer for de enkelte taksonomiske enhetene. I sammenligninger av NSI og AMBI-systemet fant Rygg og Norling (2013:Tabell 2) et sprik mellom norske og sør-europeiske sensitivitetsverdier for flere arter. Blant mulige årsaker til dette nevnte de ikke at slike avvik kan skyldes at ulike identifiserere kan forveksle morfologisk like arter. Dette kan være individuelle, tilfeldige feilbestemmelser, men også systematisk konsistente avvik, der ulike forskningskulturer har ulik forståelse av arter. Ettersom DNA-undersøkelser også har avslørt mange tilfeller av antatt kryptiske arter, må det etter hvert også bygges ny økologisk empiri rundt de nyoppdagede taksonomiske enhetene. For å belyse denne problematikken brukte vi applikasjonen *search.norbol.org*, som søker og oppsummerer strekkodede organismer fra norske områder.

Et søk med søkeordet “Polychaeta” (27.07.2020) resulterte for eksempel i 863 navngitte taksa (formelle og uformelle artsnavn). Blant disse er også arter som finnes i AMBI og NSI-systemene. Ved sammenligning av Figur 2.2 og 2.3, ser vi for eksempel at tre eksemplarer av *Chaetopterus variopedatus* i BOLD ikke er assosiert med noen BIN. Det betyr, i alle fall inntil videre, at denne arten ikke kan identifiseres med COI-sekvenser. Fra Figur 2.3 ser vi videre at *Chaetozone setosa* er assosiert med tre ulike BINs, mens *Chaetozone* sp. forekommer i åtte BINs, hvorav fire er offentlig tilgjengelige. Mange av disse genetiske klyngene er også annoterte med provisoriske epiteter, som *Chaetozone* sp. MG1 osv. Det signaliserer en intensjon om at disse vil bli beskrevet som nye arter. Vi ser også at BINs med *Chaetozone* sp. også inneholder artsbestemte arter, f.eks. *Chaetozone zetlandica* i BIN:APC1889. En nærmere utredning av *Chaetozone*-komplekset er nylig publisert av Grosse et al. (2020). Den kan stå som eksempel på de mange funn av potensielt kryptiske arter som kan medføre endringer i forståelsen av økologiske indikatorsystemer.

## NIVA 6475 -2013

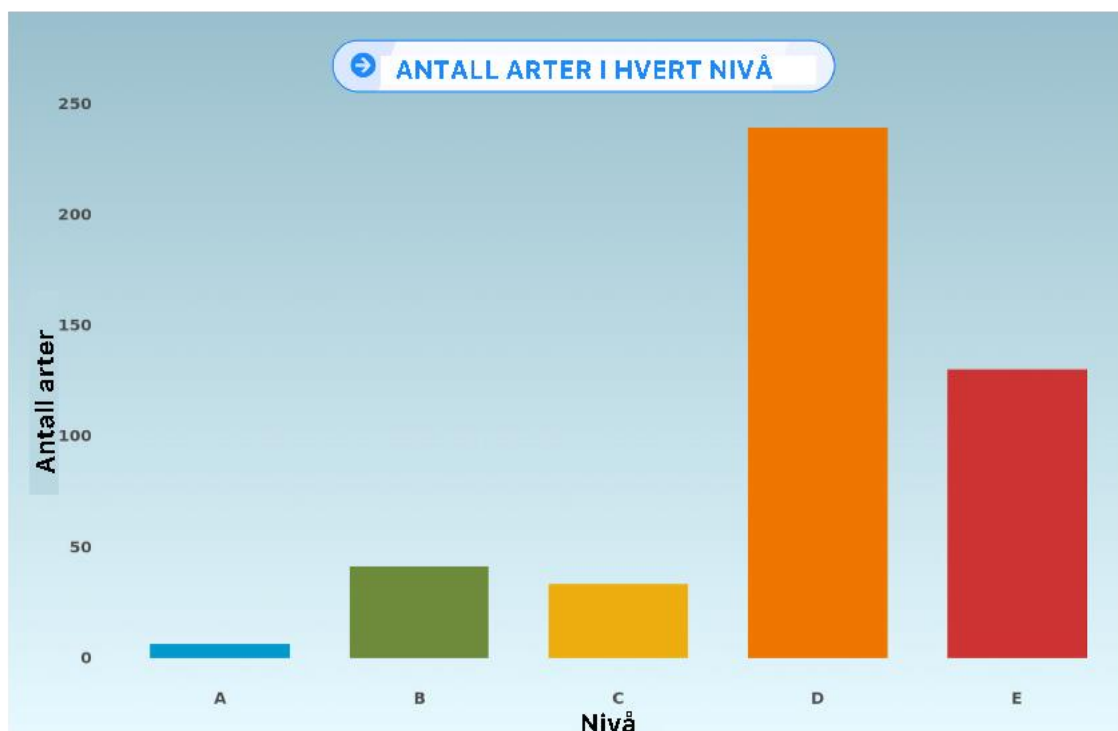
TAXON NAME	ISI <sub>2012</sub>	NSI	NSI EG	AMBI EG	AMBI VALUE	GROUP DIFF	COUNT	ABUNDANCE
<i>Chaetopterus variopedatus</i>	16.14	30.14	I	I	0	0	43	53
<i>Chaetozone setosa</i>	3.47	14.46	IV	IV	4.5	0	2869	115170
<i>Chaetozone</i> sp.	10.98	18.86	III	IV	4.5	-1	94	2474

Figur 2.2 Eksempler på sensitivetsverdier for tre NSI-, ISI- og AMBI-taksa. (Utsnitt fra Rygg og Norling 2013: Appendix A). ISI2012=Indicator Species Index, NSI=Norwegian Sensitivity Index, NSI EG=økologisk gruppe i NSI, AMBI EG=økologisk gruppe i AMBI, AMBI VALUE=Verdi i AMBI, GROUP DIFF=forskjell mellom grupperang i NSI og AMBI. Se for eksempel at *Chaetozone* sp. er plassert i NSI EG III, d.v.s. “tolerant gruppe”, mens AMBI IV betyr at den anses som en “opportunistisk art”.

Species	Barcodes	Specimens	Missing   Associated BINS	Public records
Chaetopterus variopedatus	0	3	3	0
Chaetozone christiei	1	1	0 BOLD:ACV1726	1
Chaetozone jubata	3	9	6 BOLD:ACV1642	0
Chaetozone setosa	4	11	7 BOLD:ACZ4936, BOLD:AAB5820, BOLD:ACV1642	3
Chaetozone sp.	9	24	15 BOLD:ACP2291, BOLD:ADM0208, BOLD:ACM0974, BOLD:ACP1888, BOLD:ACP1889, BOLD:ACP1733, BOLD:ADN5488, BOLD:ACM1013	4
Chaetozone sp. A	1	1	0 BOLD:ACM0974	1
Chaetozone sp. B	0	1	1 BOLD:AAB5820	0
Chaetozone sp. MG1	4	17	13 BOLD:ACV1642	0
Chaetozone sp. MG10	0	1	1	0
Chaetozone sp. MG14	0	1	1 BOLD:ADM0208	0
Chaetozone sp. MG2	1	6	5 BOLD:ACM0974	0
Chaetozone sp. MG3	2	12	10 BOLD:ACP1888	0
Chaetozone sp. MG4	1	3	2 BOLD:ACM1013	0
Chaetozone sp. MG6	0	7	7	0
Chaetozone sp. MG7	12	34	22 BOLD:ACZ4936	0
Chaetozone sp. MG8	6	17	11 BOLD:AAB5820	0
Chaetozone sp. MG9	0	2	2 BOLD:ACR2344	0
Chaetozone zetlandica	1	3	2 BOLD:ACP1889	0

**Figur 2.3:** Utsnitt av resultater fra search.norbol.org med søkeord "Polychaeta" (27.07.2020). Kolonnene viser henholdsvis antall prøver med strekkode, antall prøver, antall manglende strekkoder, hvilke BINS som er tilknyttet arten og antallet sekvenser (strekkoder) som er åpent tilgjengelig. Per dato finnes ingen strekkoder for Chaetopterus variopedatus, men tre (mislykkede?) prøver er registrert. Chaetozone setosa finnes i tre ulike BINS, som også er registrert som henholdsvis C. sp. MG7, C. sp. MG8 og C. sp. MG1. Chaetozone sp. finnes i åtte BINS. I tillegg finnes artene C. christiei, C. jubata, C. zetlandica og arter med provisoriske navn. Fargede BINS finnes registrert med mer enn ett taksonnavn.





**Figur 2.4:** Taksonomisk validering av COI-strekkoder for pigghuder (Echinodermata) i BOLD-databasen i følge BAGS-algoritmen (25.11.2020). Merk at det ikke finnes karakter for arter som helt mangler sekvenser. Dette bildet kan illustrere hvorfor mange miljø-DNA-studier påpeker at videre arbeid med DNA-referansebiblioteker er påkrevet. **Nivå A:** konsolidert samsvar. Morfo-taksonet (morfologisk basert "art") er tilegnet en unik BIN, som også er unikt tilknyttet den spesifikke arten, og arten er representert med mer enn 10 individer i biblioteket. **Nivå B:** grunnleggende samsvar. Morfotaksonet er tilegnet en unik NIN, som også er unikt tilknyttet den spesifikke arten, og arten er representert med 10 eller færre individer i referansebiblioteket. **Nivå C:** Multiple BINer. Morfotaksonet er tilegnet til flere enn ett spesifikt BIN, men hvert av BINene er kun tilknyttet den spesifikke arten. **Nivå D:** Manglende data. arten er ikke tilegnet uten samsvar, men den har færre enn tre individer i referansebiblioteket. **Nivå E:** Ikke-samsvarende artstilegning. Arten er tilegnet en BIN som er tilegnet til flere enn én forskjellige arter. Individet kan tilegnes en annen art eller vise parafyli eller polyfyli.

### 3. PROBLEMSTILLINGER MED PRØVEINNSAMLING (FRA FORSKJELLIGE HABITAT)

Å velge passende innsamlingsdesign er essensielt for suksessen til enhver marin undersøkelse med miljø-DNA. Allikevel er den unike situasjonen til enhver studie, og heterogeniteten til det marine miljø, medvirkende til at det ikke er mulig å ha en universell tilnærming til innsamling. Innsamlingsstrategien må være tilpasset måltaksene og habitatet, studiens formål og en kombinasjon av statistiske, logistiske og finansielle vurderinger. Innen publikasjonene som finnes om marint miljø-DNA er mangfoldet av innsamlingsstrategier nesten like høyt som antallet studier med miljø-DNA, og metodene er ofte så forskjellige fra hverandre at det er umulig å sammenligne dem (Ruppert et al., 2019; Zinger et al., 2019).

Problemer og vanskeligheter med innsamling i marine studier med miljø-DNA kan deles i to kategorier: (1) de som er eksklusive til innsamling og preservering av miljø-DNA, og (2) de som er de samme for alle studier som omhandler vurdering av (bio)mangfold. Målet med de fleste studier med miljø-DNA er ofte av økologisk natur, ettersom de har å gjøre med grunnleggende økologiske problemstillinger som artsmangfold og artssammensetninger (for eksempel tilstedeværelse/fravær av arter, hvor mange og hvilke arter som er tilstede på et gitt sted og tid). Derfor er det ikke overraskende at mange av problemene med innsamling av miljø-DNA er de samme som andre marinøkologiske studier har (Taberlet et al., 2018). Å avgjøre om man skal bruke et lagdelt tilfeldig design (stratified random) eller om en systematisk undersøkelse er mer passende, utvelgelse og oppdeling av innsamlingsområde, valg av korrekt lokalitet, utstyr og prøvestørrelse, og å bestemme seg for et passende antall replikater, er alle eksempler på tema som avhenger av studiens mål, og av tids- og geografiske begrensninger på studien. Alle disse temaene har vært viet mye oppmerksomhet i den klassiske økologilitteraturen (se for eksempel Devine et al., 2017) og hoveddelen av publiserte diskusjoner om emnet (for eksempel hvor mange prøver, hvor mange replikater for hver prøvestasjon, hvordan skal man spre prøvene ut geografisk, på hvilken årstid osv.) gjelder også for innsamling til studier med miljø-DNA. Biologiske replikater må for eksempel inkluderes like mye i studier med miljø-DNA som i alle andre økologiske studier hvis man på ordentlig vis skal kunne si noe om variansen som kommer som en effekt av selve prøvetakingen (Prosser, 2010; Ficetola et al., 2015).

Problemene som spesifikt er knyttet til prøvetaking for miljø-DNA henger alle direkte sammen med at miljø-DNA forekommer i forskjellige former etter hvilke tidsvindu og organismer det er snakk om. Tilgjengeligheten av DNA i en hvilken som helst prøve er styrt av produksjonsrate, transport og holdbarhet, alt sammen prosesser som i stor grad er avhengig av målorganismen, organismens biomasse og hvilket habitat den hører til (Taberlet et al., 2018). En god evaluering av et økologisk fenomen som er basert på DNA-strekkoding er slik ikke bare avhengig av standardiserte randomiserte og repeterbare innsamlingsdesign (Dickie et al., 2018), men også at en tar hensyn til DNA-dynamikken i innsamlingssubstratet (for eksempel vann, sediment, hardbunn, osv., Barnes & Turner, 2016). En mengde feilkilder og biaser kan snike seg inn i innsamlingsdelen, og ødelegge for muligheten for å komme til korrekte og ikke minst etterprøvbare konklusjoner. Dette kan være at vi samler inn for lite materiale, forurensing fra tidligere eller nærliggende begivenheter og nedbryting av miljø-DNAet i en miljøprøve i lagringstiden mellom prøvetaking og ekstrahering.

Å samle inn for lite prøve (undersampling) kan komme fra et dårlig utvalg av innsamlingslokaliteter, for begrenset antall innsamlingshendelser, for lite prøvevolum og/eller for få replikater. Resultatet vil ofte være for lite mengde av miljø-DNA i prøvene eller at ikke hele det naturlige utvalget i prøveområdet er representert i prøven(e). Ofte vil et for begrenset innsamlingsdesign resultere i at en ikke får samlet inn den fulle taksonomiske bredden eller alle økologiske prosesser i studien, slik at en vil få en unødvendig og uakseptabel feilfordeling i all videre forskning basert på artsgjenkjenning i prøven. En annen uønsket konsekvens er at det lett vil oppstå falske negativer, for eksempel et takson som ikke er gjenkjent i miljø-DNAet men som allikevel finnes på lokaliteten. Gjennomføring av pilotprosjekter vil kunne hjelpe å utforme et godt studiedesign som ikke blir for begrenset (Dickie et al., 2018). Tidligere kjennskap til opprinnelsen, varigheten og transporten av miljø-DNA i et spesifikt miljø, er ekstremt viktig, ikke bare for å lage en god innsamlingsstrategi, men også for å kunne gjøre en god fortolkning av resultatene (Barnes & Turner, 2016).

På den annen side er forurensing noe som lett vil kunne gi falske positive signaler i en prøve - for eksempel et takson kan bli gjenkjent i prøvematerialet, men det finnes ikke i det opprinnelige miljøet prøven er fra. I innsamlingsdelen av en studie er forurensing som oftest introduksjon av fremmed DNA inn i prøven. Både for lite innsamlet materiale og forurensing er problemer som kan forekomme i en hvilket som helst innsamling i marin økologi, men det er problematisk for metoder med miljø-DNA siden de er så sensitive, og spesielt når det kommer til prosjekter som er basert på gjenkjenning av taksa. For å unngå falske positive som kommer fra forurensing mellom prøvetakninger må alt innsamlingsutstyr gjennomgående steriliseres før bruk, eller aller helst bør innsamling skje med engangsutstyr. Dekontaminering (rensing) av utstyr og bruk av engangsutstyr der det er mulig er imperativt for å beholde prøvenes integritet. Engangsutstyr er selvfølgelig det aller beste, siden utstyret da ikke vil ta med forurensing fra tidligere innsamlinger, men det øker kostnadene av en studie betraktelig. I stor utstrekning er engangsutstyr heller ikke bærekraftig miljømessig. Hvis utstyret (for eksempel en Niskin-flaske) må brukes mer enn én gang, bør de steriliseres etter hver bruk eller i alle fall vaskes med en 10% kloroppløsning og renses godt før gjenbruk. Selv om en kan begrense kryss-forurensing gjennom slike metoder er det også viktig å prøve å unngå forurensing fra felt, selv om det i praksis kan være tilnærmet umulig å få helt til. Innsamlingsutstyret må jo naturlig nok komme i kontakt med omliggende vann, for eksempel må en sedimenthenter bevege seg gjennom vannsøylen både på vei ned til bunnsedimentet og på vei opp igjen. Det er derfor viktig med negativ-kontroller fra felt, slik at en sekvensering av slike prøver kan hjelpe til med å oppdage forurensing i ikke-kontrollprøvene. Kontrollprøver må være med også for å vise påliteligheten til hele databehandlingsprosessen (Taberlet et al., 2018; Zinger et al., 2019). Negative felt-kontrollprøver kan inkludere ekstraksjon av DNA fra lagrings- og ekstraksjonsbuffer som har vært med i felt eller ekstraksjon av DNA fra ultrarent ferskvann som blir fylt opp i ferdigrensede Niskin-flasker. Slike prøver må følge samme prøveanalyse-protokoll som alle andre prøver i studien, og vil da gi en "utstyrs-negativ-kontroll".

Dessverre vil selv bruk av en grundig vurdert innsamlingsprotokoll ikke være en total garanti mot at en kan få falske positive eller negative resultat, de kan også oppstå i de analytiske delene av en studie. Enhver innsamlingsprotokoll må også kontinuerlig revideres og forbedres, spesielt når nye og forbedrede innsamlingsteknologier utvikles. Disse vil alltid komme med sine egne spesialiteter og problemer, og vil kreve tilpasning av tidligere gode protokoller. For sammenligning med tidligere innsamlingstidspunkt i en tidsserie vil grundig dokumenterte innsamlingsprotokoller være svært viktig, ettersom analyser med miljø-DNA er et felt som er i rask utvikling. Det er ikke sikkert det vil være mulig å gjøre innsamlinger og analyser likt etter for eksempel 10 år, og da vil protokollene være enda viktigere for analysene.

Det siste store aspektet man må ta hensyn til ved prøvetakning av miljø-DNA er hvordan man bevarer prøvene fra innsamling fram til ekstraksjon slik at DNA i prøven ikke brytes ned. Direkte

konservering av prøvene er viktig for å hindre at de brytes ned. Nedbryting av DNA påvirkes av miljøfaktorer som temperatur, pH og lyseksponering (Barnes & Turner, 2016; Strickler et al., 2015; Tsuji et al., 2017). De spesifikke konserveringsmetodene er ganske enkle og godt beskrevet for forskjellige prøvetyper. De inkluderer tørking, frysing ved -20 °C eller bevaring i 100% etanol eller en celle-lysis buffer (Goldberg et al., 2016). Standardisert konservering er avgjørende ikke bare for å hindre nedbryting av DNA, men også for å holde mengdene DNA- og PCR-hemmere så like som mulig mellom prøvene. Dette vil hjelpe til å kunne bruke de samme parametrene ved PCR oppformeringsstadiet, og slik muliggjør det en grundig og realistisk sammenligning mellom prøvene og mellom innsamlingstidspunkt.

I all innsamlingsdesign er det svært viktig at alle tekniske detaljer beskrives og illustreres grundig med relevante statistiske betraktninger for feltinnsamlingen når studien publiseres eller rapporteres. Uten god nok informasjon om innsamlingen vil det ikke være mulig å evaluere kvaliteten eller relevansen av dataene i etterkant. Dessverre er dette fremdeles ofte en mangel i de fleste studier med miljø-DNA. Det er å håpe at denne praksisen vil forbedres. Slik det er nå, er det for mye usikkerhet ved de fleste studier. Det leder ikke bare til usikkerhet om kvaliteten og mangel på mulighet til sammenligning med andre studier, men også ofte til ubegrunnede teorier og uriktige konklusjoner. Dårlige strategier som mangel på replikater (Prosser, 2010), eller mangel på negative kontroller (Zinger et al., 2019) har gjentatte ganger blitt kritisert i fagfeltet. Gjennomgående retningslinjer til best bruk av metoder innen analyser med miljø-DNA og oppfordringer til at forskerne skal begrunne innsamlings-designen sine har begynt å komme (Taberlet et al., 2018).

Ettersom studier med miljø-DNA er svært påvirket av hvilket substrat de tar utgangspunkt i (Koziol et al., 2019), vil vi under komme med spesifikke detaljer for innsamlingsdesign i forskjellige marine habitater:

### 3.1 Pelagiske prøver

Miljø-DNA fra pelagiske prøver er enten vannprøver eller samfunns- (bulk-) DNA fra planktontrekk. Av disse to er vannprøver det mest vanlige substratet i studier med miljø-DNA (Koziol et al., 2019), og analyser av slike har vært innlemmet i utviklingen av metoder for biologisk overvåking (Ruppert et al., 2019).

Små mengder og ujevn utbredelse, eller romlig fordeling, av miljø-DNA er vanlige problemer i marine miljø. Derfor er det viktig å bruke store vannvolum og mange felt-replikater når en jobber med vannprøver. Miljø-DNA fra makroorganismer er vist å ha generelt svært lav konsentrasjon og flekkvis fordeling i ferskvannssystemer (Takahara et al., 2012; Pilliod et al., 2014), dette er med stor sannsynlighet også gjeldende for marine miljø. Flere studier har dokumentert ujevn romlig fordeling av miljø-DNA i saltvannssystemer og ved elveutløp (Lallias et al., 2015; O'Donnell et al., 2017), noe som støtter opp under behovet for et tilpasset innsamlingsdesign som tar høyde for spesielle behov i forskjellige habitat. Innsamlingsdyp har for eksempel blitt vist å ha en signifikant effekt på artssammensetningen av marine virveldyr i Monterey Bay vist ved miljø-DNA (Andruszkiewicz et al., 2017b), noe som indikerer at en bør ta vannprøver fra forskjellige dyp for å få med seg det totale mangfoldet av fisk og marine pattedyr. Fordi gjenkjenning av arter fra vannprøver ikke alene er avhengig av tilstedeværelse og konsentrasjon av miljø-DNA i vannprøven (noe som vil vise innsamling på rett tid og sted i forhold til artens økologi), men også av innfangings- og ekstraksjonseffektivitet, forstyrrelser (av for eksempel hemmere) og sensitiviteten til analysen, vil en pilotstudie kunne hjelpe stort med å justere og vurdere gjenkjenningmulighetene av måltaksa i vannprøvene (se også del 4 av denne rapporten).

For å ta høyde for det faktum at marine vannprøver ofte har svært lave nivå av miljø-DNA er utfelling og filtrering mye brukt til å oppkonsentrere miljø-DNAet som faktisk finnes i vannprøvene (Deiner et al., 2015; Creer et al., 2016; Goldberg et al., 2016; Hering et al., 2018). Filtrering har den fordelen at det tillater en behandling av store vannmengder siden filtrering kan skje direkte påfølgende innsamling eller vannprøvene kan lagres på is for transport til et egnet sted for filtrering. Det er allikevel en del problemer forbundet med filtrering av store vannmengder, ikke minst når sediment- eller biologiske partikler tetter filtrene. Så langt som mulig bør filtrering skje direkte ved innsamlingsstedet, ettersom det tillater øyeblikkelig konservering av prøven (filteret). Filter og annet innsamlet materiale kan konserveres ved frysing, nedsenking i etanol, tørking eller nedsenking i celle-lysis buffer (Goldberg et al., 2016). Miljø-DNAprøver har blitt effektivt samlet på filter av cellulosenitrat, glassfiber, polykarbonat, nylon, polyetersulfon og celluloseacetat (Goldberg et al., 2016). Det er foreslått at filtrering kan tilrettelegge for bedre gjenkjenning enn utfelling fra samme volum (Deiner et al., 2015), men filtermateriale, porestørrelse og DNA-ekstraheringsmetode påvirker resultatet i stor grad (Deiner et al., 2015; Goldberg et al., 2016).

## 3.2 Innbentos (bløtbunn)

Størrelsesnivået på målorganismene bør være grunnlag for hvor stort volum sediment som bør samles hvis en skal få en god representasjon av samfunnet som samles inn. Mikrobielle samfunn kan derfor trenge så lite som ~0.25-2.5 g sediment (Pawlowski et al., 2014) og bør heller ikke forprosesseres siden virus og encellede organismer lett vaskes bort eller blir lysert gjennom dekantering og sikteprosesser. Det trengs større sedimentvolum (>100 mL) som både må prosesseres og konsentreres hvis vi ønsker å ha en god representasjon av meiofauna, ettersom slike organismer gjerne er flekkvis fordelt, og det er en høy andel av arter som er sjeldne i hvert samfunn (Ramirez-Llodra et al., 2010). DNA fra meiofauna kan ekstraheres direkte fra sedimentprøvene, eller prøvene kan prosesseres ved hjelp av dekantering og flottering (Creer et al., 2010). For de større makrovertebratene skilles bulk-prøver fra sedimentene ved hjelp av dekantering og sikting før de homogeniseres (Yu et al., 2012).

En viktig problemstilling ved sedimentinnsamling fra marine miljø, spesielt fra polare og nordligtempererte vannmasser, er å beholde DNAets helhet etter at bunnsedimentene har blitt tatt opp på dekk. For å hindre nedbryting av DNA må prøvene behandles så snart de er innsamlet. Hvis prøvebehandling ikke kan skje med én gang, må prøvene konserveres i et egnet fiksativ, og bli holdt kalde (-4°C to -20°C). Langtidslagring av ikke-behandlede bulk-prøver av sediment bør unngås, ettersom det vil resultere i tydelig DNA-nedbryting fordi de store mengdene sediment og vann vil endre konsentrasjonen på fiksativene.

Marint sediment kan samle opp DNA fra både pelagiske og terrestre økosystem (Torti et al., 2015) i tillegg til gammel-DNA (ancient DNA) som har blitt tatt opp i (absorbert av) sedimentpartiklene og har blitt bevart over lange tidsperioder. Hvis vi fokuserer på miljø-RNA vil dette kun være fra levende organismer, og vil slik være en bedre representasjon av det nåværende artsmangfoldet i samfunnet vi studerer sammenlignet med miljø-DNA. (Deiner et al., 2017).

Hvis den lokale faunaen er dårlig kjent, anbefales det sterkt å gjøre en tradisjonell faunistisk undersøkelse parallelt for å lage et lokalt referansebibliotek for mål-samfunnet. Dette kan løses gjennom å samle inn flere replikater til både miljø-DNA og taksonomisk identifisering av fauna og gjerne klassisk strekkoding av individuelle organismer. Det anbefales også å analysere kjente makrofauna-samfunn (analyse av kunstig lagde samfunn) for å teste de mest brukbare primersettene for å gjenkjenne den største delen av mangfoldet i en naturlig (felt-innsamlet) prøve. Også

for slike analyser vil det være nødvendig med ekstra innsamling av prøver slik at man kan samle nok organismer av de viktigste gruppene til å lage et kunstig testsamfunn (Lobo et al., 2017).

### 3.3 Hyperbentos (bløtbunn)

Hyperbentos er overgangen mellom vannsøyle og bunn/sediment, og prøver fra dette området har problemene fra begge. Det øverste laget av den tilgjengelige havbunnen blir ofte samlet, og ved bløt bunn er dette ofte også "marin snø" - detritus fra alt som har falt ned gjennom vannsøylen (fytoplankton, zooplankton, fecal pellets fra disse, osv.)

Det er ikke gjort noen studier på hyperbentos-miljø-DNA. Flere studier i de siste årene har fokusert på å samle inn dyr til å kunne lage referansebibliotek for DNA fra hyperbentos, og da er arbeidet fokusert på utplukkede taksa (f.eks. Jazdzewska et al 2018). Innsamling av hyperbentos gir allerede "rene" bulk-prøver, med mye biota i forhold til sediment og vann. Den vanligste måten å samle inn hyperbentos på er ved hjelp av sleder som i praksis fungerer som horisontale planktonnett dratt like over havbunnen, men det er også gjort noen innsamlinger ved hjelp av feller (både med åte og feller tilsvarende fallfeller).

Innsamlinger med hyperbentos-sleder vil gi bulk-prøver som kan brukes til meta-strekkoding. Det virker ikke mulig å få gode resultat fra noen typer feller, ettersom de enten vil gi mye falsk-positive resultat fra åtet, eller være ubrukelige (marine fallfeller samler i formalin). For innsamling med sleder er de største problemene alle assosiert med forurensing av prøvene, det være seg fra selve sleden, fra vannsøylen den beveger seg gjennom både ned til innsamlingsstedet og opp igjen til båten, samt sedimentet den er designet til å virvle opp for å få et rikt prøvemateriale. Ingen hyperbentos-prøver kan derfor regnes for å være "rene" i den forstand at de kun representerer hyperbentos. På den annen side er mye av biomangfoldet i de hyperbentiske artene ikke representert i sedimentprøver, og de er svært sjelden funnet i pelagiale prøver. Det er ikke publisert studier som viser avsatt DNA fra hyperbentiske arter i hverken sediment-miljø-DNA eller vann-miljø-DNA.

### 3.4 Hardbunn (grunn)

Det er flere utfordringer ved innsamling av hardbunns-samfunn for miljø-DNA. Generelt er hardbunns-samfunn (stein, tareskog og andre makroalger, korallrev, kunstige nedsenkete konstruksjoner, sunkne skip, osv.) er strukturelt mer komplekse og varierte enn pelagiske og bløtbunns habitat. Derfor vil man typisk ha behov for flere replikater hvis en skal sikre seg en fullstendig samfunnsinnsamling. På grunn av de komplekse strukturene vil det gjerne være vanskelig å få samlet inn store nok prøver av lik størrelse, spesielt i dyphavshabitat. Grunne hardbunns-samfunn kan samles inn ved hjelp av dykkere med visuell kontroll på prøve kvaliteten. Dyphavs-hardbunns-samfunn må derimot samles inn med fjernstyrte verktøy som grabber og skraper, og disse vil gjerne ende opp med ikke sammenlignbare prøver. Bruk av ROV (Remotely Operated Vehicle: fjernstyrte undervannsfarkoster) kan hjelpe i dyphavs hardbunns-innsamling. Samfunn som lever på hardbunn har ofte en svært begrenset størrelse, og omfattende innsamling vil lett ha en negativ påvirkning på det generelle økosystemet. Innsamlingsaktiviteten må derfor balanseres mot den mulige påvirkningen, spesielt i sårbare marine økosystem som for eksempel korallrev.

I motsetning til andre mindre jevne samfunn, har hardbunns-samfunn ofte en høyere variasjon av organisme-størrelser. Dette er dels på grunn av massive individ-grupper og kolonidannende dyr

(svamper, mosdyr, hydrozoer, sekkedyr, osv.). Disse kan forårsake en stor ubalanse i mengden ekstrahert DNA mellom fysisk store og antallsmessig mange dyr på den ene siden og de mer sjeldne dyrene på den andre siden. Homogenisering av prøver fra hardbunn kan være vanskelig fordi det ofte følger med harde strukturer, ikke bare i selve sedimentet, men også i selve dyrene (kalkskjell og kalkrør, osv.) (Wangensteen et al., 2017).

## 3.5 Oversikt over protokoller fra litteraturen

### 3.5.1 Protokoller for pelagisk prøvetakning

Spesifikke protokoller for studier med miljø-DNA av pelagiske prøver varierer med hvilket mål studiene har, hvilke måltaksa de retter seg mot, og om analysen er basert på vann eller bulk (plankton) prøver.

Vannprøver samles inn ved hjelp av en bred mengde redskap som for eksempel Niskin (Massana et al., 2015; Andruszkiewicz et al., 2017b; Djurhuus et al., 2018) og van Dom flasker (Yamamoto et al., 2017), Ruttner vannsammlere og luer-lock sprøyter (Sigsgaard et al., 2019), og i forskjellige generelle plastflasker og bøtter av varierende typer og størrelser (Miya et al., 2015; Port et al., 2016; Stat et al., 2017). De fleste studier med miljø-DNA ser ut til å samle 1L prøver, men større volum opp til 3L har blitt brukt noen ganger (e.g. Thomsen et al., 2012; Port et al., 2016). Når prøven er samlet inn, blir vannet nesten utelukkende filtrert, selv om det ikke er noen konsensus om filtertype, nødvendig volum eller porestørrelse, og nesten hver eneste forskningsgruppe sverger til sin egen løsning. Glassfiberfilter (Miya et al., 2015; Brannock et al., 2016; Yamamoto et al., 2017), polyvinuliden-difluorid-filter (Kelly et al., 2014; Port et al., 2016; Andruszkiewicz et al., 2017b; Sigsgaard et al., 2019), polykarbonat-filter (Massana et al., 2015), og nylon (Thomsen et al., 2012; Stat et al., 2017) er de typene filter som er vanligst i bruk for å behandle marine vannprøver til miljø-DNA analyser. Porestørrelsene varierer vanligvis mellom 0,2 to 0,7  $\mu\text{m}$ . I endel tilfeller før-filtreres prøvene for å hindre at porene tettes (Brannock et al., 2016; Djurhuus et al., 2018). Filtrene med konsentrerte prøver blir øyeblikkelig konserverte ved -18, -20 eller -80°C til de kan ekstraheres.

Plankton samleprøver blir samlet ved hjelp av standard plankton innsamlingsteknikker som for eksempel peristaltiske pumper koblet på små-størrelse filter (for nano- og picoplankton; Massana et al., 2015) samt forskjellige typer planktonnett (WP2, Bongo, Apstein) med varierende nettstørrelse 20 - 500  $\mu\text{m}$  for å få mikro- and mesozooplankton) (Chain et al., 2016; Steffani et al., 2018; Djurhuus et al., 2018; Bucklin et al., 2019; Carroll et al., 2019; Pitz et al., 2020; Schroeder et al., 2020) eller til og med en modifisering av kontinuerlig planktonsamler (Continuous Plankton Recorder (CPR) oppsatt med et 270  $\mu\text{m}$  nylonnett (Deagle et al., 2018)). Valg av innsamlingsredskap avhenger sterkt av måltaksa og målet for studien. I motsetning til vannprøver blir plankton bulk-prøver til miljø-DNA ofte fiksert på 95-96% etanol, men direkte frysing i -80°C er også rapportert (se for eksempel Djurhuus et al., 2018).

Effektiviteten av marint miljø-DNA-metastrekoding har blitt sammenlignet på tvers av prøvetyper av Massana et al. (2015), som analyserte taksonomisk mangfold av både planktoniske og bentiske protistsamfunn over tid og rom. De fant forskjellige artssammensetninger i vann og sediment, og også at samfunnssammensetningene varierte mellom forskjellige lokaliteter. I tillegg viste de at sesongvariasjon er en viktig faktor å ta i betraktning, og at mange replikater fra hver lokalitet er nødvendig for å kunne gi et godt og korrekt anslag av mangfold og samfunnssammensetning (Massana et al., 2015). Interessant nok viser studien også at sedimentprøver og vannprøver viser forskjellige resultat i samfunnssammensetning og variasjoner i rom og tid, noe som understreker behovet for at alle studier er optimalisert mot målgruppene.

Siden har Djurhuus et al. (2018) sammenlignet metastrekkoding av planktonprøver med morfologisk (tradisjonell) identifikasjon, i tillegg til de mulige forskjellene mellom direkte vannfiltrering, før-filtrering og bulk-plankton-metastrekkoding. De viser at forskjellige metastrekkodingsteknikker viser signifikante forskjeller i taksonomisk sammensetning, og at før-filtrering fører til mindre gjenkjenning av taksa enn andre metoder. Deagle et al. (2018) sammenligner plankton metastrekkoding med morfologisk identifikasjon, men denne studien er basert på prøver fra en CPR (kontinuerlig planktonsamler), et redskap som har blitt brukt til å karakterisere planktonmangfold i årtier. De viser at metastrekkoding øker antallet identifiserte arter og den taksonomiske oppløsningen, og ga flere datapunkter sammenlignet med tradisjoneller mikroskopteknikker. Samlet indikerer disse resultatene at potensialet som ligger i å bruke metastrekkoding, i tillegg til planktonovervåking som allerede finnes, er stort, men det vil forskyve perspektivet i biomangfoldstudiene hvis man integrerer molekylære metoder inn i det som nå er, og i lang tid har vært, et morfologisk forskningsområde. Dette vil potensielt ha effekt på lange tidsserier.

### 3.5.2 Protokoller for inbenthos prøvetaking (bløtbunn)

#### Mikrobielle bunnsamfunn

Innsamling av mikrobielle samfunn fra sediment gjøres ved å subsample (ta en bit av en større prøve) flere små replikater med volum på 2ml/4 g fra urørt toppsediment i en grabb eller en kjerneprøvetaker. Innsamlingsprosessen gjøres helst på is (4°C), og lagres i fryser (-20°C to -80°C) fram til ekstraksjon av DNA (Stoeck et al., 2018, Dowle et al., 2015). Alternative konserveringsvæsker: LifeGuard Soil Preservation Solution (MoBio).

#### Meiofauna fra bunndyrsamfunn

Relativt små prøver samles vanligvis ved hjelp av en liten sylindrisk kjerne eller en sprøyte rett fra miljøet i fjæreundersøkelser, eller fra (fler)kjernepøvetaker-kjerner i dyphavsundersøkelser. Prøvestørrelsen varierer mellom 5 til 10 cm i dybde og 2 til 3 cm i diameter (Faria et al., 2018, Rossel et al., 2019). Prøvene blir så bulkfiksert i store mengder 96% etanol eller alternative konserveringsvæsker som DESS (20% DMSO og 0,25M disodium EDTA, i en mettet NaCl-løsning, pH 8,0) (Yoder et al., 2006) og lagret på -20°C.

Etter fiksering blir meiofauna-størrelsesfraksjonen separert fra sedimentet gjennom flere trinn av dekantering og til slutt siktet gjennom en 45-63 µm sikt. Prøvene holdes på sikten til DNA-ekstraksjonen (Fonseca et al., 2017), eller de holdes på 96% etanol. Spesifikke metoder for å skille meiofauna fra sediment inkluderer Ludox TM 50 (spesifikk tetthet 1.18) (Heip et al., 1985), tetthets-gravitasjons-sentrifugering etter McIntyre og Warwick (1984) med Kaolin and Levasil® (Kurt Obermeier GmbH & Co. KG, Bad Berleburg, Germany).

#### Bentiske makrofaunasamfunn

En av hovedutfordringene ved innsamling av bentiske makrovertebrater fra infauna er det store volumet sediment som samles inn i alle standard verktøy (grabb, (multi)kjernetaker, boxcorer). På grunn av den flekkvise fordelingen av bentiske makrovertebrater må man samle inn relativt store områder (et par m<sup>2</sup>) for å kunne anslå lokalt artsmangfold. Store prøvevolum krever flere steg i prøvebehandlingen, spesielt hvis en har som mål å skille den organiske delen fra sedimentene. Men dette vil sørge for god konservering av DNA som kan gi en pålitelig representasjon av det bentiske samfunnet.

*Innsamling av sedimentlag.* Sedimentet samles ofte inn fra flere lag: 0-1 cm, 1-5 cm, 5-10 cm, 10-15 cm osv. Mesteparten av makrofauna er konsentrert i de øverste 1-2 cm sediment, dypere ned minker tettheten av dyr eksponentielt med sedimentdybden. Allikevel kan biomassen være ganske stor også i de dypere sedimentlagene, mye på grunn av at sjeldne men store gravende arter kan finnes der (Flach & Heip, 1996). Av praktiske grunner er det ofte lettere å ta prøver av individuelle



lag fordi topplagene som oftest har mye høyere mangfold i tillegg til at de ofte er enklere å håndtere enn de lavere mer kompakte sedimentlagene. Når man behandler topplaget separat vil man samtidig forsikre at majoriteten av artsmangfoldet blir behandlet skånsomt. Det er allikevel viktig å også behandle de dypere lagene, fordi gravende arter (spesielt fra gruppene Bivalvia (muslinger) og Annelida (flerbørstemark)) ofte er underrepresentert i de øvre lagene.

*Dekantering og sikting.* Prøvedekantering brukes til å skille de små og lette dyrene (ofte bløte organismer) fra de tyngre sedimentpartiklene. Prosessen repeteres flere ganger (opp til fem ganger) for å forsikre om at alle tilgjengelige lette dyr er skilt ut. Flere makrovertebratgrupper (for eksempel bløtdyr og en del flerbørstemark) har tunge skall, skjell og rør, og vil derfor være igjen sammen med sedimentene i løpet av dekanteringsprosessen. De må derfor skilles fra sedimentene forsiktig, og helst under en stereolupe. Sikting brukes ofte istedenfor, eller i tillegg til, dekantering. Mens mange miljø-DNA-studier av makrofauna bruker sifter med 0,50-1,00 mm hullstørrelse (Aylagas et al., 2016), har det blitt vist at bruk av finere sifter (0.25-0.30 mm) øker artsmangfoldet betraktelig, spesielt for grupper med mange små arter slik som flerbørstemark og krepsdyr (Pavithran et al., 2009). Slik vil finere sifter hjelpe med mer nøyaktig representasjon av artsdiversiteten i ekstrahert DNA.

*Konservering og lagringsforhold.* Dekantert og eller siktet organisk materiale må konserveres med en gang for å sikre helhetlig DNA/RNA. For DNA-ekstraksjon er den vanligste konserveringsvæsken 96-100% etanol eller andre væsker som er laget for å ta vare på både DNA og morfologi så som kombinasjoner av DMSO, EDTA og mettet salt (Yoder et al., 2006). Prøvene kan lagres fram til videre opparbeiding ved 4°C til -20°C. Konservering av RNA krever temperaturer på -70°C til -80°C og flytende nitrogen eller bruk av RNAlater®.

*Homogenisering.* Prøvehomogenisering (morter eller blender avhengig av sluttvolum) og påfølgende delprøvetakning av den homogeniserte prøven er ofte foreslått for å sikre representativiteten til alle artene som er tilstede i et stort prøvevolum. Mesteparten av de tilgjengelige DNA-ekstraksjonspakkene kan benytte et maksvolum på 10 g materiale og behandling av hele prøver i store volum er ikke praktisk. Allikevel anbefales DNA-ekstraksjon av minst to replikater fra hver homogeniserte prøve for å øke representativiteten. Tilstedeværelse av store (megafauna) arter i sedimentprøvene vil lett kunne føre til DNA-overrepresentasjon fra de artene det gjelder, og dette vil samtidig lett skjule tilstedeværelsen av mindre eller sjeldnere arter. Delprøver av store individ (bare noen kroppsdel) før homogenisering kan vurderes for å utjevne slik overrepresentering i de videre oppformeringsprosessene.

### 3.5.3 Protokoller for prøvetakning av hyperbenthos

Protokoller for hyperbenthos-innsamling til genetisk sekvensering av identifiserte taksa er beskrevet av Riehl et al., (2014). Bulk-prøver fra sleder kan benyttes til metastrekkoding på lik linje med bulk-prøver fra pelagialen (og da etter samme protokoller), men de vil vanligvis være særdeles rike på både artsmangfold og antall individer. Det er enda ingen publiserte egne protokoller for innsamling av miljø-DNA av hyperbenthos.

### 3.5.4 Protokoller for prøvetakning fra hardbunn

Fjæresonesamfunn og gruntvannssamfunn samles gjerne inn fra utplasserte kvadratiske rammer av forskjellig størrelse (for eksempel 25 x 25 cm) med hammer og meisel. Alle organismene fra en ramme fjernes fra underlaget og legges i en plastpose eller en annen boks. Hvis prøven har mye sediment kan den dekanteres eller siktes tilsvarende metodene beskrevet for bløtbunnsprøvetaking, gjennom en serie av sifter med stadig mindre hullstørrelse. Vannet som samles inn sammen med prøven bør siktes gjennom en fin sikt (63 µm hullstørrelse) og alt organisk innhold legges sammen med prøven. Prøvene konserveres i 96% etanol og lagres kaldt.

Innsamling av hardbunnssamfunn fra kunstige substrat kan gjøres ved hjelp av kunstige plater (“vekstplater”) eller system av plater som settes ut for en bestemt tidsperiode (månedes til år) i studieområdet. Et slikt system, ARMS - Autonomous Reef Monitoring Structures, har blitt testet med stort hell i naturlige østersseng-samfunn i vest-Atlanteren (Leray & Knowlton 2015) og på korallrev i det sentrale Rødehavet (Pearman et al., 2016). ARMS består av ti 22,5 × 22,5-cm PVCplater som har 1,27cm skiller mellom seg, og alle er forankret til en bunnplate. I annethvert lag er vannflyten mellom platene begrenset av stolper. Totalt overflateareal er 0,869 m<sup>2</sup> for hver ARMS, totalt volum mellom platene er 0,005 m<sup>3</sup> for hver ARMS. En nylig publisert studie av Obst et al. (2020) kombinerte genetiske studier med bildebasert identifisering ved hjelp av standard ARMS-metoder. De fant lite sammenfall mellom samfunnene som ble beskrevet ved hjelp av de to metodene, men foreslår heller at de kan supplementere hverandre.

### 3.6 Sammenligning av protokollene og generelle anbefalinger for prøveinnsamling

Det at hvert eneste marine miljø-DNA-studie er unik i utførelse, metodevalg og, til en viss grad, mål gjør det nesten umulig å sammenligne innsamlingsmetodene. Det er i tillegg, og kanskje mer urovekkende, svært mange studier som er grunnlagt på ufullstendig (om i det hele tatt) beskrevne metoder. Dette er en stor kilde til problemer som allerede er beskrevet i studier med miljø-DNA av terrestre og ferskvannssystemer (Dickie et al., 2018). Begrunnelsen for metodevalgene på tvers av alle studier med miljø-DNA er i all hovedsak ikke dokumentert, og som et resultat av dette er det ikke nok informasjon om studiene til at de kan repeteres av uavhengige forskere. Det er behov for et større fokus på grundig og korrekt rapportering av feltinnsamlingsmetoder og bakgrunnen for dem hvis fremtidige miljø-DNAstudier skal være robuste og reproducerbare. Innsamlingsmetodene må ikke bare rapporteres, men nøyaktige protokoller må utarbeides slik at man maksimerer innsamlingsuniverset og minimerer feilkilder og forurensing.

Selv om det ikke finnes en samlende universal innsamlingsprotokoll for alle marine miljø-DNA undersøkelser kan vi vise til en samling av “best bruk” og anbefalinger som alle marine miljø-DNA-innsamlingsplanleggere bør følge for å skaffe til veie høykvalitets reproducerbare data. En oppsummering av disse (basert på Dickie et al., 2018) vises i Tabell 3.1, og vi inviterer alle miljø-DNA-forskere til å vurdere disse punktene når de beskriver sine egne innsamlingsprinsipper for videre studier.

**Tabell 3.1. Spesifikke anbefalinger og eksempler på “best bruk” for valg av innsamlingsmetode for marine miljø-DNA-studier (modifisert fra Dickie et al., 2018)**

Problem	Anbefaling
Avgrensning av innsamlingsunivers	Uttalt definere hele det potensielle innsamlingsområdet og om det er noen utelukkelsesgrunner.
Plassering av innsamlingspunkt	Beskrive alle mulige plasseringer /lokalteter for innsamling etter en tydelig målbeskrivelse (for eksempel nettbasert eller totalt tilfeldig). Ideelt også utføre en pilotstudie for å finne ut optimale prøvetakningslokaliteter.
Antall prøver og replikater	Utfør en <i>a priori</i> kraftanalyse ved hjelp av SOFM rammeverk for å kartlegge nødvendig antall replikat. Ideelt også utføre en pilotstudie for å finne optimalt prøveantall, avhengig av variabilitet og representasjon.
Prøvevolum	Sikre tilstrekkelig volum for mulige gjen-ekstraheringer av DNA samt langtidsarkivering. For sjøvannsprøver bør dette være minimum 1L prøve etter dagens standarder, men større volum øker sannsynligheten for å finne totalt mangfold.
Oppkonsentrasjon av miljø-DNA	Bruk enten utfelling eller filtrering. Filtertype og porestørrelse avhenger av mål for studien, måltaksa og habitat.
Forurensing på tvers av prøvene	Bruk sterile eller engangs-verktøy, eller bruk 10% klor for felt-rensing med tilstrekkelig eksponeringstid. Inkluder innsamling av negative feltkontroller.
Miljø-DNA nedbryting	Konserver eller frys prøvene så fort som mulig.
Tilstrekkelig rapportering	Rapporter metadata sammen med resultatene. Forsikre at innsamlingsmetodene er fullstendig dokumentert i publikasjonen(e).

## 4. ANALYSER AV MILJØ-DNA I MARINT MILJØ

Av ulike grunner er det foreløpig vanskelig å foreslå en generell beste praksis for marin miljøovervåking og forvaltning basert på miljø-DNA. Den første utfordringen er mangfoldet av biomer, økosystemer, samfunn og taksa i marine systemer. For det andre vil ulike stadier av miljø-DNA og potensielle anvendelser ha ulike målsetninger, alt etter hvilke spørsmål de skal besvare. Selv med overlappende mål, er det dessuten vanskelig å sammenligne eksisterende studier på grunn av det metodiske mangfoldet i prøvetaking, sortering, filtrering og molekylære metoder.

En viss felles forståelse av beste praksis med spesielle molekylære metoder, eksperimentelle oppsett og bruk av passende kontroller synes å være i fremvekst (se f.eks. Zinger et al., 2019, for metastrekkoding-studier). Det er også en viss konsensus om hvilke områder som krever videre forskning for å fremskaffe representative og repeterbare DNA-data som kan gi robuste tolkninger av økologisk tilstand i marint miljø (Hansen et al., 2018; Yates et al., 2019; Eble et al., 2020). Likevel vil betraktninger basert på spesifikke applikasjoner i bestemte habitater uunngåelig være kontekststøttet og alltid måtte bli vurdert med hensyn til ønsket forvaltningsmål.

I den følgende delen sammenligner vi først tradisjonelle metoder og miljø-DNA-metoder, når det gjelder viktigste egenskaper, særlige fordeler og problemer. Deretter diskuterer vi metodologiske særtrekk over et spekter av molekylære og statistiske analyser av miljø-DNA og effekter de kan ha for tolking av data. Til slutt gir vi en oversikt over aktuelle applikasjoner og deres begrensninger, spesifikt med tanke på to brede områder som er mest relevante for miljøovervåking og forvaltning: Det ene området er spesifikt målrettet mot gitte taksa, som av ulike grunner har særlig interesse for forvaltningen. Det kan være sjeldne, truede, invasive, patogene organismer (eller arter som forventes å ha inngripende effekt på et økosystem). Det andre området har et bredt mangfoldsperspektiv og arbeider med karakterisering og vurdering av biologisk mangfold, for eksempel i anvendt samfunnsøkologi og for konsekvensutredning og overvåking av økosystemer.

Nyere studier har fokusert på marint miljø-RNA (eRNA), i stedet for miljø-DNA (Keeley et al., 2018; Wood et al., 2020). Tenkningen bak slike studier er at DNA kan være transportert fra andre steder og at miljø-RNA kan gi et riktigere bilde av hvilke organismer som er tilstede i et avgrenset miljø til en viss tid. Dette skyldes de biokjemiske egenskapene til de to typene molekyler. Enkeltstreng RNA har svakere kjemiske bindinger og brytes derfor ned mye raskere enn dobbeltstreng DNA. Likevel fant Wood et al. (2020) overraskende like nedbrytningshastigheter mellom miljø-DNA og miljø-RNA. Fordi miljø-RNA er et relativt nytt forskningsområde i biomangfoldsstudier, fokuserer vi her på miljø-DNA. De generelle prinsippene vi diskuterer er likevel passende for fremgangsmåter basert på data fra begge molekylgrupper.

### 4.1 Forskjeller i data fra undersøkelser med miljø-DNA og tradisjonelle metoder

Miljø-DNA-data kan anvendes til å karakterisere biomangfold og/eller påvise organismenes tilstedeværelse basert på analyse av nukleinsyreinnholdet i en miljøprøve samlet fra et bestemt habitat/sted/lokalitet osv. Til forskjell fra dette, er tradisjonelle data basert på direkte

observasjon og/eller prøvetaking av organismer fra et bestemt habitat/sted/lokalitet osv. Mange spørsmål knyttet til tid og rom må vurderes ved valg av protokoller for prøvetaking (f.eks. for å sikre tilstrekkelige biologisk replisering på en skala som samsvarer med den naturlige variasjonen). En må også ivareta behovet for tilstrekkelig kompetanse og opplæring, som bidrar til kvaliteten på begge typer datasett. I tillegg kan mange laboratorie- og bioinformatiske beslutninger ha innflytelse på kvaliteten til et miljø-DNA-datasett. Den kanskje største og mest håndgripelige forskjellen mellom miljø-DNA og tradisjonelle data knyttet til beslutninger om miljøtiltak er innebygd i deres definisjoner. Med et gitt utvalg prøver miljø-DNA kan måltaksa påvises, og individmengder (abundans) eller diversitet kan estimeres og *fortolkes*. Men, med tradisjonell datainnsamling kan individer av arter *identifiseres* og telles for utregning av individtall og diversitet. Dette skillet mellom tradisjonell prøvetaking og slutninger basert på miljø-DNA-data oppstår fordi, selv med de strengeste, standardiserte og validerte laboriemetodene, omfatter den biologiske tolkningen av miljø-DNA-data mange særlige hensyn. Dette kan være taksonomisk variasjon i tid og rom i primære og sekundære kilder til DNA i prøvene. Mangelen på klar definisjon av tidsmessige og romlige skalaer for dynamikken i miljø-DNA-signaler gjør utledning av miljøstatus forskjellig sammenlignet med tradisjonelle metoder (se avsnitt 1).

I Tabell 4.1a og 4.1b oppsummerer vi muligheter, fallgruver, og produkter av tradisjonelle metoder og miljø-DNA-metoder, gitt dagens tekniske og generelle mål for miljøforvaltning og overvåking. Mange av de generelle fordelene med DNA-metoder kommer fra at de nå er relativt lett tilgjengelige, har høy følsomhet, raske omsetningstider fra feltinnsats til data og potensielt, ubegrenset taksonomisk omfang. Dette gir løfte om relativt lave kostnader og svært skalerbare metoder. Tradisjonelle metoder har ofte lavere følsomhet, som ofte fører til lavere estimater av biomangfoldet, stiller høyere krav til arbeidsinnsats og spesialisert taksonomisk ekspertise, som kanskje ikke er lett tilgjengelig. Høyere tilknyttede kostnader for logistikk- og arbeidskraft kan bety redusert taksonomisk omfang av undersøkelsene, langsommere progresjon fra felt til resultater og påfølgende begrenset skalerbarhet.

**Tabell 4.1a**

Sammenligning av kvaliteter ved metoder for marint miljø-DNA og tradisjonelle metoder relevante for miljøforvaltning og overvåkning. Bruksområde: Søk etter måltakson (for eksempel invasiv, patogen eller sjelden art) hvor miljø-DNA metode er artsspesifikk PCR og tradisjonelle metoder er feltinnsamling og/eller sortering og identifikasjon av prøver. Forhold er listet som positive (+), nøytrale (n) eller negative (-).

Aspekt	Miljø-DNA	Tradisjonelle metoder
<b>Tid og kostnad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mulig å benytte eksisterende data (lave initiale utviklingskostnader) (+)</li> <li>• Rask prøvetagning/ feltinnsats (+)</li> <li>• Rask omsetning fra felt til resultater (+)</li> <li>• Lave kostnader (opplæring i molekylære metoder) (+)</li> <li>• Lave kostnader for anvendelser (+)</li> <li>• Lave lønnskostnader (+)</li> <li>• Moderate utviklingskostnader (n)</li> <li>• Omfattende validering kreves for hver applikasjon (øker tidsforbruk og totale utviklingskostnader) (-)</li> </ul>	<p>Enten</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rask omsetning fra felt til resultater (feltobservasjoner) (+)</li> </ul> <p>eller</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sen omsetning fra felt til resultater (laboratoriearbeid med feltprøver) (-)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Omfattende innsamling/ feltinnsats kreves (-)</li> <li>- Høye kostnader (logistikk og arbeid) (-)</li> </ul> </li> </ul>
<b>Tilgang</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tilgjengelig utstyr og ekspertise (molekylærlaboratorier og kompetanse) (+)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variabel, avhengig av nødvendig trening for pålitelige feltobservasjoner og/eller laboratorteknikk (n)</li> </ul>
<b>Skalering</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mulig å anvende over et bredt felt av tid og rom pga. lave kostnader til utvikling, anvendelse og arbeidsinnsats (+)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Begrenset av kostnader for logistikk og arbeid (-)</li> </ul>
<b>Sensitivitet</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ekstrem sensitivitet (+)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lav sensitivitet (-)</li> </ul>
<b>Kvalitativ/kvantitativ*</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Taksa tilstede/ikke tilstede (n)</li> <li>• Sjelden kvantitativ (krever omfattende validering) (-)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kvantitativ som følge av innsamlingsmetode (+)</li> <li>• Taksa tilstede/ikke tilstede (n)</li> </ul>
<b>Viktigste fordeler</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rask utvikling og anvendelse, lave kostnader, høy tilgjengelighet, skalerbarhet og sensitivitet (+)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kvantitativ, veldefinerte rammer for tid og rom, evne til å skjelne mellom livsstadier og morfologiske særtrekk (+)</li> </ul>
<b>Viktigste begrensninger</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sjelden kvantitativ, usikker skala i tid og rom, kan ikke skille livsstadier og morfologiske særtrekk (-)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Høye kostnader, liten skalerbarhet og sensitivitet (-)</li> </ul>

\*Med kvantitativ menes et mål for eukaryot individmengde (abundans) eller biomasse. Selv om noen metoder, slike som ddPCR muliggjør presis kvantifisering av DNA-templat i en prøve, er samsvaret mellom DNA-kvanta og organismens abundans eller biomasse sjelden kjent.

**Tabell 4.1b**

Sammenligning av kvaliteter ved metoder for marint miljø-DNA og tradisjonelle metoder relevante for miljøforvaltning og overvåkning. Bruksområde: karakterisering av diversitet (kartlegging, samfunnsøkologi, konsekvensutredning/overvåking) hvor miljø-DNA metode er metastrekkoding/metagenomikk og tradisjonelle metoder er feltundersøkelser og/eller manuell sortering og identifikasjon av prøver. Forhold er listet som positive (+), nøytrale (n) eller negative (-).

Aspekt	Miljø-DNA	Tradisjonelle metoder
<b>Tid og kostnad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mulighet for utnytting av eksisterende data (lave initiale kostnader) (+)</li> <li>Rask feltinnsats (+)</li> <li>Rask-moderat omsetning fra felt til resultater (+)</li> <li>Lave arbeidskostnader (+)</li> <li>Moderate opplæringskostnader (i molekylære metoder, bioinformatikk) (n)</li> <li>Moderate utviklingskostnader (n)</li> <li>Moderate anvendelseskostnader (fler-steps laboratorieprosedyrer, DNA sekvenseringskostnader) (n)</li> <li>Omfattende validering kreves for alle applikasjoner, som øker tid og kostnader (høye totale kostnader) (-)</li> </ul>	<p>Enten</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Rask omsetning av resultater fra felt (feltobservasjoner) (+)</li> </ul> <p>eller</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Sen omsetning (ved laboratoriearbeid på feltprøver) (-) <ul style="list-style-type: none"> <li>Omfattende innsamling/ feltinnsats kreves (-)</li> <li>Omfattende taksonomisk ekspertise kreves (høye utviklingskostnader) (-)</li> <li>Høye kostnader for gjennomføring (logistikk og arbeid) (-)</li> </ul> </li> </ul>
<b>Tilgang</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tilgjengelig utstyr og ekspertise (molekylærlaboratorier og kompetanse) (+)</li> <li>Noe moderat tilgjengelig kompetanse (bioinformatikk) (n)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Liten tilgang pga. krav til taksonomisk kompetanse (-)</li> </ul>
<b>Skalering</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kan brukes over stor skala pga. lave kostnader til utvikling, utførelse, arbeid. Kan potensielt brukes for alle taksonomiske grupper (+)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Begrenset av kostnader til logistikk og arbeidsinnsats. Krav til taksonomisk ekspertise begrenser anvendelser til de grupper der slik kompetanse er tilgjengelig (-)</li> </ul>
<b>Sensitivitet</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ekstrem sensitivitet (+)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lav sensitivitet (-)</li> </ul>
<b>Kvalitativ/kvantitativ*</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Taksa tilstede/ikke tilstede (n)</li> <li>Sjelden kvantitativ (krever omfattende validering) (-)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kvantitativ i kraft av innsamlingsmetode (+)</li> <li>Taksa tilstede/ikke tilstede (n)</li> </ul>
<b>Viktigste fordeler</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rask utvikling og utførelse. Høy tilgjengelighet, skalerbarhet og sensitivitet (+)</li> <li>Kan oppdage taksa uten taksonomisk ekspertise (+)</li> <li>Utvidet taksonomisk omfang med marginale kostnadsøkninger (+)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kvantitativ, veldefinerte rammer for tid og rom, evne til å skjelle mellom livsstadier og morfologiske særtrekk (+)</li> </ul>
<b>Viktigste begrensninger</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sjelden kvantitativ, usikker skala i tid og rom, kan ikke skille livsstadier og morfologiske særtrekk (-)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Høye kostnader, liten skalerbarhet og sensitivitet (-)</li> <li>Måltaksa begrenset av tilgjengelig taksonomisk ekspertise (-)</li> <li>Utvidet taksonomisk ramme gir økte utgifter (krever økning i aktivt personale) (-)</li> </ul>

\*Med kvantitativ menes et mål for eukaryot individmengde (abundans) eller biomasse. Selv om noen metoder, slike som ddPCR muliggjør presis kvantifisering av DNA-templat i en prøve, er samsvaret mellom DNA-kvanta og organismens abundans eller biomasse sjelden kjent.

Det er ingen tvil om at miljø-DNA-metoder har bred appell. Imidlertid er det tre kritiske områder der de er forskjellige fra tradisjonelle metoder og som kan ha betydning for beslutninger som angår overvåkning og forvaltning. For det første er tolkningen av observerte taksa og mangfold relativt entydig med tradisjonelle metoder, sammenlignet med DNA-metoder, selv om en også her erkjenner mulige prosessfeil, som f.eks. feilidentifisering av taksa. Innenfor tradisjonelle metoder er dermed rammen for biologisk tolkning av data i tid og rom forstått som relativt entydig, gitt av oppsettet for prøvetaking. Dette er ikke tilfelle for mange anvendelser av miljø-DNA uten grundig forhåndsvalidering.

For det andre, sammenlignet med tradisjonelle metoder kan miljø-DNA-metoder ikke skjelne mellom livshistoriestadier (f.eks. voksne, larver, gameter) og andre egenskaper av primær biologisk betydning (f.eks. størrelse, alder, kjønn). Slike data kan være avgjørende i visse forvaltnings- og overvåkingssammenhenger. Dessuten kan tradisjonelle metoder lett skaffe håndgripelige mål på individtall, ganske enkelt fordi enkeltindivider blir identifisert ved observasjon eller prøvebehandling. Dette er ikke nødvendigvis tilfelle med miljø-DNA-data.

Det finnes absolutt tilfeller av fortolkede sammenhenger mellom mengder av miljø-DNA og abundans eller biomasse (f.eks. Thomsen et al., 2016; Salter et al., 2019), men de er vanligvis begrenset til bestemte eksperimentelle eller feltsituasjoner der generelle forhold er uklare. Det er også slik at for hver studie som viser korrelasjon mellom miljø-DNA-mengder og abundans eller biomasse i felt, er det andre studier som ikke viser noen sammenheng. I noen tilfeller viser studiene også blandede resultater (f.eks. Knudsen et al., 2019). De fleste studier som viser slike korrelasjoner er eksperimentelle og har brukt artsspesifikke tilnærminger med kvantitativ PCR (qPCR) eller digital PCR (ddPCR) for å sammenligne abundans innenfor arter snarere enn mellom arter (Yates et al., 2019). For metastrekkoding er det stor variasjon i studier som evaluerer kvantitative aspekter, og selv om det, innen visse taksa, kan være sammenhenger mellom avleste sekvensmengder og organismeantall eller biomasse, er forbindelsene mellom taksa og hvordan de varierer uklare. Flere parametere som ikke har noen sammenheng med relativ mengde molekyler i DNA-ekstrakter kan påvirke mengden avleste sekvenser. Primer-bias, reaksjonstemperaturer og antallet PCR-sykluser, valget av DNA-polymerase, og til og med egenskapene til molekylene i seg selv (f.eks. GC-innhold) kan påvirke mengden av sekvenser slik at den varierer ukontrollert mellom prøver og ikke gjenspeiler den sanne mengden av DNA i miljøprøven. Derfor er forholdet mellom sekvenser og abundansen eller biomassen av organismene vanligvis udefinert (Nichols et al., 2018).

På samme vis som med artsspesifikke tilnærminger, er det vanskelig å trekke generell lærdom fra funn med ulike feltsituasjoner og metodiske parameterforskjeller, med mindre repeterbarheten for eksperimentene er spesifikt validert. Følgelig antyder vekten av bevis at datasett fra metastrekkoding bare skal behandles som påvisninger av arter som enten er tilstede eller mangler (presence-absence data), og ikke som abundansdata (Yu et al., 2012; Nichols et al., 2018; West, 2020), med mindre de er validert på annen måte. Dette har også konsekvenser for de analytiske metodene som er tilgjengelige for å analysere DNA-data sammenlignet med tradisjonelle metoder, som har iboende mål for abundans (se avsnitt 4.2.4).

Alt dette betyr ikke at problemene med fremskaffelse og tolkning av miljø-DNA-data er uoverkommelige. Alle metoder, inkludert enhver tradisjonell metode, har også iboende feil og skjevheter. Miljø-DNA-metoder er, slik sett, ikke forskjellige. De har rett og slett sine egne sett med iboende feil og skjevheter, som ikke er uoverkommelige, men som heller ikke må



ignorerer. I noen slike anvendelser er det viktig å kunne påvise at biologisk materiale fra bestemte taksa er tilstede. Å kunne påvise, for eksempel, invasive arter eller indikatorarter for en miljøtilstand er viktig informasjon for eventuelle forvaltningstiltak. Som vist i avsnitt 4.3, finnes det absolutt vellykkede anvendelser av marine miljø-DNA-teknikker som er svært relevante for forvaltning og overvåking. Det er også sannsynlig at målrettet forskningsinnsats kan utbedre eller fjerne flere av manglene ved de metodene som sikter mot spesifikke studiesystemer med betydning for miljøforvaltning. Disse punktene er ganske enkelt illustrerende for generelle fordeler og ulemper ved å benytte miljø-DNA-metoder, sammenlignet med tradisjonelle metoder. De påpeker behovet for validering og standardisering av molekylære metoder. De må vurderes når det gjelder forvaltnings- og overvåkingsformål for den spesifikke konteksten de er anvendt, og i lys av de begrensningene som finnes for de spesifikke molekylære metodene som er i bruk.

## 4.2 Metodologiske betraktninger

Ettersom viktige aspekter ved prøvetaking, substratinnsamling, kontamineringskontroll og replisering ble diskutert i avsnitt 3, vurderer vi her viktige hensyn for marint miljø-DNA for laboratorier; sette sammen og generere data og metoder for dataanalyse. Som med andre aspekter av dette brede forskningsfeltet, er mangfoldet av laboratoriemetoder, bioinformatiske rutiner, og statistiske analyser nesten like stort som antall publikasjoner i den marine miljø-DNA-litteraturen. Hver forskergruppe har gjennomgående sine egne, foretrukne tilnærminger. Uavhengig av tolkningsproblemer må resultater for molekylbasert overvåking være repeterbare, sammenlignbare i tid og rom, og gi en sann (eller kjent skjev) representasjon av måltaksa (Aylagas et al., 2020; Pearman et al., 2020). Samtidig er det klart at selv små avvik i laboratorieprotokoller kan resultere i data som ikke er sammenlignbare mellom studier eller til og med prøvetakinger (Kelly et al., 2019).

Alt dette peker mot det gjennomgående kravet til streng eksperimentell validering, mot metodisk optimalisering og, viktigst av alt, mot påfølgende standardisering av metoden for en bestemt applikasjon. For å etablere og bruke standardiserte protokoller for deteksjon av arter med miljø-DNA, kan det hende at en også må foreta eksperimenter og annen datainnsamling for å parametrisere modelleringsmetoder (se avsnitt 4.2.4). Hvis det er nødvendig å sammenligne med eksisterende data, er kalibreringer av miljø-DNA-data med tradisjonelle data også påkrevd (Aylagas et al., 2020). I praksis kan dette være vanskelig å oppnå, da det ennå er få forsøk eller overbevisende eksempler på dette i marin litteratur.

I stedet for å gi en omfattende litteraturgjennomgang av alle marine miljø-DNA-metoder, er formålet med denne delen derfor å fremheve særlige hensyn ved viktige trinn i flyten av datagenerering og -analyser, slik at en kan sikre at data er så repeterbare, sammenlignbare og representative som mulig, og at passende statistiske metoder brukes, uavhengig av det spesifikke habitat, taksa eller molekylære teknikker som benyttes. Fordi det, for tiden, er svært få studier av makroorganismer som bruker metagenomiske fremgangsmåter, legger vi her vekt på PCR-diagnostiske teknikker og arbeidsflyten med metastrekkoding.

### 4.2.1 DNA-ekstraksjon

Som det første trinnet mot en hvilken som helst miljø-DNA-analyse i laboratoriet, er det viktig at DNA-ekstraksjonsmetoden er optimalisert, med tanke på substrattypen (f.eks. vann eller sediment). Målene for studien må også være bestemt (f.eks. makrobiologiske eller mikrobiologiske måltaksa). Hvis et miljøsubstrat er prøvekilden (dvs. vann eller sediment),

må en vurdere fra starten av om den tiltenkte målfraksjonen er ekstracellulært DNA eller totalt DNA. Dette er fordi dette vil avgjøre om et cellulært lyseringstrinn skal inkluderes i DNA-ekstraksjonsprotokollen (Taberlet et al., 2018). Generelt, hvis det er totalt DNA i filtrerte vannprøver som er målet, finnes det optimaliserte protokoller tilgjengelig for spesifikke filtertyper (f.eks. Spens et al., 2017 for Sterivex-GP polyetersulfon-filtre). For andre filtertyper er reagenser ofte hentet fra kjente DNA-ekstraksjons-sett (f.eks. Qiagen DNeasy-sett eller lignende) og protokollene for disse settene er endret i henhold til spesifikke filtre. Slike tilfeller ser generelt ut til å være tilstrekkelige for å isolere DNA av høy kvalitet for nedstrøms analyse. Selv om dette ligner på de fleste andre laboratoriehensyn, understreker forfatterne at det er viktig å teste og optimalisere protokoller for det spesielle studiesystemet som foreligger (Taberlet et al., 2018; Kumar et al., 2020).

En ekstra kompleksitet gjør seg gjeldende med sedimentprøver, fordi det er stor variasjon i sedimentets fysiske og kjemiske egenskaper (Taberlet et al., 2018; Pearman et al., 2020). Dette kan påvirke absorpsjon og bevaring eller nedbrytning av DNA (Dell'Anno et al., 2002). En ytterligere vurdering av sedimentprøver er at de kan inneholde høye nivåer av PCR-hemmere, slik som humussyrer, som krever fjerning under DNA-ekstraksjon (Taberlet et al., 2018). Pearman et al. (2020) viste at bruk av forskjellige kommersielle DNA-ekstraksjons-sett på samme sedimentmasse produserte signifikant forskjellige målinger av prokaryot og eukaryot mangfold. Mens Pearman et al. (2020) anbefaler et bestemt kommersielt sett for sedimenter fra marin oppdrett (dvs. oppdrettsanlegg for laksefisk), kan det, på grunn av den store romlige variasjonen i sedimentegenskaper, igjen være behov for å teste flere DNA-ekstraksjons-metoder, for å finne den som er optimal for de spesifikke fysiske og kjemiske egenskapene på bestemte studie-lokaliteter.

I tillegg til DNA-ekstraksjon av feltinnsamlede prøver som kontrollerer for krysskontaminering under feltarbeid, anbefales det også å inkludere kontrollprøver under DNA-ekstraksjons-fasen. Det vil si en DNA-ekstraksjon uten utgangsmateriale og bare laboratorieutstyr og reagenser som brukes til andre DNA-ekstraksjoner. Dette gjør det mulig å avsløre om kilden til eventuelle kontamineringer er i reagenser og labutstyr eller de innsamlede prøvene. Det gir dermed rom for å isolere spesifikke kontamineringskilder og dermed til påfølgende forbedring av arbeidsflyt og sluttdata.

#### 4.2.2 PCR-basert arbeidsflyt

Et viktig aspekt ved enhver PCR-basert metode er validering av PCR-primere. For PCR-diagnostiske fremgangsmåter som enten skal påvise om et takson er tilstede eller måle mengden av DNA i et templat, er det viktig at PCR-primere er spesifikke bare for måltaksonet, slik at en unngår såkalt falske positive, det vil si oppkonsentrerte sekvenser fra andre organismer enn målgruppen. Dessuten må PCR-protokoller være følsomme nok til å oppdage mål-DNA i lave konsentrasjoner (Eble et al., 2020). Dette krever først *in silico*-analyser som undersøker hvor spesifikt et primerpar er mot sekvensdatabaser (f.eks. NCBI). Til dette kan en bruke verktøy som Primer-BLAST (Ye et al., 2012) og/eller bioinformatisk programvare som ecoPCR (Ficetola et al., 2010). Ytterligere empirisk validering for både spesifisitet og følsomhet er også nødvendig ved testing av DNA-fortynninger av mål-taksa og nært beslektede arter som forekommer i samme miljø som målgruppen. Falske negativer innebærer at målgruppen ikke kan påvises. De er mer problematiske, fordi de kan oppstå på grunn av en hvilken som helst kombinasjon av biologiske, miljømessige faktorer og laboratorieprosesser (Furlan et al., 2016; Pinfield et al., 2019). Utover disse tiltakene og prøvetakingen på passende skalaer og med passende volumer og replikater (Furlan et al.,

2016), kan problemet med falske negativt innlemmes i statistiske rammer som eksplisitt modellerer sannsynligheter for at målgruppen oppdages (detekteres) (se avsnitt 4.2.4).

For metastrekkoding innebærer primer-validering å sikre at PCR-primere for utvalgte markører oppkonsentrerer de forventede måltaksa. Det er viktig å forsøke å begrense ikke-spesifikk amplifikasjon, men det legges uunngåelig mindre vekt på dette, fordi gruppespesifikk PCR-amplifisering krever primere som binder seg til konserverte regioner i målsekvensene. Evaluering av primere innebærer igjen analyse mot sekvensdatabaser, ved bruk av tilpasset programvare og empiriske studier, for å bekrefte amplifikasjon av måltaksa og analysefølsomhet. Selv om visse PCR-primersett for metastrekkoding kan synes velbrukte i litteraturen, er begge disse valideringstrinnene fortsatt sterkt anbefalt for nye applikasjoner (f.eks. Schenekar et al., 2020). På grunn av det høye mangfoldet i marine miljøer, kan slike analyser avsløre viktige avvik ved lokal bruk av kjente protokoller, bidra til sammenligninger og til å velge PCR-primersett som passer bedre til lokale forhold.

Tekniske replikater av PCR-analyser (dvs. flere PCR-analyser per prøve) anbefales i alle PCR-baserte applikasjoner, ettersom det er godt dokumentert at individuelle PCR-reaksjoner varierer stokastisk (Taberlet et al., 2018). Tekniske replikater tillater også evaluering av de laboratorieprosedyrene som setter opp PCR-eksperimenter (f.eks. pipettering og andre systematiske feil). Det gir innsikt i konsistensen i resultatene og letter estimering av usikkerhet i qPCR- eller ddPCR-analyser som sikter mot å kvantifisere DNA-templat og minimere falske negativt når DNA-konsentrasjoner er lave (Prosser, 2010; Ficetola et al., 2015). Det anbefalte antall tekniske replikater varierer, men er generelt ikke lavere enn tre (Rees et al., 2015) og kan være så høyt som 12 for PCR-diagnostiske analyser der sannsynlighetene for deteksjon er lave (Ficetola et al., 2015; Valentini et al., 2016).

For arbeidsflyten i metastrekkoding anbefales det videre at PCR-replikater indekseres separat, slik at resultatene av individuelle PCR-er kan undersøkes etter demultiplesering av sekvensdata. Mens PCR-replikasjoner rutinemessig kombineres i mange metastrekkodingstudier, tillater separate indeksering at avvikende PCR-replikater kan forkastes på grunn av systematiske feil. Det kan også lede til at hele prøver forkastes på grunn av uakseptabel variasjon mellom alle PCR-replikatene (Taberlet et al., 2018). Det letter også bioinformatiske prosedyrer som kurterer sekvensvarianter i henhold til deres fordeling i og mellom tekniske replikater og på tvers av prøver (Frøslev et al., 2017; Alberdi et al., 2018).

Gitt de ovennevnte punktene for validering av PCR-primere, kan verdien av omfattende referansebiblioteker ikke overvurderes. De legger til rette for alle de ovennevnte *in silico*-analyser, som er avgjørende for både å designe analyser og å fremvise potensielle skjevheter med en hvilken som helst PCR-analyse. De er også essensielle for at DNA-sekvenser skal identifiseres til taks. For prosjekter med metastrekkoding, er det generelt anbefalt at forskere samarbeider med taksonomiske eksperter for å sekvensere lokale biota (Porter & Hajibabaei, 2018b).

Tekniske replikater av PCR-analyser (dvs. flere PCR-analyser per prøve) anbefales i alle PCR-baserte applikasjoner, ettersom det er godt dokumentert at individuelle PCR-reaksjoner varierer stokastisk (Taberlet et al., 2018). Tekniske replikater tillater også evaluering av de laboratorieprosedyrene som setter opp PCR-eksperimenter (f.eks. pipettering og andre systematiske feil). Det gir innsikt i hvor konsistente resultatene er og letter estimering av usikkerhet i qPCR- eller ddPCR-analyser som sikter mot å kvantifisere DNA-templat og minimere falske negativt når DNA-konsentrasjoner er lave (Prosser, 2010; Ficetola et al.,

2015). Det anbefalte antall tekniske replikater varierer, men er generelt ikke lavere enn tre (Rees et al., 2015) og kan være så høyt som 12 for PCR-diagnostiske analyser der sannsynlighetene for deteksjon er lave (Ficetola et al., 2015; Valentini et al., 2016).

For arbeidsflyten i metabarkoding anbefales det videre at PCR-replikater indekseres separat, slik at resultatene av individuelle PCR-er kan undersøkes etter demultipleksing av sekvensdata. Mens PCR-replikasjoner rutinemessig kombineres i mange metabarkodingstudier, tillater separat indeksering at avvikende PCR-replikater kan forkastes på grunn av systematiske feil. Det kan også lede til at hele prøver forkastes på grunn av uakseptabel variasjon mellom alle PCR-replikatene (Taberlet et al., 2018). Det letter også bioinformatiske prosedyrer som kuraterer sekvensvarianter i henhold til deres fordeling i og mellom tekniske replikater og på tvers av prøver (Frøslev et al., 2017; Alberdi et al., 2018).

Bruk av kontroller for alle PCR-eksperimenter er også avgjørende for kvalitetskontroll (Zinger et al., 2019). I det minste bør disse inkludere flere negative kontroller (dvs. hvor prøve-DNA erstattes med det samme DNA-frie vannet som brukes til oppsett av eksperiment) for å overvåke for kontaminering på lavt nivå og positive kontroller. Fortynningsserier av prøver kan være en god indikator for effekter av PCR-hemmere. Det kan også være god praksis å inkludere en positiv kontroll for vidtrekkende primere (avhengig av målgruppe, f.eks. eukaryot, bakterier osv.) for å få bekreftet at prøven, i det minste, inneholder amplifiserbart DNA (Furlan & Gleeson, 2017). Positive kontroller kan også bestå av bekreftet kvalitets-DNA fra måltaksa eller et konstruert “jukse-samfunn” (mock-sample) av DNA fra flere taksa, når formålet er metastrekkoding (Taberlet et al., 2018). Positive kontroller gjør det mulig å eliminere muligheten for at PCR som ikke gir resultater skyldes systematiske feil. Dessuten kan det gi en kjent referanse når sekvenseringsdata fra av metastrekkoding filtreres bioinformatisk for å redusere PCR- og sekvenseringsfeil (Coissac et al., 2012; Taberlet et al., 2018). For metastrekkodingstudier som bruker den samme indekseringssekvensen forover eller bakover til multipleksing, kan det også være en form for kryssprøvekontaminering i indekserings- eller sekvenseringsfasen av eksperimenter. Dette er kjent som “tag-jumping” (Schnell et al., 2015; Carøe & Bohmann, 2020), der DNA-sekvenser som stammer fra en prøve/PCR, til slutt blir bioinformatisk tilordnet en annen prøve/PCR. Med mindre det brukes spesifikke indekseringsstrategier som dramatisk reduserer (f.eks. Carøe & Bohmann, 2020) eller ekskluderer denne muligheten (Axtner et al., 2019), anbefales det at det også brukes kontroller for indekseringssystemer for å kvantifisere “tag-jump”-frekvenser (Taberlet et al., 2018). For metastrekkoding kan interne standarder (ISDs (Harrison et al., Nd) bestående av lett identifiserbare templat, som ikke er relatert til systemet som studeres (men kan PCR-amplifiseres), også brukes til kvantifisering av mål-DNA på tvers av prøver (Taberlet et al., 2018) og kontroll for eksperimentelle effekter på tvers av prøver og eksperimenter, slik som variasjon i sekvenseringsdybden (se Ji et al., 2020 for metagenomisk eksempel) polymerase-feilrate osv.

En siste bekymring i laboratoriet er at typen sekvensering som brukes til metastrekkoding påvirker resultater og de bioinformatiske rutiner som senere skal brukes. Dette er fordi forskjellige sekvenseringsteknologier har forskjellige egenskaper og feilrater. Det er vanlig å anta at sekvensering til større dybde (dvs. å produsere flere sekvensavlesninger per PCR eller per prøve) gir større mangfold, selv om gevinstene er marginale forbi et karakteristisk asymptotisk punkt for sekvenseringsdybde er marginalt. Flertallet av studiene benytter Illumina “paired-end”-sekvensering (der amplikoner sekvenseres fra begge ender, vanligvis helt eller delvis overlappende) og sikter mot rundt 20 000 - 60 000 DNA-sekvenser per PCR eller prøve. Selv om det sjelden blir vurdert, ser det også ut til at små forskjeller i

sekvenseringsteknologi også kan endre de endelige resultatene. En nylig studie av marint miljø-DNA har vist at sekvensering ved bruk av Illumina NovaSeq-plattformen resulterte i høyere oppdaget mangfold enn den mer brukte MiSeq-plattformen på tilsvarende sekvenseringsdybde. Sannsynligvis skyldes dette maskinvareforskjeller på de to plattformene (Singer et al., 2019). For studier som tar sikte på å maksimere oppdagelsen av mangfold, ser det derfor ut til at både sekvenseringsdybde og sekvenseringsplattform er viktige hensyn.

### 4.2.3 Bioinformatikk for metastrekkoding

Generering av genetiske data gjennom parallell sekvenseringsteknologi (HTS) produserer store datamengder, som også inneholder prosessgenerert støy. Støyen består hovedsakelig av molekylære artefakter som oppstår på grunn av tilfeldige PCR- og sekvenseringsfeil. Bioinformatikkens rolle i metastrekkoding er å filtrere rå sekvensdatasett til endelige datasett, som egner seg for statistisk analyse. Generelt innebærer dette å fjerne eller redusere effekten av feil så mye som mulig og tildele tilhørighet (dvs. for prøve, PCR osv.) til individuelle DNA-sekvenser. En kan bruke eksperimentelle kontroller for å ytterligere filtrere data for å sikre kvalitet, og til slutt tildele en taksonomisk identifikasjon av sekvensvarianter (selv om ytterligere statistisk analyse av data kan utføres uten taksonomisk identifikasjon). Bioinformatikk er et område som er i kontinuerlig rask utvikling, med nye metoder som regelmessig publiseres og programvare som oppdateres. Dette skjer i et tempo som gjør at det vil være nytteløst å forsøke å oppsummere den faglige tilstand fra litteraturen. Dette er ikke bare på grunn av ny metodeutvikling, men fordi bioinformatiske strategier som har blitt brukt for spesifikke metastrekkodingprosjekter er så ulike og at de er helt avhengige av den anvendte DNA-sekvenseringsteknologien og bruken av eksperimentelle kontroller. Vi henviser leseren til kapittel 8 i Taberlet et al. (2018), som, i tillegg til fokus på noen strategier og programvarebruk, gir en god generell oversikt over vanlige bioinformatiske prosedyrer (f.eks. fjerning av “singletons”, dvs. DNA-sekvenser som bare forekommer én gang i datasett) og prinsipper for metastrekkoding. Det skal bemerkes at bioinformatisk filtrering også kan komme til å forkaste ekte mangfold hvis de bioinformatiske rutinene ikke er godt nok vurdert (Epp et al., 2012; Taberlet et al., 2018)

I denne rapporten vil vi fokusere på to områder som sannsynligvis vil være av avgjørende betydning for miljøovervåking og forvaltning: taksonomisk identifisering av DNA-sekvenser og den nye erkjennelsen av at selv små endringer i bioinformatiske prosedyrer kan påvirke resultatene av statistiske prosedyrer (Calderon- Sanou et al., 2020).

Taksonomisk bestemmelse av DNA-sekvenser fra metastrekkoding kan være av avgjørende betydning for miljøforvaltning. For eksempel, hvis oppdagede taksa er arter av særlig interesse for forvaltning (f.eks. sjeldne eller invasive arter), må en slik oppdagelse absolutt ikke være falskt positiv, da det kan utløse kostbare forvaltningstiltak som kan ha konsekvenser for næringsliv, helse og juridiske vedtak (Darling et al., 2020). Feilbestemmelse av DNA-sekvenser kan resultere i en falsk positiv (Porter & Hajibabaei, 2018a). Det finnes en rekke generelle rammer og algoritmer for taksonomisk identifikasjon av DNA-sekvenser fra metastrekkoding. Disse spenner fra enkle sekvenslikhetsbaserte tilnærminger som BLAST (Altschul et al., 1997) og automatisert post-hoc-kuraterting av BLAST-resultater (Lowest Common Ancestor LCA algoritmer: Huson et al., 2007; Clemente et al., 2011) til mer sofistikerte metoder med maskinlæring, fylogenetiske eller probabilistiske metoder med målinger av statistisk støtte for taksonomisk identifikasjon (f.eks. Munch et al., 2008; Porter & Hajibabaei, 2018b). Det kan være forvirrende at disse beregningsmetodene, til enhver tid, rapporterer forbedringer av nøyaktighet eller effektivitet i forhold til tidligere metoder (f.eks. Wood & Salzberg, 2014; Somervuo et al., 2016; Murali et al., 2018; Zheng et al.,

2018). Hleap et al. (2020) evaluerte nylig de forskjellige tilnærmingene ved å bruke et konstruert datasett som skulle representere forventet variasjon innenfor og mellom arter i et reelt datasett fra metastrekkoding. De konkluderte at noen metoder yter mye bedre enn andre for identifikasjon av arter og slekter (den naive Bayes QIIME q2: Bokulich et al., (2018); og overraskende nok BLAST). Denne studien demonstrerte også at det er viktig å finjustere algoritmeparametre som passer til egenskapene til spørredata. Dette blir ofte oversett i praktisk bruk av slike algoritmer. Disse forfatterne bemerket også at enkle tilnærminger som LCA og andre algoritmer fungerer like bra for taksonomisk identifikasjon over art eller slektsnivå, og kan være mer hensiktsmessige når taksa er dårlig representert i referansedatabaser. Vi har tidligere belyst at dette ofte forekommer for miljø-DNA-studier (avsnitt 2). Derfor, mens LCA-algoritmer (eller andre) kan være mer hensiktsmessige i noen miljø-DNA-sammenhenger, krever det ytterligere undersøkelser hvis data må identifiseres til artsnivå. I det store og hele vil identifikasjonsalgoritmen og det ønskede hierarkiske nivået for identifikasjonen (art, slekt, familie osv.) sterkt påvirke datakvaliteten og må eksplisitt vurderes for det spesielle forvaltningsspørsmålet en har til hensikt å belyse.

En annen fremtredende erkjennelse fra bioinformatikk er også relevant for miljøforvaltning. Nylige studier har vist at forskjellige beskrivende (Alberdi et al., 2018) og statistiske (Calderon-Sanou et al., 2020; Mächler et al., in press.) resultat kan oppstå fra små endringer i bioinformatiske beslutninger. Dette kan være at: Sekvenser under en viss terskelverdi forkastes (dvs. en viss prosentvis sekvenseringsdybde eller hard avskjæring). Sekvenser sorteres etter som de er til stede på tvers av PCR-replikater eller prøver. Potensielt falske sekvenser blir fjernet eller inkluderes. Terskelverdien for å gruppere lignende sekvenser sammen (eller ikke ved bruk av amplikon-sekvensvarianter - ASVer: Callahan et al., 2016), og behandlingen av kontaminering mellom prøver. Det virker åpenbart at det vil påvirke det estimerte mangfoldet, dersom potensielt falske sekvenser ikke blir fjernet (dvs. mer falske sekvenser viser (falsk) større mangfold). For andre parametere, slike som beslutninger om sekvenser som finnes i noen av flere replikater, terskelverdier og grupperingsterskler, er imidlertid rammene for å ta objektive beslutninger mindre intuitive. Slike avgjørelser blir viktige for å utvikle standardiserte protokoller, fordi de også kan påvirkes av andre faktorer, som naturlig vil variere mellom eksperimenter og sekvenseringskjøringer (f.eks. det "sanne" mangfoldet i prøver, sekvenseringsdybde osv.). Dette er et voksende forskningsområde i et tidlig læringsstadium, noe som vanskeliggjør (premature) anbefalinger. Likevel er det viktig at disse parametrene rapporteres av utøvere og potensielt endres iterativt for å vurdere deres effekt på konklusjoner. Hovedpoenget, som med alle molekylære metoder frem til nå, er at dette er et annet område der de nøyaktige strategiene som brukes kan endre endelige data og kreve nøye vurdering i forhold til det spesifikke studiesystemet samt målene for bioovervåking/miljøforvaltning.

#### 4.2.4 Statistiske betraktninger

For miljøforvaltning er det nyttig å vurdere hvordan en feil vitenskapelig konklusjon kan påvirke beslutninger (Underwood & Chapman, 2003). Feil vitenskapelige konklusjoner kan oppstå fra feil kjent som type I- og type II-feil: I hypotesetesting består type I-feil av å finne en endring som ikke er reell (avvise en sann nullhypotese), og type II-feil består i å ikke finne en endring når det er sann endring (unnlater å avvise en falsk nullhypotese: Underwood & Chapman, 2003). Når det gjelder påvisning av taksa- og mangfold fra miljø-DNA består en type I-feil av en deteksjon som er feil (en falsk positiv) og en type II-feil består i å unnlate å oppdage et takson som er tilstede (en falsk negativ) (Darling & Mahon, 2011). Målet med biologisk overvåking ved hjelp av en hvilken som helst metode er å redegjøre for biologisk og

prøvetakingsvariasjon med passende eksperimentell design, for å redusere begge feiltypene så mye som praktisk mulig. Det samme gjelder implementering av miljø-DNA-metoder, men det er flere metodiske (f.eks. prøvetakingsdesign, molekylære protokoller, analysespesifisitet og sensitivitet, falske taksonomiske oppgaver osv.) og økologiske komponenter (f.eks. variasjon i miljø-DNA-kildene og romlig og tidsmessig dynamikk) som kan bidra til begge feiltypene (Evans et al., 2017).

Ufullstendig påvisning (falske negative og falske positive) (Yoccoz et al., 2001; Buckland et al., 2004) kan hefte ved alle undersøkelsesteknikker og miljø-DNA-undersøkelser er, slikt sett, ikke forskjellige (Ficetola et al., 2015; Lahoz-Monfort et al., 2016; Guillera-Arroita et al., 2017). Hvis det er avgjørende å vite om et takson mangler eller er til stede, og dette skal besvares fra miljø-DNA, må muligheten for statistiske beslutninger om sannsynligheten for falsk positiv eller falsk negativ deteksjon bli ivaretatt i undersøkelsens design og fortolkning. Modellering av lokalitetsdeteksjon (SODM) er et slikt statistisk rammeverk og kan brukes til artsspesifikke, PCR-baserte undersøkelser. Det kan likevel kreve særlig eksperimentering og et sett med undersøkelsesdata som er uavhengige av miljø-DNA for riktig implementering (f.eks. Guillera-Arroita et al., 2017; Smith & Goldberg, 2020). Nylig arbeid har også utvidet SODM-rammeverket for å ta høyde for autokorrelasjon, som er vanlig i artsforekomstdata (Chen & Ficetola, 2019) og i flerartsdata fra miljø-DNA-studier ved bruk av metastrekkodingmetoder (McClenaghan et al., 2020), selv om sistnevnte kun står for falske negativer. Likevel er metodene deres betydelige forbedringer for å utlede fordeling i fin skala og økologiske slutninger fra miljø-DNA, sammenlignet med de metoder som ignorerer ufullkommen påvisning av taksa. Viktigere for utvikling av overvåkningsmetoder med miljø-DNA, er at SODM tillater estimering av antall replikater som kreves på kritiske punkter i en arbeidsflyt (f.eks. prøve ved replisering av feltstasjon, PCR-replikater av prøver) for et ønsket konfidensnivå for miljø-DNA-deteksjoner. SODM-statistiske tilnærminger er noen av de mest lovende for å vurdere sannheten i undersøkelsesresultatene i et rammeverk for risikovurdering og for å utvikle standardiserte protokoller. Vi vil foreslå, at miljøbeslutninger basert på miljø-DNA må være basert på slike undersøkelser for å optimalisere prøvetaking, laboratorie- og bioinformatiske prosedyrer.

Etter bioinformatisk behandling, består et typisk datasett fra metastrekkoding, som er klart for statistiske analyser, vanligvis av en matrise av taksonomiske identifikasjoner (eller molekylære operasjonelle taksonomiske enheter - MOTUer) og data for sted (og/eller tidspunkt). Hver celle i matrisen er fylt med enten null (indikerer fravær av arten eller MOTU) eller et positivt heltall (som indikerer sekvensantallet for den arten eller MOTU).

Tradisjonelle kvantitative datasett fra organismesamfunn for statistisk analyse har vanligvis en lignende struktur: en art x-sted (osv) matrise med hver celle fylt med null (fravær av arten på stedet) eller et positivt heltall (antall individer av den arten på det stedet). Selv om disse datasettene virker strukturelt like, representerer de ikke det samme og er faktisk ikke engang strukturelt like. At de ikke representerer det samme, bør være lett å fatte: Den ene er et tilfeldig utvalg av diversiteten av individuelle taksa, som er sammenlignbar mellom taksa fordi de representerer de samme enhetene (individer). Den andre er et tilfeldig utvalg av molekyler der forholdet mellom molekyler og diversitet er generelt udefinert både innenfor og mellom taksa. Det er viktig at de ikke er strukturelt like, fordi tradisjonelle data er en tellingsbasert diversitet, hvor størrelsen i antall i individuelle dataceller kan være uavhengig (bortsett fra de biologiske relasjoner som er av interesse).

Metastrekkodingdata representerer, til forskjell fra dette, en tilfeldig prøve med relativ diversitet av molekyler i fast størrelse. Som sådan er en komposisjonsprøve (dvs.

proporsjonal) og en som til og med er utfordrende å utlede den absolutte diversiteten av molekyler fra (Gloor et al., 2017; Harrison et al., n.d.). Enkelt sagt er forskjellen mellom de to datastrukturene at med et tradisjonelt utvalg betyr ytterligere n-tilfeller i et takson (eller av nye taksa) ikke automatisk tap av n-tilfeller andre steder. Men, per definisjon av faste størrelser må dette være tilfelle for metastrekkodingdata. Strukturen til metastrekkoding-datasett gjør at de, sjeldnere enn andre modellbaserte metoder, er implisitt egnet for standardrutinene for normalisering av matriser, for å redegjøre for forskjeller i sekvenseringsdybde ved å beregne proporsjoner (Weiss et al., 2017). Imidlertid blir disse dataene deretter jevnlig analysert videre med ordinasjons- og klyngeteknikker som ikke er egnet for sammensatte data, og gir skjeve og ofte ustabile resultater (Gloor et al., 2017). En annen tvetydighet angående bruken av sekvenstall er at de ofte brukes til å beregne diversitetsindekser basert på taksa- (eller MOTU) jevnfordeling (evenness): I denne sammenhengen teller fordelingen av taksa- (eller MOTU) sekvenser innenfor og mellom lokaliteter osv (f.eks. Hill-tall - Alberdi & Gilbert, 2019; Mächler et al., Nd). På grunn av spørsmål om repeterbarhet, generelt ukjente forhold mellom lest sekvensdiversitet og taksadiversitet (se avsnitt 4.1), og spørsmål om komposisjonsdata, kan tolkningen av disse indeksene og deres påfølgende analyser være langt mer komplisert enn det man vanligvis anerkjenner.

Hovedpoenget er derfor at de statistiske analysene av miljø-DNA-data krever nøye vurdering av: (1) de iboende egenskapene til datasettet, (2) systemet som studeres og (3) bioovervåking og målet med miljøforvaltningen. Selv om det sjelden er virkelige store konsekvenser av å bruke upassende statistiske metoder eller for overtolkning av data i vitenskapelige publikasjoner, kan det være alvorlige og kostbare konsekvenser av miljøforvaltningstiltak som er basert på slike feil.

## 4.3 Eksempler på studier av marint miljø-DNA anvendt for miljøforvaltning

I en nylig gjennomgang som forsøkte å forstå kilder til variasjon og usikkerhet ved bruk av miljø-DNA-data for miljøovervåking, fant Mathieu et al. (2020) at utvalget av prosedyrer i felt (prøvetaking), laboratorie-, bioinformatiske og statistiske metoder, og romlig og tidsmessig skala som resultatene kan generaliseres over, er svært vidt. Dette begrenser klart de konklusjoner og anbefalinger som kan males med bred pensel, og mange slike løsninger og anbefalinger er kontekstspesifikke. Denne rapporten har lignende konklusjoner knyttet til design, metoder og analyser av marine miljø-DNA-studier. I stedet for å fokusere på konsensus (eller mangel på det) i litteraturen, presenterer denne delen tilnærminger og funn av casestudier som undersøker to brede områder av miljøforvaltning: taksa-deteksjon (bekymringsarter) og anvendt samfunnsøkologi.

### 4.3.1 Bekymringsarter

Bekymringsarter kan være invasive, patogene eller arter som kreves særlige bevaringstiltak (Darling et al., 2020). Miljø-DNA-metoder rettet mot slike arter har spesiell appell fordi de har høy følsomhet og generelt høye deteksjonsrater sammenlignet med tradisjonelle undersøkelsesmetoder. Metastrekkoding-metoder kan og har blitt brukt i til slike formål (Pochon et al., 2013; Rey et al., 2019, 2020). Det er også eksempler på at slike arter har blitt tilfeldig påvist i metastrekkodingstudier med andre formål (f.eks. Holman et al., 2020;



Suarez-Menendez et al., 2020). Imidlertid er metastrekkodingstudier for slike målarter også heftet med ulike problemer som enten er metodiske, knytter seg til datastandard eller deteksjonsfeil (falske positive og negative) (Aylagas et al., 2020; Darling et al., 2020). Nylig arbeid har vist at metastrekkoding er mindre følsom for artsdeteksjon enn artsspesifikke tilnærminger (Bylemans et al., 2019; Wood et al., 2019). Den generelle anbefalingen er at artsspesifikke tilnærminger er mer hensiktsmessige i slike applikasjoner med miljø-DNA (Wood et al., 2019; Aylagas et al., 2020; Eble et al., 2020), dette vil også gjelde i marine miljø ettersom de har så mye større mangfold. Artspesifikke tilnærminger er utviklet for visse marine invasive arter og fortøner seg som lovende, selv om forskjellige strategier har blitt brukt i utvikling og anvendelse (f.eks. Simpson et al., 2017; Wood et al., 2017). Westfall et al. (2020) viste nylig hvordan målrettet overvåking av et bredere sett av aktuelle fremmedarter kan utføres ved å bruke et utvidet sett av artsspesifikke markører for flere gener. Dette prinsippet kan tillempes til regionale biogeografiske forhold og problemstillinger og må helst utføres med samtidige analyser av flere typer prøver fra vann, plankton og sediment. Generelt gjelder at prøvetaking også må planlegges med optimalt med hensyn til artenes reproduksjonsbiologi og sesongmessige variasjon. Ulike visjoner for automatisering av slike overvåkingsprogram har også blitt presentert (se f.eks. Yamahara al., 2019).

I anbefalinger for utvikling og anvendelse av genetiske verktøy for påvisning og overvåking av spesielt invasive arter, understreker Darling et al. (2017) behovet for integrerende taksonomi for å utvikle omfattende referansedatabaser, standardisering av prøvetaking og molekylære protokoller, tilgjengelige data analyse/deling og redusering av usikkerhet i resultatene ved å benytte SODM-design- og analyserammer.

#### 4.3.2 Overvåking av biomangfold for anvendt konsekvensutredning

Aylagas et al. (2020) presenterer en studie av marint miljø-DNA for overvåking og konsekvensutredning: Monitorering av effekter på bunndyr fra laksefiskoppdrett i New Zealand (Keeley et al., 2018). Så vidt vi vet, er dette trolig det mest omfattende og målrettede eksemplet i det marine miljøet. I dette tilfellet ble det lagt vekt på taksa som var nyttig for overvåking, mindre på makrofauna og mer fokusert på mikroorganismer. En benyttet kvantitativ indeks, som inkorporerte flere miljø-DNA- og abiotiske variabler, som indikerer alvorlighetsgrad (Keeley et al., 2018). Aylagas et al. (2020) leder også andre casestudier der miljø-DNA-metoder har blitt brukt for å utvikle bioovervåking som sannsynligvis er mindre relevant for marin miljøforvaltning, som for eksempel utvikling av en marin biotisk indeks som kan brukes i vurdering av økologisk status i estuarier (elveutløp) og kystvann. Cordier et al., (2017, 2018) har vist at taksonomi-fri metastrekkoding (altså å ikke bruke noe referansebibliotek som kan koble taksonomi til DNA-sekvensene) i bunndyrovervåking gir lovende resultater for å utvikle biotiske indekser som kan være sensitive for økologisk kvalitet og påvirkning. Disse studiene vil ikke kunne si noe annet enn om det er en påvirkning av miljø, ikke hvilken påvirkning eller fra hvilke taksa. Det som er tydelig fra alle studier er imidlertid at det er betydelig engasjement (økonomisk, akademisk og regulatorisk, der det er aktuelt) i utviklings- og valideringsfasen av disse prosjektene. Det er gjennomgående både når det gjelder tid og ekspertise, og dermed kostnader. I de fleste tilfeller ble slik utviklings- og valideringsinnsats kombinert med en rekke anerkjente, tradisjonelle metoder for å forankre miljø-DNA-resultater i vitenskapelig sannhet og plassere dem i en entydig sammenheng. Vi anser dette som en kritisk, men nødvendig prosess, hvis miljø-DNA-metoder til slutt skal erstatte andre dokumenterte miljøovervåkingsmetoder. Spesielt i lys av de kompliserte flertrinns-prosedyrene som karakteriserer miljø-DNA-metoder, fra prøvetaking, gjennom generering av laboratoriedata, til datatolkning og det utvilsomme

behovet for standardisering av disse er det viktig at metodene utvikles med tette relasjoner til tradisjonelle metodologier og empiri.

## 4.4 Miljødirektoratets prioritetsområder og miljø-DNA-teknikker

Miljødirektoratet leder/overser flere kartleggings og overvåkningsprosjekt der det kunne være hensiktsmessig å benytte miljø-DNA. Vi kan dele disse prosjektene inn i to hovedgrupper: (1) kartleggingsprosjekt, der hovedmålet er å forstå geografisk utbredelse av geomorfologi, habitater, biomangfold, samfunn og utvalgte arter (for eksempel Mareano, Marine grunnkart i kystsonen, Naturtypekartlegging i kystområder) og (2) overvåkningsprosjekt, der hovedmålet er å først vurdere, og så overvåke over tid, tilstanden til marine økosystem og hvordan de responderer til menneskelig påvirkning i større eller mindre grad. Dette kan være punkt-overvåkinger på industri eller bredskala-påvirkninger som klimaendringer (for eksempel i programmet Økokyst, og i petroleumsovervåkingen)

Kartlegging og overvåkning er uttrykk de fleste biologer og naturforvaltere er godt kjent med. Men uten at de settes inn i en sammenheng kan de også være svært vidtomfavnende - og for mange forskjellige aspekter kan være kartlegging eller overvåkning til at man uten videre kan foreslå detaljerte samlingsstrategier, laboratorieprotokoller og løsninger for data analyser som skal kunne dekke alle alternativer. Spesifikke løsninger for arbeidsflyt for bruk av miljø-DNA i hver enkelt forvaltningsprosjekt må komme med den spesifikke konteksten for hvert studiesystem og ikke minst prosjektens hovedmål i forhold til (1) de(n) spesifikke organismen(e) eller samfunn og generelle miljø (åpent hav, fjord, elvemunning, kyst osv.) som skal undersøkes, (2) hvilken taksonomisk, geografisk og tidsmessig oppløsning som kreves, (3) hvilke konsekvenser eksperimentelle feil (for eksempel falske positive og falske negative) og bioinformatiske artefakter en kan regne med, og (4) om miljø-DNA-resultatene skal stå alene, eller om de skal sammenlignes med eller integreres med eksisterende tidsserier eller tradisjonelle metoder. Dette er grunnleggende spørsmål for å kunne vurdere selv de mest tidlige aspekter av å benytte miljø-DNA teknikker i marin kartlegging og overvåkning, så som for eksempel hvor stort sediment-volum som bør samles inn eller hvor mye vann som skal filtreres over hvilken type filter. Ikke minst må det vurderes hvilke videre eksperimenter som må til for å optimalisere og standardisere teknikker, som for eksempel å definere geografiske eller tidsmessige målestokker, kvantifisere deteksjonsnivå, vurdere sammenhengen mellom miljø-DNA-data og tradisjonelle datasett osv. Med bakgrunn i dagens kunnskap (current state of the art) er det tydelig at de prosjektene som benytter seg av miljø-DNA metoder har like varierte mål og metodetilnærminger som det marine miljø er i seg selv. Uten spesifikke og detaljert definerte svar til punktene (1)-(4) over vil det være en forsømmelse å foreslå en spesifikk innsamlingsstrategi til for eksempel bløte sedimenter eller hardbunnsbentos. Gjennom å definere nøyaktige svar til punktene (1)-(4) at en kan komme et lite steg nærmere en innsamlingsstrategi og arbeidsflyt for miljø-DNA, men kun gjennom piloteksperiment vil man kunne komme til en optimalisering som et steg mot en standardisering og robuste resultater som kan tolkes vitenskapelig.

For de prosjektene der en allerede samler inn miljø-DNA, eller har planlagte innsamlinger på trappene, er viktige grunnleggende prinsipper som at innsamlingen er standardisert i forhold til hvilket substrat, volum, konservering og lagring verd å vurdere. I mangel på kunnskap om hvilken effekt prøvevolumet har på sluttresultatet bør man samle inn så store volum som det

er praktisk å få til i forhold til konservering og lagring. Store volum kan alltid deles opp i mindre delprøver. Man må i denne forbindelse ta i betraktning at størrelsen på prøvevolum påvirker hvilke konserveringsteknikker som er brukbare og nyttige (se kapittel 3). Det er viktig å utføre innsamlingen med metoder som minimerer og kontrollerer kryssforurensing (se kapittel 3, samt kapittel 4.3). Ideelt bør en mengde forskjellige prøvesubstrat og -volum samles inn i begynnelsen, slik at en kan eksperimentere seg fram til en optimal løsning med hensyn til valg av prøvesubstrat, prøvevolum, konservering og lagringsvilkår. DNA-ekstraksjon bør skje så raskt som mulig etter prøvetakning, og dette bør også være en standardisert prosess både når det gjelder valg av ekstraksjonsprotokoll og hvor lenge etter prøvetakning ekstraksjon skal skje.

Et av de første spørsmålene en bør stille seg, er om det er mest ønskelig å kunne finne enkeltarter (for eksempel fremmede arter eller indikatorarter til en påvirkningsvurdering i overvåking) eller om fokuset heller bør ligge på å produsere bredere mangfoldsprofiler av større taksonomiske grupper. Hvis målet er å finne enkeltarter er PCRdiagnostiske tilnærminger å foretrekke over metastrekkoding fordi de er mer sensitive og fordi det er mulig å eksperimentelt kvantifisere gjenkjenningssannsynligheten. Dette forutsetter (1) at man definerer måltaksonet eller spesifikke målgrupper, (2) utvikling og validering av sensitive PCRdiagnostiske analyser for det spesifikke taksonet eller gruppen (se detaljer i seksjon 4.2.2), (3) utføring av piloteksperiment for optimalisering av (a) DNAekstraksjon (b) innsamlingskala (materialvolum, geografisk og tidsmessig målestokk) og (c) den biologiske og tekniske gjentakene som er nødvendig for å optimalisere og kvantifisere gjenkjenningssannsynligheten i et SODM statistisk rammeverk.

For bredere mangfoldsprofiler, som for eksempel når det trengs oversikt over mangfoldet i et habitat eller et samfunn, kan en benytte seg av metastrekkoding. Slike analyser er vanskelige å standardisere, og er mer utsatt for metodologiske feil og til sist mye vanskeligere å tolke, alt på grunn av den store taksonomiske variasjonen i miljø-DNAkildene, i geografisk- og tidsdynamikk og i de mange stegene og det brede taksonomiske omfanget til metastrekkoding. Generelle vurderinger for implementering av metastrekkoding inkluderer (1) definering av måltaksa og målgrupper, (2) om man skal bruke taksonomi eller prøve taksonomi-frie tilnærminger. Om man velger taksonomi må man produsere lokale referansebibliotek over måltaksa/målgrupper, (3) gjøre multi-markør tilnærminger (for eksempel flere PCRprimer sett) for intern validering av resultatene, (4) validere PCRprimer sett for måltaksene *in silico* og i laboratoriet (se seksjon 4.2.2), (5) eksperimentell validering og optimalisering (med passende eksperimentelle kontroller) av innsamlingsproblemer som for eksempel geografisk og tidsmessig skala samt laboratorieprosedyrer så som DNAekstraksjon og PCR-instillinger, og (6) benytte passende statistiske rammeverk som tar hensyn til både de strukturelle egenskapene ved metastrekkoding og forvaltningsmålet.

Disse anbefalingene er både brede og ikke særlig spesifikke, noe som reflekterer den brede og ikke-spesifikke naturen til begrepene kartlegging og overvåking. Det er ingen tvil om at miljø-DNA teknikker er sensitive, kan benyttes i stor skala og har blitt dokumentert suksessfulle i veldig spesifikke marine miljøovervåkningsprosjekter (se seksjon 4.3.2). Vi anbefaler at slike spesifikke kontekster og mål beskrives for kartlegging og overvåking. Det vil være et avgjørende første steg på veien mot en integrering av miljø-DNA teknikker i forvaltningsprogram. Når disse er definert kan målrettede prosjekter bestilles fra institusjoner som innehar relevant ekspertise og utstyr i forhold til de spesifikke kontekstene og målene. Slike prosjekter vil så kunne levere optimaliserte og standardiserte protokoller for innsamling og analyser av miljø-DNA i de spesialiserte tilfellene som prosjektene beskriver.

## Referanser

- Aylagas, E., Mendibil, I., Borja, Á., Rodríguez-Ezpeleta, N. (2016). Marine Sediment Sample Pre-processing for Macroinvertebrates Metabarcoding: Mechanical Enrichment and Homogenization. *Frontiers in Marine Science*, 3, 203. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00203>
- Alberdi, A., Aizpurua, O., Gilbert, M. T. P., & Bohmann, K. (2018). Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(1), 134-147. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12849>
- Alexander, J. B., Bunce, M., White, N., Wilkinson, S. P., Adam, A. A. S., Berry, T., Stat, M., Thomas, L., Newman, S. J., Dugal, L., & Richards, Z. T. (2020). Development of a multi-assay approach for monitoring coral diversity using eDNA metabarcoding. *Coral Reefs*, 39(1), 159-171. <https://doi.org/10.1007/s00338-019-01875-9>
- Allan, E. A., Zhang, W. G., Lavery, A. C., & Govindarajan, A. F. (2020). Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1002/edn3.141>
- Andruszkiewicz, E. A., Sassoubre, L. M., & Boehm, A. B. (2017a). Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight. *Plos One*, 12(9), e0185043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185043>
- Andruszkiewicz, E. A., Starks, H. A., Chavez, F. P., Sassoubre, L. M., Block, B. A., & Boehm, A. B. (2017b). Biomonitoring of marine vertebrates in Monterey Bay using eDNA metabarcoding. *PLOS ONE*, 12(4), e0176343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176343>
- Baker, C. S., Steel, D., Nieukirk, S., & Klinck, H. (2018). Environmental DNA (eDNA) From the Wake of the Whales: Droplet Digital PCR for Detection and Species Identification. *Frontiers in Marine Science*, 5, 133. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00133>
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1-17. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Brannock, P. M., Ortmann, A. C., Moss, A. G., & Halanych, K.M. (2016). Metabarcoding reveals environmental factors influencing spatio-temporal variation in pelagic micro-eukaryotes. *Mol. Ecol.* 25, 3593e3604. <https://doi.org/10.1111/mec.13709>
- Bringloe, T. T., Sjøtun, K. & Saunders, G. W. (2019). A DNA barcode survey of marine macroalgae from bergen (Norway). *Marine Biology Research* 15: 580-589. <https://doi.org/10.1080/17451000.2019.1699659>
- Bucklin, A., Yeh, H. D., Questel, J. M., Richardson, D. E., Reese, B., Copley, N. J., & Wiebe, P. H. (2019). Time-series metabarcoding analysis of zooplankton diversity of the NW Atlantic

continental shelf. *ICES Journal of Marine Science*, 76(4), 1162-1176.

<https://doi.org/10.1093/icesjms/fsz021>

Bustin, S. A. (2010). Why the need for qPCR publication guidelines?—The case for MIQE.

*Methods*, 50(4), 217-226. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.12.006>

Carroll, E. L., Gallego, R., Sewell, M. A., Zeldis, J., Ranjard, L., Ross, H. A., Tooman, L. K., O'Rorke, R., Newcomb, R. D., & Constantine, R. (2019). Multi-locus DNA metabarcoding of zooplankton communities and scat reveal trophic interactions of a generalist predator.

*Scientific reports*, 9(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36478-x>

Chain, F.J.J., Brown, E.A., MacIsaac, H.J., & Cristescu, M.E. (2016). Metabarcoding reveals strong spatial structure and temporal turnover of zooplankton communities among marine and freshwater ports.

*Divers. Distrib.* 22, 493e504. <https://doi.org/10.1111/ddi.12427>

Coissac, E., Hollingsworth, P. M., Lavergne, S., & Taberlet, P. (2016). From barcodes to genomes: Extending the concept of DNA barcoding. *Molecular Ecology*, 25(7), 1423-1428.

<https://doi.org/10.1111/mec.13549>

Cole, L. W. (2016). The Evolution of Per-cell Organelle Number. *Frontiers in Cell and*

*Developmental Biology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00085>

Collins, R. A., Wangenstein, O. S., O'Gorman, E. J., Mariani, S., Sims, D. W., & Genner, M. J. (2018). Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology*, 1, 185.

<https://doi.org/10.1038/s42003-018-0192-6>

Cordier, T., Esling, P., Lejzerowicz, F., Visco, J., Ouadahi, A., Martins, C., Cedhagen, T., & Pawlowski, J. (2017). Predicting the Ecological Quality Status of Marine Environments from eDNA Metabarcoding Data Using Supervised Machine Learning.

*Environmental Science & Technology*, 51(16), 9118-9126. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01518>

Cordier, T., Forster, D., Dufresne, Y., Martins, C. I. M., Stoeck, T., & Pawlowski, J. (2018).

Supervised machine learning outperforms taxonomy-based environmental DNA metabarcoding applied to biomonitoring. *Molecular Ecology Resources*, 18(6), 1381-1391.

<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12926>

Cowart, D. A., Murphy, K. R., & Cheng, C.-H. C. (2018). Metagenomic sequencing of environmental DNA reveals marine faunal assemblages from the West Antarctic Peninsula.

*Marine Genomics*, 37, 148-160. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2017.11.003>

Creer, S., Fonseca, V.G., Porazinska, D.L., Giblin-Davis, R.M., Sung, W., Power, D.M., Packer, M., Carvalho, G.R., Blaxter, M.L., Lamshead, P.J., & Thomas, W.K. (2010). Ultrasequencing of the meiofaunal biosphere: practice, pitfalls and promises. *Molecular Ecology*, 19 Suppl 1, 4-20. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04473.x>

Creer, S., Deiner, K., Frey, S., Porazinska, D., Taberlet, P., Thomas, W.K., Potter, C., & Bik, H.M. (2016). The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity.

*Meth. Ecol. Evolut.* 7, 1008e1018. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12574>

- de Souza, L. S., Godwin, J. C., Renshaw, M. A., & Larson, E. (2016). Environmental DNA (eDNA) Detection Probability Is Influenced by Seasonal Activity of Organisms. *Plos One*, 11(10), e0165273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165273>
- Deagle, B.E., Clarke, L.J., Kitchener, J.A., Polanowski, A.M., & Davidson, A.T. (2018). Genetic monitoring of open ocean biodiversity: an evaluation of DNA metabarcoding for processing continuous plankton recorder samples. *Mol. Ecol. Res.* 18, 391e406. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12740>
- Deagle, B. E., Eveson, J. P., & Jarman, S. N. (2006). Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples - a case study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology*, 3(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-3-11>
- Deagle, B. E., Jarman, S. N., Coissac, E., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2014). DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: Not a perfect match. *Biology Letters*, 10(9), 20140562. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0562>
- Deiner, K., Bik, H.M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursiere-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D.M., de Vere, N., Pfrender, M.E., & Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol. Ecol.* 26, 5872e5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- Deiner, K., Walser, J., Mächler, E., & Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biol. Conserv.* 183, 53e63. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>
- Devine, J., Ferter, K., Glenner, H., Hestetun, J. T., Jensen, K. H., Nøttestad, L., Pennington, M., Rees, D. J., Salvanes, A. G. V., Sjøtun, K., & Staby, A. (2017). Planning Marine Field Studies. In: Salvanes, A. G. V., Devine, J., Jensen, K. H., Hestetun, J. T., Sjøtun, K., & Glenner, H. (Eds). *Marine Ecological Field Methods*, 33-73. <https://doi.org/10.1002/9781119184362.ch2>
- DiBattista, J. D., Coker, D. J., Sinclair-Taylor, T. H., Stat, M., Berumen, M. L., & Bunce, M. (2017). Assessing the utility of eDNA as a tool to survey reef-fish communities in the Red Sea. *Coral Reefs*, 36(4), 1245-1252. <https://doi.org/10.1007/s00338-017-1618-1>
- Dickie, I. A., Boyer, S., Buckley, H. L., Duncan, R. P., Gardner, P. P., Hogg, I. D., Holdaway, R. J., Lear, G., Makiola, A., Morales, S. E., Powell, J. R., & Weaver, L. (2018). Towards robust and repeatable sampling methods in eDNA-based studies. *Molecular Ecology Resources*, 18(5), 940-952. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12907>
- Djurhuus, A., Pitz, K., Sawaya, N.A., Rojas-M\_arquez, J., Michaud, B., Montes, E., Muller-Karger, F., & Breitbart, M. (2018). Evaluation of marine zooplankton community structure through environmental DNA metabarcoding. *Limnol Oceanogr. Methods* 16, 209e221. <https://doi.org/10.1002/lom3.10237>
- Dowle, E., Pochon, X., Keeley, N., & Wood, S. A. (2015). Assessing the effects of salmon farming seabed enrichment using bacterial community diversity and high-throughput

sequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(8), fiv089.  
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiv089>

Eble, J. A., Daly-Engel, T. S., DiBattista, J. D., Koziol, A., & Gaither, M. R. (2020). Chapter Two - Marine environmental DNA: Approaches, applications, and opportunities. In C. Sheppard (Ed.), *Advances in Marine Biology* (Vol. 86, pp. 141-169). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/bs.amb.2020.01.001>

Egeter, B., Veríssimo, J., Lopes-Lima, M., Chaves, C., Pinto, J., Riccardi, N., Beja, P., & Fonseca, N. A. (2020). Speeding up the detection of invasive aquatic species using environmental DNA and nanopore sequencing. *BioRxiv*, 2020.06.09.142521.  
<https://doi.org/10.1101/2020.06.09.142521>

Ekrem T., Willassen E., & Stur E. (2007) A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Molecular phylogenetics and evolution* 43: 530-542.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.11.021>

Faria L. C., Di Domenico M., Andrade S. C. S., Santos M. C. D., Fonseca G., Zanol J., & Amaral A. C. Z. (2018). The use of metabarcoding for meiofauna ecological patterns assessment. *Mar Environ Res.* 140, 160-168. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.06.013>

Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4, 423e425.  
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>

Finstad, A.G., deBoer, H., Brurberg, M.B. Dahle, G., Edgar, K.S., Eiler, A., Ekrem, T., Endresen, D., Fossøy, F., Hansen, H., Hobæk, a., Hoem, S.A., Hosia, A., Hovstad, K.A., Jeppesen, T.S., Johnsen, A., Kallioniemi, E., Larsen, A., Lifjeld, J.T., Pitelkova, I., Prager, M., Ray, J.L., Salvesen, I., Vrålstad, T., Willassen, E. 2020. Kriterier ofr lagring av miljø-DNA prøver og data, herunder henvisning til referansemateriale. *Miljødirektoratsrapport M-1638/2020*.

Flach, E., & Heip, C. (1996). Vertical distribution of macrozoobenthos within the sediment on the continental slope of the Goban Spur area (NE Atlantic). *Marine Ecology Progress Series*, 141(1/3), 55-66. <https://doi.org/10.3354/meps141055>

Fonseca, V. G., Sinniger, F., Gaspar, J.M., Quince, C., Creer, S., Power, D. M., Peck, L. S., & Clark, M. S. (2017). Revealing higher than expected meiofaunal diversity in Antarctic sediments: a metabarcoding approach. *Scientific Reports.* 7, 6094.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-06687-x>

Fontes JT, Vieira P, Ekrem T, Soares P, Costa FO. (2020) BAGS: an automated Barcode, Audit & Grade System for DNA barcode reference libraries. *Mol Ecol Resour.* 00:1-11  
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13262>

Georgieva, M. N., Wiklund, H., Bell, J. B., Eilertsen, M. H., Mills, R. A., Little, C. T. S. & Glover, A. G. (2015). A chemosynthetic weed: the tubeworm *Sclerolinum contotrum* is a bipolar, cosmopolitan species. *BMC Evolutionary Biology* 15: 280.  
<https://doi.org/10.1186/s12862-015-0559-y>

- Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11(5), 759-769. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x>
- Gold, Z., Sprague, J., Kushner, D. J., Zerecero, E., & Barber, P. H. (2020). EDNA metabarcoding as a biomonitoring tool for marine protected areas. *BioRxiv*, 2020.08.20.258889. <https://doi.org/10.1101/2020.08.20.258889>
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., Spear, S. F., McKee, A., Oyler-McCance, S. J., Cornman, R. S., Laramie, M. B., Mahon, A. R., Lance, R. F., Pilliod, D. S., Strickler, K. M., Waits, L. P., Fremier, A. K., Takahara, T., Herder, J. E., & Taberlet, P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Meth. Ecol. Evol.* 7, 1299e1307. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>
- Grosse M., Bakken, T., Nygren, A., Kongsrud, J. A., & Capa, M. (2020) Species delimitation analyses of NE Atlantic Chaetozoa (Annelida, Cirratulidae) reveals hidden diversity among a common and abundant marine annelid. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 149: 106852. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106852>
- Hansen, B. K., Bekkevold, D., Clausen, L. W., & Nielsen, E. E. (2018). The sceptical optimist: Challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries. *Fish and Fisheries*, 19(5), 751-768. <https://doi.org/10.1111/faf.12286>
- Heip, C., Vincx, M., & Vrank, G. (1985). The ecology of marine nematodes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. Rev.*, 23, 399-489.
- Hering, D., Borja, A., Jones, J.I., Pont, D., Boets, P., Bouchez, A., Bruce, K., Drakare, S., Hänfling, B., Kahlert, M., Leese, F., Meissner, K., Mergen, P., Reyjol, Y., Segurado, P., Vogler, A., & Kelly, M. (2018). Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Res.* 138, 192e205. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.003>
- Hestetun, J. T., Bye-Ingebrigtsen, E., Nilsson, Glover, A.G., Johansen, P.-O. & Dahlgren, T. G. (2020). Significant taxon sampling gaps in DNA databases limit the operational use of marine macrofauna metabarcoding. *Marine Biodiversity* 50: 70. <https://doi.org/10.1007/s12526-020-01093-5>
- Holman, L. E., de Bruyn, M., Creer, S., Carvalho, G., Robidart, J., & Rius, M. (2020). Detection of introduced and resident marine species using environmental DNA metabarcoding of sediment and water (vol 9, 11559, 2019). *Scientific Reports*, 10(1), 2457. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58228-8>
- Jazdzewska, A.M., Corbar,i L., Driskell, A., Frutos, I., Havermans, C., Hendrycks, E., Hughes, L., Lörz, A.-N., Stransky, B., Tandberg, A.H.S., Vader, W., Brix, S. (2018). A genetic fingerprint of Amphipoda from Icelandic waters - the baseline for further biodiversity and biogeography studies. In: Brix S, Lörz A-N, Stransky B, Svavarsson J (Eds) Amphipoda from the IceAGE-project (Icelandic marine Animals: Genetics and Ecology). *ZooKeys* 731, 55-73. <https://doi.org/10.3897/zookeys.731.19931>



- Jeunen, G.-J., Knapp, M., Spencer, H. G., Lamare, M. D., Taylor, H. R., Stat, M., Bunce, M., & Gemmell, N. J. (2019). Environmental DNA (eDNA) metabarcoding reveals strong discrimination among diverse marine habitats connected by water movement. *Molecular Ecology Resources*, 19(2), 426-438. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12982>
- Jeunen, G.-J., Lamare, M. D., Knapp, M., Spencer, H. G., Taylor, H. R., Stat, M., Bunce, M., & Gemmell, N. J. (2020). Water stratification in the marine biome restricts vertical environmental DNA (eDNA) signal dispersal. *Environmental DNA*, 2(1), 99-111. <https://doi.org/10.1002/edn3.49>
- Jo, T., Murakami, H., Masuda, R., Sakata, M. K., Yamamoto, S., & Minamoto, T. (2017). Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), e25-e33. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12685>
- Jo, T., Murakami, H., Yamamoto, S., Masuda, R., & Minamoto, T. (2019). Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and Evolution*, 9(3), 1135-1146. <https://doi.org/10.1002/ece3.4802>
- Kelly, R. P., Gallego, R., & Jacobs-Palmer, E. (2018). The effect of tides on nearshore environmental DNA. *PeerJ*, 6, e4521. <https://doi.org/10.7717/peerj.4521>
- Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K.M., & Crowder, L.B. (2014). Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS One* 9, e86175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086175>
- Koziol, A., Stat, M., Simpson, T., Jarman, S., DiBattista, J. D., Harvey, E. S., Marnane, M., McDonald, J., & Bunce, M. (2019). Environmental DNA metabarcoding studies are critically affected by substrate selection. *Molecular Ecology Resources*, 19(2), 366-376. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12971>
- Kutti, T., Johnsen, I. A., Skaar, K. S., Ray, J. L., Husa, V., & Dahlgren, T. G. (2020). Quantification of eDNA to Map the Distribution of Cold-Water Coral Reefs. *Frontiers in Marine Science*, 7, 446. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00446>
- Lacoursiere-Roussel, A., Howland, K., Normandeau, E., Grey, E. K., Archambault, P., Deiner, K., Lodge, D. M., Hernandez, C., Leduc, N., & Bernatchez, L. (2018). eDNA metabarcoding as a new surveillance approach for coastal Arctic biodiversity. *Ecology and Evolution*, 8(16), 7763-7777. <https://doi.org/10.1002/ece3.4213>
- Lafferty, K. D., Garcia-Vedrenne, A. E., McLaughlin, J. P., Childress, J. N., Morse, M. F., & Jerde, C. L. (2020). At Palmyra Atoll, the fish-community environmental DNA signal changes across habitats but not with tides. *Journal of Fish Biology*. <https://doi.org/10.1111/jfb.14403>
- Lallias, D., Hiddink, J. G., Fonseca, V. G., Gaspar, J. M., Sung, W., Neill, S. P., Barnes, N., Ferrero, T., Hall, N., Lamshead, P. J. D., Packer, M., Thomas, W. K., & Creer, S. (2015). Environmental metabarcoding reveals heterogeneous drivers of microbial eukaryote diversity in contrasting estuarine ecosystems. *The ISME Journal* 9(5): 1208-1221. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.213>

Leray, M., & Knowlton, N. (2015). DNA barcoding and metabarcoding of standardized samples reveal patterns of marine benthic diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112 (7), 2076-2081. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424997112>

Lobo J., Ferreira M.S.G., Antunes I.C., Teixeira M.A.L., Borges L.M., Sousa R., Gomes P.A., Costa M.H., Cunha M.R., Costa F.O. (2017). Contrasting morphological and DNA barcode-suggested species boundaries among shallow-water amphipod fauna from the southern European Atlantic coast. *Genome*, 60(2), 147-157. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0009>

Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M., & Minamoto, T. (2019). The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish (vol 9, e114639, 2014). *Plos One*, 14(2), e0212145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212145>

Massana, R., Gobet, A., Audic, S., Bass, D., Bittner, L., Boutte, C., Chambouvet, A., Christen, R., Claverie, J.-M., Decelle, J., Dolan, J. R., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Forn, I., Forster, D., Guillou, L., Jaillon, O., Kooistra, W. H. C. F., Logares, R., Mahé, F., Not, F., Ogata, H., Pawlowski, J., Pernice, M.C., Probert, I., Romac, S., Richards, T., Santini, S., Shalchian-Tabrizi, K., Siano, R., Simon, N., Stoeck, T., Vaulot, D., Zingone, A., & de Vargas, C. (2015). Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing. *Environ. Microbiol.* 17, 4035e4049. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12955>

McIntyre, A., & Warwick, R. (1984). *Meiofauna Techniques. Methods for the Study of Marine Benthos.* Oxford: Blackwell, 217-244.

Minamoto, T., Fukuda, M., Katsuhara, K. R., Fujiwara, A., Hidaka, S., Yamamoto, S., Takahashi, K., & Masuda, R. (2017). Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution. *Plos One*, 12(2), e0173073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173073>

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., & Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.* 2, 150088. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>

Morey, K.C., Bartley, T.J., & Hanner, R.H. (2020). Validating environmental DNA metabarcoding for marine fishes in diverse ecosystems using a public aquarium. *Environmental DNA*. 2: 330- 342. <https://doi.org/10.1002/edn3.76>

Muha, T. P., Skukan, R., Borrell, Y. J., Rico, J. M., Garcia de Leaniz, C., Garcia-Vazquez, E., & Consuegra, S. (2019). Contrasting seasonal and spatial distribution of native and invasive *Codium* seaweed revealed by targeting species-specific eDNA. *Ecology and evolution*, 9(15), 8567-8579. <https://doi.org/10.1002/ece3.5379>

Murakami, H., Yoon, S., Kasai, A., Minamoto, T., Yamamoto, S., Sakata, M. K., Horiuchi, T., Sawada, H., Kondoh, M., Yamashita, Y., & Masuda, R. (2019). Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment (vol 85, pg 327, 2019). *Fisheries Science*, 85(6), 1109-1109. <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01341-z>

- Obst M, Exter K, Allcock AL, Arvanitidis C et al. (2020) A Marine Biodiversity Observation Network for Genetic Monitoring of Hard-Bottom Communities (ARMS-MBON). *Front. Mar. Sci.* 7:572680. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.572680>
- O'Donnell, J. L., Kelly, R. P., Shelton, A. O., Samhour, J. F., Lowell, N. C., & Williams, G. D. (2017). Spatial distribution of environmental DNA in a nearshore marine habitat. *PeerJ*, 5, e3044. <https://doi.org/10.7717/peerj.3044>
- Pavithran, S., Ingole, B., Nanajkar, M., & Goltekar, R. (2009). Importance of sieve size in deep-sea macrobenthic studies. *Marine Biology Research*, 5:4, 391-398. <https://doi.org/10.1080/17451000802441285>
- Pawlowski, J., Esling, P., Lejzerowicz, F., Cordier, T., Visco, J.A., Martins, C.I.M., Kvalvik, A., Staven, K., & Cedhagen, T. (2016) Benthic monitoring of salmon farms in Norway using foraminiferal metabarcoding. *Aquaculture Environment Interactions*, 8, 371-386. <https://doi.org/10.3354/aei00182>
- Pearman, J.K., Leray, M., Villalobos, R., Machida, R.J., Berumen, M.L., Knowlton, N., & Carvalho, S. (2018). Cross-shelf investigation of coral reef cryptic benthic organisms reveals diversity patterns of the hidden majority. *Scientific Reports*, 8, 8090. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26332-5>
- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G., & Nannipieri, P. (2009). Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45, 219-235. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S. & Waits, L.P. (2014) Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14, 109-116. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12159>
- Pitz, K. J., Guo, J., Johnson, S. B., Campbell, T. L., Zhang, H., Vrijenhoek, R. C., Chavez, F. P., & Geller, J. (2020). Zooplankton biogeographic boundaries in the California Current System as determined from metabarcoding. *Plos one*, 15(6), e0235159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235159>
- Port, J. A., O'Donnell, J. L., Romero-Maraccini, O. C., Leary, P. R., Litvin, S. Y., Nickols, K. J., Yamahara, K. M., & Kelly, R. P. (2016). Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 25(2), 527-541. <https://doi.org/10.1111/mec.13481>
- Price, B., Briscoe, A., Misa, R. & Broad, G. (2020). DEFRA Centre of Excellence for DNA Methods: Evaluation of DNA barcode libraries used in the UK and developing an action plan to fill priority gaps. *Natural England Joint Publication JP035* ISBN 978-1-78354-671-8
- Prosser J. I. (2010). Replicate or lie. *Environmental Microbiology*, 12, 1806-1810. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02201>
- Ramirez-Llodra, E., Brandt, A., Danovaro, R., De Mol, B., Escobar, E., German, C. R., Levin, L. A., Martinez Arbizu, P., Menot, L., Buhl-Mortensen, P., Narayanaswamy, B. E., Smith, C.

R., Tittensor, D. P., Tyler, P. A., Vanreusel, A., and Vecchione, M. (2010). Deep, diverse and definitely different: unique attributes of the world's largest ecosystem. *Biogeosciences*, 7, 2851-2899. <https://doi.org/10.5194/bg-7-2851-2010>

Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N. (2013) A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE* 8(8): e66213.  
[DOI:10.1371/journal.pone.0066213](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066213)

Rius M. et al. (2021). World Register of Introduced Marine Species (WRiMS).  
<http://www.marinespecies.org/introduced> on 2021-01-31 <https://doi.org/10.14284/347>

Rossel, S., Khodami, S., & Arbizu, P. M. (2019). Comparison of rapid biodiversity assessment of meiobenthos using MALDI-TOF MS and metabarcoding. *Frontiers in Marine Science*, 6.  
<https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00659>

Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547.  
<https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>

Rygg, B., & Norling, K. (2013). Norwegian Sensitivity Index (NSI) for marine macroinvertebrates, and an update of Indicator Species Index (ISI). Norwegian Institute for Water Research Report No 6475-2013.

Salter, I. (2018). Seasonal variability in the persistence of dissolved environmental DNA (eDNA) in a marine system: The role of microbial nutrient limitation. *Plos One*, 13(2), e0192409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192409>

Sassoubre, L. M., Yamahara, K. M., Gardner, L. D., Block, B. A., & Boehm, A. B. (2016). Quantification of Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates for Three Marine Fish. *Environmental Science & Technology*, 50(19), 10456-10464.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03114>

Schroeder, A., Stanković, D., Pallavicini, A., Gionchetti, F., Pansera, M., & Camatti, E. (2020). DNA metabarcoding and morphological analysis-Assessment of zooplankton biodiversity in transitional waters. *Marine Environmental Research*, 104946.  
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104946>

Shelton, A.O., Kelly, R.P., O'Donnell, J.L., Park, L., Schwenke, P., Greene, C., Henderson, R.A., Beamer, E.M. (2019) Environmental DNA provides quantitative estimates of a threatened salmon species. *Biological Conservation* 237: 383-391,  
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.07.003>

Sigsgaard, E. E., Nielsen, I. B., Bach, S. S., Lorenzen, E. D., Robinson, D. P., Knudsen, S. W., Pedersen, M. W., Al Jaidah, M., Orlando, L., Willerslev, E., Moller, P. R., & Thomsen, P. F. (2017). Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology & Evolution*, 1(1), 0004. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0004>

Sigsgaard, E. E., Torquato, F., Frøslev, T. G., Moore, A. B. M., Sørensen, J. M., Range, P., Ben-Hamadou, R., Bach, S. S., Møller, P. R., & Thomsen, P. F. (2019). Using vertebrate environmental DNA from seawater in biomonitoring of marine habitats. *Conservation Biology*. <https://doi.org/10.1111/cobi.13437>

Stat, M., Huggett, M. J., Bernasconi, R., DiBattista, J. D., Berry, T. E., Newman, S. J., Harvey, E. S., & Bunce, M. (2017). Ecosystem biomonitoring with eDNA: metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Sci. Rep.* 7, 12240. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12501-5>

Stat, M., John, J., DiBattista, J. D., Newman, S. J., Bunce, M., & Harvey, E. S. (2019). Combined use of eDNA metabarcoding and video surveillance for the assessment of fish biodiversity. *Conservation Biology*, 33(1), 196-205. <https://doi.org/10.1111/cobi.13183>

Stefanni, S., Stanković, D., Borme, D., de Olazabal, A., Juretić, T., Pallavicini, A., & Tirelli, V. (2018). Multi-marker metabarcoding approach to study mesozooplankton at basin scale. *Scientific Reports*, 8(1), 12085. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30157-7>

Stoeck, T., Frühe, L., Forster, D., Cordier, T., Martins, C., & Pawlowski, J. (2018). Environmental DNA metabarcoding of benthic bacterial communities indicates the benthic footprint of salmon aquaculture. *Marine Pollution Bulletin*, 127, 139-149. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.11.065>

Strickler, K.M., Fremier, A.K., & Goldberg, C.S., 2015. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biol. Conserv.* 183, 85e92. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.038>

Sunagawa, S., Acinas, S. G., Bork, P., Bowler, C., Eveillard, D., Gorsky, G., Guidi, L., Iudicone, D., Karsenti, E., Lombard, F., Ogata, H., Pesant, S., Sullivan, M. B., Wincker, P., & Vargas, C. de. (2020). Tara Oceans: Towards global ocean ecosystems biology. *Nature Reviews Microbiology*, 18(8), 428-445. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0364-5>

Sunagawa, S., Coelho, L. P., Chaffron, S., Kultima, J. R., Labadie, K., Salazar, G., Djahanschiri, B., Zeller, G., Mende, D. R., Alberti, A., Cornejo-Castillo, F. M., Costea, P. I., Cruaud, C., d'Ovidio, F., Engelen, S., Ferrera, I., Gasol, J. M., Guidi, L., Hildebrand, F., ... Bork, P. (2015). Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*, 348(6237). <https://doi.org/10.1126/science.1261359>

Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, E. (2018). *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. Oxford University Press.

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21, 1789-1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>

Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H. & Kawabata, Z. (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One*, 7, e35868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035868>

- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Moller, P. R., Rasmussen, M., & Willerslev, E. (2012a). Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *Plos One*, 7(8), e41732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732>
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., Orlando, L., & Willerslev, E. (2012b). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(11), 2565-2573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>
- Thomsen, P. F., Moller, P. R., Sigsgaard, E. E., Knudsen, S. W., Jorgensen, O. A., & Willerslev, E. (2016). Environmental DNA from Seawater Samples Correlate with Trawl Catches of Subarctic, Deepwater Fishes. *Plos One*, 11(11), e0165252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165252>
- Torti, A., Lever, M., & Jørgensen, B. (2015). Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments. *Marine genomics*, 24 Pt 3, 185-96. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2015.08.007>
- Truelove, N. K., Andruszkiewicz, E. A., & Block, B. A. (2019). A rapid environmental DNA method for detecting white sharks in the open ocean. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(8), 1128-1135. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13201>
- Tsuji, S., Ushio, M., Sakurai, S., Minamoto, T., & Yamanaka, H. (2017). Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLoS One* 12, e0176608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176608>
- Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., & Lodge, D. M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(7), 676-684. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12206>
- Wangensteen, O.S., & Turon, X. (2017) Metabarcoding Techniques for Assessing Biodiversity of Marine Animal Forests. In: Rossi S., Bramanti L., Gori A., Orejas C. (eds) Marine Animal Forests. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-21012-4\\_53](https://doi.org/10.1007/978-3-319-21012-4_53)
- Weigand, H., Beermann, A. J., Čiampor, F., Costa F. O., Csabai, Z., Duarte, S., Geiger, M. F., Grabowski, M., Rimet, F., Rulik, B., Strand, M., Szucsich, N., Weigand, A. M., Willassen, E., Wyler, S. A., Bouchez, A., Borja, A., Čiamporová-Zat'ovičová, Z., Ferreira, S., Dijkstra, K. D. B., Eisendle, U., Freyhof, J., Gadawski, P., Graf, W., Haegerbaeumer, A., van der Hoorn, B. B., Japoshvili, B., Keresztes, L., Keskin, E., Leese, F., Macher, J. N., Mamos, T., Paz, G., Pešić, V., Pfannkuchen, D. M., Pfannkuchen, M. A., Price, B. W., Rinkevich, B., Teixeira, M. A. L., Várbíró, G., & Ekrem, T. (2019). DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *Science of the Total Environment* 678:499-524. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.247>
- Weltz, K., Lyle, J. M., Ovenden, J., Morgan, J. A. T., Moreno, D. A., & Semmens, J. M. (2017). Application of environmental DNA to detect an endangered marine skate species in the wild. *Plos One*, 12(6), e0178124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178124>

West, K. M., Stat, M., Harvey, E. S., Skepper, C. L., DiBattista, J. D., Richards, Z. T., Travers, M. J., Newman, S. J., & Bunce, M. (2020). EDNA metabarcoding survey reveals fine-scale coral reef community variation across a remote, tropical island ecosystem. *Molecular Ecology*, 29(6), 1069-1086. <https://doi.org/10.1111/mec.15382>

Westfall KM, Therriault TW, Abbott CL. (2020). A new approach to molecular biosurveillance of invasive species using DNA metabarcoding. *Global Change Biology* 26,1012-1022. <https://doi.org/10.1111/gcb.14886>

Wood, S. A., Biessy, L., Latchford, J. L., Zaiko, A., von Ammon, U., Audrezet, F., Cristescu, M. E., & Pochon, X. (2020). Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system. *Science of the Total Environment*, 704, 135314. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135314>

Yamahara KM et al.(2019). In situ autonomous acquisition and preservation of marine environmental DNA using an autonomous underwater vehicle. *Frontiers of Marine Science* 6, <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00373>

Yamamoto, S., Masuda, R., Sato, Y., Sado, T., Araki, H., Kondoh, M., Minamoto, T., & Miya, M. (2017). Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Reports*, 7, 40368. <https://doi.org/10.1038/srep40368>

Yoder, M., De Ley, I. T., King, I. W., Mundo-Ocampo, M., Mann, J., Blaxter, M., Poiras, L., & De Ley, P. (2006). DESS: a versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology* 8, 367-376. <https://doi.org/10.1163/156854106778493448>

Yu, D.W., Ji, Y., Emerson, B.C., Wang, X., Ye, C., Yang, C., Ding, Z. (2012). Biodiversity soup: Metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 613-623. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x>

Zinger, L., Bonin, A., Alsos, I. G., Bálint, M., Bik, H., Boyer, F., Chariton, A. A., Creer, S., Coissac, E., Deagle, B. E., De Barba, M., Dickie, I. A., Dumbrell, A. J., Ficetola, G. F., Fierer, N., Fumagalli, L., Gilbert, M. T. P., Jarman, S., Jumpponen, A., Kauserud, H., Orlando, L., Pansu, J. J., Pawlowski, J., Tedersoo, L., Thomsen, P. F., Willerslev, E., Taberlet, P. (2019). DNA metabarcoding – Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular ecology*, 28(8), 1857-1862. <https://doi.org/10.1111/mec.15060>

# Vedlegg

## Oppsummering fra spørreundersøkelse blant norske interessenter i marint miljø-DNA bruk høsten 2020

Utsendt spørreskjema:

Når det gjelder rapportens struktur og foreslåtte underpunkter - er det noen tema eller områder dere mener er viktige og som mangler?

- 1) Hvilke spørsmål ønsker dere svar på ved hjelp av miljø-DNA/metastrekoding?
- 2) Om referanse-databaser:
  - a) Hva/hvilke databaser bruker dere (har dere vouchere i egne samlinger?)
  - b) Har dere identifisert områder /taksongrupper som tydelig mangler eller er problematiske?
  - c) Hvilke problemer/ utfordringer har dere støtt på med referansedatabaser?
- 3) Om innsamling:
  - a) Hva tar dere prøver av (og hvorfor)?(habitat/taksa)
  - b) Hvordan samler du inn materiale (ønsker dere å dele basis-punkter i protokollen deres (rapporten vil være åpen)?)
  - c) Hvilke problemer/ utfordringer har dere møtt på i forbindelse med innsamling av materiale?
- 4) Om analyser:
  - a) Hvordan analyserer dere prøvene? (ønsker dere å dele generelle punkt i protokollen deres?)
    - i) Metabarkoding, qPCR/ddPCR, metagenomikk?
  - b) Hvilke problemer/ utfordringer treffer dere på i forbindelse med analysene?

Vi fikk svar fra Norce, NIVA, Equinor, Artsdatabanken og Det Arktiske Universitetet i Tromsø.

På samme måte som alle publiserte forskningsresultater, kan det virke som om hver av de norske interessentene hadde sine egne fokusområder og derfor også problemer og mulige løsninger. Det er derfor ikke enkelt å lage en kort oppsummering av svarene på spørreskjemaet. Vi har lagt svarene inn som kulepunkt i tilfeldig rekkefølge under hvert spørsmål, og det er ingen statistikk der flere har svart tilsvarende likt. Det er en overveiende fokus på forvaltning og mindre på grunnforskning blant de som svarte på spørsmålsskjemaet.

SVAR:

- 1)
  - Hvilke arter som finnes i tid og rom i marine miljø
  - Ønsker å kunne påvise miljøpåvirkning fra antropogene aktiviteter
  - Synliggjøre økologiske mønstre
  - Øke kunnskapen om marine økosystemer
  - Avstand fra målepunkt for detektert organisme
  - Lete etter fremmede organismer
  - Biomangfolds»målinger» (eller modelleringer?)
  - Vil forskjellige loci gi forskjellige mangfoldsestimat?
  - Biomangfoldsestimat som del av miljøovervåking
  - Følge indikatorarter i forhold til påvirkning av miljø



- Tidlig-varsling (early warning) i forhold til sykdommer og giftige stoffer
  - Kartlegging av arters egenskaper
- 2)
- a)
- SILVA (<https://www.arb-silva.de/>)
  - RDP (Ribosomal Database Project, <https://rdp.cme.msu.edu/>)
  - GenBank
  - KLEGG
  - UniProt
  - BOLD
- Vouchere ved NHM Danmark
  - Vouchere ved UM Bergen
  - Ingen vouchere
- b)
- Taksa fra vanskelig innsamlete miljø (for eksempel bentos) er underrepresentert i referansebibliotek (både prokaryotiske og eukaryotiske taksa)
  - Overrepresentasjon av andre taksa (ofte Insecta) kan lett «tippe resultatene» i gale retninger
  - GenBank overrepresentert på Vertebrata på COI, ikke så godt på andre genetiske regioner.
  - Alger, evertebrater og planter er ofte ikke godt separert ved hjelp av COI
  - Mange evertebrater mangler helt i alle databaser
  - Det virker som om det er vanskelig å lage gode referansebibliotek for mange evertebrater (primer-problemer?)
  - Får ulike svar når sammenligner ulike markører (ex færre nematoda hvis bruker COI sammenlignet med hvis bruker 18S)
  - Lavere dekningsgrad i 18S og dataene kommer mye oftere kun fra ikke-kuraterte databaser som GenBank
- c)
- Manglende dekning
  - Feilidentifiserte taksa som er registrert i referansedatabasene
  - BLAST-søk (NGS) gir ofte svar som ikke stemmer logisk med miljø
  - Det er mye mer terrestre enn marine dyr i alle databaser
- 3)
- a)
- Vann (sjøvann, ferskvann, avløpsvann)
  - Vann (åpent hav: pelagiske prøver fra vannsøylen)
  - Vann (filtrert fra havner og kaier)
  - Vann (akvakultur)
  - Sediment
  - Sediment (øverste 2 cm, vVeen grab)
  - Biofilm
- Mikrobielle samfunn
  - Makrofauna
- Miljøovervåking - søk etter måltaksa (mikrobiom)
  - Søk etter måltaksa (mikrobiom) for økosystem-tjenester eller skadelige taksa

- Miljøovervåking - beskrivelse av generelt mangfold (mikrobiom)
  - Søk etter fremmede arter
  - Miljøovervåking av benthos (makrofauna)
- b)
- vVeen grab
  - Fryser sedimentprøver fra (vVeen)grab (3xstasjon) parallelt med tradisjonell overvåking
  - Følger Spens et al., 2017 (Methods in Ecol. Evol. 8; Sigsgaard et al., 2016 Nature Ecol Evol. 1, 0004)
  - Filtrerer diverse vannprøver - protokoll avhengig av vannet. Både felt og lab. Filter 0.22µm
  - Fjernstyrte innsamlere («suger inn» vannprøve til RNA-later dyppede filter, eller vannprøver som konserveres). Enkelte også med sanntids qPCR, sandwich hybridisering (SHA) eller Elisa-analyser
  - Tester ut drone (ferskvann)
- c)
- Vanskelig å være helt sikker på at alt er sterilt
  - Prøvekonservering (kald transport, dyre buffere)
  - Store vannvolum (vanskelig å transportere)
  - Behov for store vannvolum ved lave konsentrasjoner av måltakson
  - Avgjørelse av hvor store prøvevolum som trengs
  - Valg av innsamlingsprosedyrer for bentos fra vanskelige eller ikke godt beskrevne habitat
  - Rask nok konservering av vannprøver (maks 1t etter innsamling)
  - Vann fra vannsøylen i grabben (ved sedimentprøvetakning)
  - Transport av sedimentprøve til laboratorium
- 4)
- a)
- Illumina MiSeq (18s rRNA, COI)
  - PowerSoil ekstraksjonskit
  - Leray COI, 18s V1-V2
  - MiSeq V3
  - qPCR
  - HTS
  - QIIME2 (16S rRNA)
  - Oxford Nanopore Minlon portable sequencer for long-reads sequencing
- Swarm
  - VSEARCH
  - LULU
  - USEARCHv11
  - Egne script
  - Utviklingsarbeid av statistiske analyser for presence/absence og for abundans, samt diversitetsutregninger
- b)
- Metastrekkoding
  - ddPCR
- c)
- Heterogen utbredelse av organismer (spesielt matazoa) i sediment

- Om analysene som finnes er spesifikke nok for prosjektet
- Problem med å kunne detektere falske negative
- Umulige BLAST-treff
- Mangfoldet i verktøy og analyser - hva skal man velge?
- Tolkning av data ved parallel-prøvetakning (metastrekkoding og kvantitative (tradisjonelle) analyser - spesielt når metastrekkoding resultatene er i høyere nivå-taksa enn de kvantitative analysene

### Miljødirektoratet

**Telefon:** 03400/73 58 05 00 | **Faks:** 73 58 05 01

**E-post:** [post@miljodir.no](mailto:post@miljodir.no)

**Nett:** [www.miljødirektoratet.no](http://www.miljødirektoratet.no)

**Post:** Postboks 5672 Torgarden, 7485 Trondheim

**Besøksadresse Trondheim:** Brattørkaia 15, 7010 Trondheim

**Besøksadresse Oslo:** Grensesvingen 7, 0661 Oslo

Miljødirektoratet jobber for et rent og rikt miljø. Våre hovedoppgaver er å redusere klimagassutslipp, forvalte norsk natur og hindre forurensning.

Vi er et statlig forvaltningsorgan underlagt Klima- og miljødepartementet og har mer enn 700 ansatte ved våre to kontorer i Trondheim og Oslo, og ved Statens naturoppsyn (SNO) sine mer enn 60 lokalkontor.

Vi gjennomfører og gir råd om utvikling av klima- og miljøpolitikken. Vi er faglig uavhengig. Det innebærer at vi opptre selvstendig i enkeltsaker vi avgjør, når vi formidler kunnskap eller gir råd. Samtidig er vi underlagt politisk styring. Våre viktigste funksjoner er at vi skaffer og formidler miljøinformasjon, utøver og iverksetter forvaltningsmyndighet, styrer og veileder regionalt og kommunalt nivå, gir faglige råd og deltar i internasjonalt miljøarbeid.