

## **ДНК из водной среды - сбор и выделение**

*Туранов С.В.*

*Лаборатория молекулярной систематики ННЦМБ ДВО РАН, г. Владивосток.*

*Кафедра Водных биоресурсов и аквакультуры ФГБОУ ВО "Дальрыбвтуз", г. Владивосток.*

e-mail: [sturcoal@mail.ru](mailto:sturcoal@mail.ru)

ДНК из окружающей среды, или средовая ДНК, или экоДНК (<http://sakhtaimen.ru/ru/news/51/>) или ДНКос (Кирильчик и др., 2018) [англ. eDNA, environmental DNA] - как правило, внеклеточная ДНК, которая может быть собрана из воды, почвы, снега, пыли и многих других источников (Ficetola et al., 2008; Bohmann et al., 2014; Taberlet et al., 2018). В отличие от ДНК отдельного организма (индивидуальный образец ДНК) средовая ДНК в настоящее время чаще всего применяется в качестве инструмента для мета-анализа генетического или таксономического разнообразия природных сообществ (Bohmann et al., 2014; Beng, Corlett, 2020). Кроме того, с помощью соответствующих методов, она может использоваться для идентификации конкретных видовых таксонов с целью подтверждения их нахождения в определённом месте (водоёме, реке и т.п.) (см. например Ficetola et al., 2008; Levi et al., 2019).

Ранее широко применяемая в микробиологии ДНК из водной среды (Ogram et al., 1987; Somerville et al., 1989), в отечественной литературе также не менее 1 раза упоминаемая как акваДНК (Никифоров и др., 2018), получила вторую волну развития в качестве инструмента для описания и мониторинга биологического разнообразия, а также выявления инвазивных видов многих водных организмов (Jerde et al., 2011; Thomsen et al., 2012; Rees et al., 2014; Goldberg et al., 2015; Turner et al., 2015; Valentini et al., 2016; Goldberg et al., 2016; Pawlowski et al., 2018; Weigand et al., 2019; Pochardt et al., 2020; Singer et al., 2020). Кроме того, применяется для неинвазивного мониторинга в рыбном хозяйстве, при внедрении энтузиастами на локальном уровне (см. например Кирильчик и др., 2018; Kirilchik, 2018), рядом стран международного консорциума, а также национальном уровне (Leese et al., 2018; Hering et al., 2018; Baillie et al., 2019). В России практика применения ДНК из окружающей среды находится в зачаточном состоянии (однако см. Velichko et al., 2014; Milyutina et al., 2019; Shchepin et al., 2019a,b; Lecaudey et al., 2019; Schenekar et al., 2020a,b; Belevich et al., 2020), но в условиях удешевления методов высокопроизводительного секвенирования имеет огромный потенциал развития (Кирильчик и др., 2018; Kirilchik, 2018; Никифоров и др., 2018). В числе возможных препятствий на пути к внедрению экспресс-анализа биологического разнообразия с

помощью ДНК из окружающей среды можно отметить и отставание в развитии на национальном уровне референсных баз данных (Weigand et al., 2019; McGee et al., 2019; Schenekar et al., 2020b), от которых во многом зависит точность и осмысленность такого вида анализа. С другой стороны, аналогичные препятствия для развития тест-систем идентификации определённых видов (Amberg et al., 2015; Gingera et al., 2016; Pflieger et al., 2016; Yusishen et al., 2020; Schenekar et al., 2020a) отсутствуют, но и здесь видится не востребованность направления неинвазивного мониторинга, который предлагается с помощью средовой ДНК.

В 2019 г. получил поддержку наш проект грантов Президента РФ "Разработка неинвазивных методов мониторинга ценных и исчезающих видов рыб Дальнего Востока России с использованием ДНК из окружающей среды". Проект предполагает решение 3 основных задач - (1) сборка референсной базы нуклеотидных последовательностей (библиотеки ДНК-штрихкодов) для морских и пресноводных рыб Дальнего Востока России; (2) апробация экспресс-мониторинга биоразнообразия рыб с использованием метабаркодинга ДНК из окружающей среды; (3) разработка методов идентификации отдельных (ценных и исчезающих) видов рыб.

Частичная библиотека ДНК-штрихкодов рыб озера Ханка к настоящему моменту опубликована (Туранов и др., 2019) и готова к использованию в качестве референса для данных высокопроизводительного секвенирования ампликлонов (метабаркодинга) средовой ДНК из этого водоёма. Также к публикации готовятся дополнения к референсной базе морских рыб из ДВ морей.

Параллельно с мониторингом разнообразия рыб естественных водоёмов в целях отработки метода была поставлена задача провести отбор и анализ средовой ДНК из мезокосмов (аквариумов, танков), где условия среды, а также численность рыб строго определена (Kelly et al., 2014; Morey et al., 2020). Для этого использовали аквариумы действующих экспозиций Научно-образовательный комплекс "Приморский Океанариум", в которых содержатся морские и пресноводные рыбы Дальнего Востока, в т.ч. амурский (*Acipenser schrenckii*) и сибирский (*Acipenser baerii baerii*) осетры, а также калуга (*Huso dauricus*). Забор воды в был осуществлён в декабре 2019г. Кроме того, по совету С.С. Макеева (<http://www.smakeev.com/page/archive/>), который является одним из немногих популяризаторов направления, была инициирована разработка неинвазивной тест-системы для идентификации сахалинского осетра *Acipenser mikadoi*. С этой целью в сентябре 2019 г. проведены сбор и фильтрация воды из танков с производителями и молодью данного вида на территории Анюйского рыбоводного завода (с. Найхин,

Хабаровский край) Амурского филиала ФГБУ "Главрыбвод" согласно предварительно заключенному договору между этим учреждением и ННЦМБ ДВО РАН.

На этапе сбора ДНК из водной среды перед нами встал вопрос о выборе метода для фильтрации и фиксирования ДНК из окружающей среды для обеспечения возможности наиболее длительного хранения без существенной деградации нуклеиновых кислот, в т.ч. без заморозки (до 2 недель). Кроме того, метод должен гарантировать простоту сбора материала в полевых условиях и минимальный риск перекрёстной контаминации. Дополнительным условием должна быть мобильность и простота сбора и фиксации для того, чтобы "набор" можно было отправить коллегам в любую точку мира для осуществления сбора образца воды и пересылки зафиксированного фильтра обратно. Для российской части актуален вопрос использования неспиртовых фиксирующих растворов. По вполне понятным причинам в открытой продаже нет готовых наборов, которые могли бы обеспечить наши потребности даже в частичной мере. Есть замечательные разработки коллег из Smith-Root (Thomas et al., 2018) которые предлагают мобильную станцию для отбора и фиксации средовой ДНК, однако данная установка едва ли будет по карману энтузиастам и совершенно немобильна в отношении запроса образцов у коллег из-за рубежа или с другого конца нашей необъятной.

### **Набор для фильтрации и фиксирования ДНК из водной среды.**

Мы воспользовались опытом зарубежных коллег (Laramie et al., 2015; Carim et al., 2016; Hobbs et al., 2017; The eDNA Society, 2019; Metabarcoding School Yunnan, 2019), и на этой основе собрали свой аналог набора для фильтрации и фиксации образцов водной ДНК (Рис. 1). В набор входят:

1. Шприц Жане объемом 150 мл (шкала до 160 мл) трехдетальный однократного применения с наконечником "Луер-Лок". 1 шт. Служит для забора воды и фильтрации её посредством пропускания через насадку-фильтр.
2. Шприц одноразовый объёмом не менее 3 мл. 1 шт. Предназначен для внесения на фильтр фиксирующего раствора.
3. Фильтрующая насадка диаметром 25 мм с размером пор - 0,45 мкм. Стерильная. Материал изготовления - PES. 1 шт. Предназначен для фильтрации выпускаемой из шприца воды.
4. Перчатки смотровые. 2 шт. Для снижения вероятной контаминации.

5. Пробирка объемом 2 мл с буфером для фиксации фильтров (здесь - буфер Лонгмайера).
6. Комби-стоппер заглушка с винтовым соединением Луер-Лок с наружной и внутренней резьбой. 2 шт. Предназначены для закрытия входного и выходного отверстий фильтра после фильтрации и введения фиксирующего раствора.
7. Этикетка. 1 шт.





Рисунок 1. Набор и содержимое набора для фильтрации и фиксации ДНК из водной среды. Вверху – вид собранного набора, внизу – состав набора, детально.






## Фильтрация.

Ход работы при заборе, фильтрации и фиксировании ДНК из водной среды с помощью этого набора сводится к следующим шагам:

№	Демонстрация	Действие
1		Раскрыть пакет и надеть перчатки.
2		Достать и распаковать шприц.

№	Демонстрация	Действие
3		<p>Набрать в шприц воду.</p>
4		<p>Достать фильтрующую насадку и присоединить её к выводному концу шприца через соединение луер-лок.</p>



№	Демонстрация	Действие
5		<p>Пропустить воду через фильтр. Можно использовать модифицированный пистолет для герметика.</p>
6	<p>Повторить процедуры в пунктах 5 и 6 в зависимости от требуемого для анализа объёма воды. Рекомендуем пропустить через фильтр не менее 450 мл.</p>	
7		<p>Пропустить через фильтр воздух для удаления остатков воды.</p>
8		<p>Достать пробирку с буфером Лонгмайера и шприц для него.</p>



№	Демонстрация	Действие
9		<p>Набрать содержимое пробирки в шприц.</p>
10		<p>Пропустить содержимое шприца через фильтрующую насадку. Шприц не снимаем.</p>
11		<p>Устанавливаем заглушку комби-стоппер на выводной конец фильтрующей насадки. Шприц не снимаем.</p>

№	Демонстрация	Действие
12		<p data-bbox="991 197 1484 338">Снимаем шприц с входного конца фильтрующей насадки и надеваем на него комби-стоппер концом луер-лок.</p>

№	Демонстрация	Действие
13		<p>Подписываем простым карандашом этикетку и помещаем в zip-пакетик вместе с фильтрующей насадкой. Хранить до 2 недель при температуре окружающей среды. Заморозить при первой возможности и хранить при -20 градусах по цельсию.</p>

### Выделение ДНК из фильтров.



При выделении средовой ДНК из шприцевых фильтров возникают дополнительные трудности, которых нет при обработке индивидуальных фильтров после вакуумной фильтрации воды. Так, необходимо каким-либо способом извлечь максимальное количество осевшей на фильтре нуклеиновой кислоты, не прибегая при этом к уничтожению или вскрытию самой фильтрующей насадки. К счастью, весьма успешный опыт выделения нуклеиновых кислот из фильтрующих шприцевых насадок снова обнаружен у микробиологов (Somerville et al., 1989; Kesberg, Schleheck, 2013). Мы модифицировали протокол выделения, предлагаемый коллегами, не применяя обработку ультразвуком (однако см. Kesberg, Schleheck, 2013; Dzhendloda et al., 2017) и используя российский коммерческий набор "М-Сорб-ООМ" от компании Синтол (г. Москва).

Для выделения необходимы следующие материалы: перчатки, наконечники с фильтром объёмом до 1000, 200 и 10 мкл, распылитель с 10% раствором отбеливателя (Chlorox, белизна и т.п.), пробирки объёмом 1.5-2 мл, шприцы одноразовые объёмом от 1 до 5 мл, адаптер диффузионный female/female, комплект для выделения нуклеиновых кислот набор «М-Сорб-ООМ».




Оборудование: вортекс, центрифуга с ротором для пробирок объёмом 1.5-2 мл, дозаторы переменного объёма, штативы для хранения пробирок на 1.5-2 мл (RP-100 или RP-80), штативы для пробирок на 1.5-2 мл «рабочее место», магнитный штатив для пробирок объёмом 1.5-2 мл.


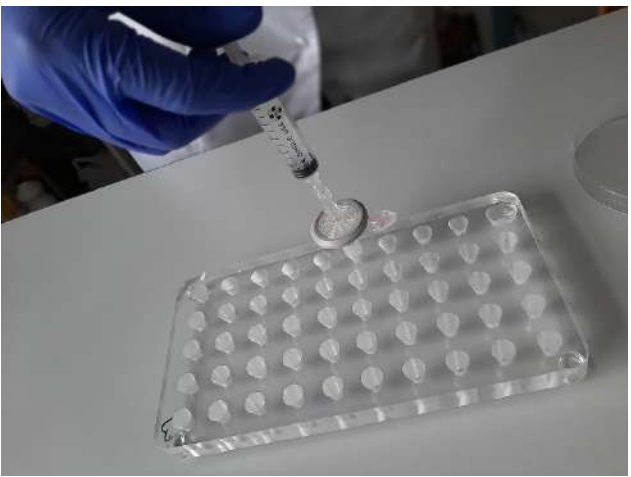


Ход работы при выделении ДНК из дискового шприцевого фильтра сводится к следующим шагам:

№	Демонстрация	Действие
1		<p>С вечера оставляем реактивы (набор М-Сорб) и образцы (фиксированные фильтровальные насадки) при комнатной температуре.</p>
2		<p>Во избежание контаминации избавляемся от чужеродной ДНК, т.е. обрабатываем рабочую поверхность столов и бокса, штативы, дозаторы, центрифугу (и ротор) 10% раствором отбеливателя. Бокс, в котором будет проводиться выделение, необходимо предварительно простерилизовать УФ-облучением.</p>
3		<p>В соответствии с количеством выделяемых проб разнести лизирующий раствор объёмом по 600 мкл в индивидуальные пробирки, прогреть пробирки с лизирующим раствором до температуры 65°C непосредственно перед началом выделения. Все реактивы из набора перемешать плавным переворачиванием.</p>
4		<p>Подготавливаем и маркируем 2 набора пробирок объёмом 1.5-2 мл для смыва содержимого фильтра в соответствии с количеством проб, которое необходимо обработать. Одна из пробирок должна быть обозначена как «контроль».</p>
5		<p>Надев новую пару перчаток, берём новый шприц и с помощью иглы набираем из пробирки в шприц разогретый лизирующий раствор.</p>



№	Демонстрация	Действие
		
6		<p>Присоединяем к <b>выходному</b> отверстию шприца <b>новый</b> диффузионный адаптер.</p>
7		<p>Берём префиксированный фильтр, избавляемся от парафилма (или заглушки) на <b>выходном</b> конце фильтра.</p>

№	Демонстрация	Действие
8		<p>Соединяем свободный конец диффузионного адаптера с <b>ВЫХОДНЫМ</b> отверстием фильтра.</p>
9		<p>Избавляемся от парафила (или заглушки) на <b>ВХОДНОМ</b> конце фильтра.</p>
10		<p>Подносим всю конструкцию <b>ВХОДНЫМ</b> отверстием фильтра к подготовленной пробирке и пропускаем через неё лизирующий раствор из шприца.</p>

№	Демонстрация	Действие
11		<p>Снимаем с конструкции шприц, набираем воздух (до 3 кубических см) и пропускаем воздух через фильтр для сливания в пробирку остатков лизирующего раствора, пока не появится пена.</p>
12	<p>Далее следуем инструкции по выделению нуклеиновых кислот с помощью набора «М-Сорб-ООМ». Полученный раствор очищенной ДНК храним при температуре -20 градусов по Цельсию.</p>	

### **Благодарности:**

Автор заметки выражает благодарность О.А. Рутенко, без которой весь рабочий процесс затянулся бы на долгое время, а также сотрудникам лаборатории молекулярной систематики, внёсшим посильный вклад в это безнадёжное мероприятие.

Вдохновителем со стороны энтузиастов является Сергей Степанович Макеев, который всегда охотно обсуждает тренды направления и видит его непосредственное применение на гидробионтах Сахалинской области.

Отдельно хочется отметить организаторов международных школ Intensive course in DNA Metabarcoding Галину Гусарову, а также Yunnan Metabarcoding School-2019 Проф. Дугласа Ю (Prof. Douglas W. Yu ). Благодаря участию в данных школах у автора появилась уверенность в продвижении работ со средовой ДНК.

### **Список источников:**

Кирильчик, С. В., Макаров, М. М., Аношко, П. Н., Астахова, М. С., Смолин, И. Н., & Дзюба, Е. В. Апробация метода количественного анализа ДНК окружающей среды для оценки запасов и мониторинга популяций байкальского омуля. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2018.

Никифоров, А. И., Гаврилов, Б. А., Круглова, Д. К., Посохова, Е. С., Рабазанов, Н. И., & Орлов, А. М. (2018). Исследования с использованием выделенной из водной среды ДНК: состояние и перспективы. *УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ*.

Туранов, С. В., Картавец, Ю. Ф., & Шаповалов, М. Е. (2019). Первый опыт исследования видового разнообразия рыб озера Ханка с использованием методов ДНК-штрихкодирования. *Генетика*, 55(4), 439-448.

Amberg, J. J., Mccalla, S. G., Monroe, E., Lance, R., Baerwaldt, K., & Gaikowski, M. P. (2015). Improving efficiency and reliability of environmental DNA analysis for silver carp. *Journal of Great Lakes Research*, 41(2), 367-373.

Baillie, S.M., McGowan, C., May-McNally, S., Leggatt, R., Sutherland, B.J.G., and Robinson, S. 2019. Environmental DNA and its applications to Fisheries and Oceans Canada: National needs and priorities. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 3329: xiv + 84 p.

Belevich, T. A., Ilyash, L. V., Milyutina, I. A., Logacheva, M. D., & Troitsky, A. V. (2020). Photosynthetic Picoeukaryotes Diversity in the Underlying Ice Waters of the White Sea, Russia. *Diversity*, 12(3), 93.

Beng, K. C., & Corlett, R. T. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation*, 1-33.

Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., ... & De Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in ecology & evolution*, 29(6), 358-367.

Carim, K. J., McKelvey, K. S., Young, M. K., Wilcox, T. M., & Schwartz, M. K. (2016). A protocol for collecting environmental DNA samples from streams. *Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-355. Fort Collins, CO: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 18 p., 355.*

Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*, 4(4), 423-425.

Gingera, T. D., Steeves, T. B., Boguski, D. A., Whyard, S., Li, W., & Docker, M. F. (2016). Detection and identification of lampreys in Great Lakes streams using environmental DNA. *Journal of Great Lakes Research*, 42(3), 649-659.

Goldberg, C. S., Strickler, K. M., & Pilliod, D. S. (2015). Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 183, 1-3.



Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., ... & Laramie, M. B. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in ecology and evolution*, 7(11), 1299-1307.

Hering, D., Borja, A., Jones, J. I., Pont, D., Boets, P., Bouchez, A., ... & Leese, F. (2018). Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research*, 138, 192-205.

Hobbs J., Goldberg C., Helbing C.C., Veldhoen N.N. BC Ministry of Environment. 2017. Environmental DNA Protocol for Freshwater Aquatic Ecosystems.

Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2011). "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4(2), 150-157.

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(1).

Kesberg, A. I., & Schleheck, D. (2013). Improved protocol for recovery of bacterial DNA from water filters: Sonication and backflushing of commercial syringe filters. *Journal of microbiological methods*, 93(1), 55-57.

Kirilchik, S. V. (2018). Environmental DNA as a new tool for assessing the biodiversity of Lake Baikal. *Limnology and Freshwater Biology*, 71-73.

Laramie, M.B., Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., and Strickler, K.M., 2015, Environmental DNA sampling protocol—Filtering water to capture DNA from aquatic organisms: U.S. Geological Survey Techniques and Methods, book 2, chap. A13, 15 p., <http://dx.doi.org/10.3133/tm2A13>.

Lecaudey, L. A., Schletterer, M., Kuzovlev, V. V., Hahn, C., & Weiss, S. J. (2019). Fish diversity assessment in the headwaters of the Volga River using environmental DNA metabarcoding. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(10), 1785-1800.

Leese, F., Bouchez, A., Abarenkov, K., Altermatt, F., Borja, Á., Bruce, K., ... & Duarte, S. (2018). Why we need sustainable networks bridging countries, disciplines, cultures and generations for aquatic biomonitoring 2.0: a perspective derived from the DNAqua-Net COST action. In *Advances in ecological research* (Vol. 58, pp. 63-99). Academic Press.

Levi, T., Allen, J. M., Bell, D., Joyce, J., Russell, J. R., Tallmon, D. A., ... & Yu, D. W. (2019). Environmental DNA for the enumeration and management of Pacific salmon. *Molecular ecology resources*, 19(3), 597-608.

McGee, K. M., Robinson, C., & Hajibabaei, M. (2019). Gaps in DNA-based biomonitoring across the globe. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 337.

Metabarcoding School Yunnan 2019. Field Training Protocol for eDNA sampling from water.

Milyutina, I. A., Belevich, T. A., Ilyash, L. V., & Troitsky, A. V. (2019). Insight into picophytoplankton diversity of the subarctic White Sea—The first recording of Pedinophyceae in environmental DNA. *MicrobiologyOpen*, 8(10), e892.

Morey, K. C., Bartley, T. J., & Hanner, R. H. Validating environmental DNA metabarcoding for marine fishes in diverse ecosystems using a public aquarium. *Environmental DNA*.

Ogram, A., Sayler, G. S., & Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods*, 7(2-3), 57-66.

Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Beja, P., Boggero, A., ... & Feio, M. J. (2018). The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e) DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 637, 1295-1310.

Pfleger, M. O., Rider, S. J., Johnston, C. E., & Janosik, A. M. (2016). Saving the doomed: Using eDNA to aid in detection of rare sturgeon for conservation (Acipenseridae). *Global ecology and conservation*, 8, 99-107.

Pochardt, M., Allen, J. M., Hart, T., Miller, S. D., Yu, D. W., & Levi, T. (2020). Environmental DNA facilitates accurate, inexpensive, and multiyear population estimates of millions of anadromous fish. *Molecular Ecology Resources*, 20(2), 457-467.

Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R., & Gough, K. C. (2014). The detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5), 1450-1459.

Schenekar, T., Schletterer, M., & Weiss, S. J. (2020a). Development of a TaqMan qPCR protocol for detecting *Acipenser ruthenus* in the Volga headwaters from eDNA samples. *Conservation Genetics Resources*, 1-3.

Schenekar, T., Schletterer, M., Lecaudey, L. A., & Weiss, S. J. (2020b). Reference databases, primer choice, and assay sensitivity for environmental metabarcoding: Lessons learnt

from a re-evaluation of an eDNA fish assessment in the Volga headwaters. *River Research and Applications*.

Shchepin, O. N., Schnittler, M., Erastova, D. A., Prikhodko, I. S., Dahl, M. B., Azarov, D. V., ... & Novozhilov, Y. K. (2019a). Community of dark-spored myxomycetes in ground litter and soil of taiga forest (Nizhne-Svirskiy Reserve, Russia) revealed by DNA metabarcoding. *Fungal ecology*, 39, 80-93.

Shchepin, Oleg N., Martin Schnittler, Nikki H.A. Dagamac, Dmitry V. Leontyev, and Yuri K. Novozhilov. "Unexplored Diversity of Microscopic Myxomycetes: Evidence from Environmental DNA." *Plant Ecology and Evolution* 152, no. 3 (2019b): 499-506. Accessed April 22, 2020. doi:10.2307/26819641.

Singer, G. A., Shekarriz, S., McCarthy, A., Fahner, N., & Hajibabaei, M. (2020). The utility of a metagenomics approach for marine biomonitoring. *bioRxiv*.

Somerville, C. C., Knight, I. T., Straube, W. L., & Colwell, R. R. (1989). Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(3), 548-554.

Taberlet, P., Bonin, A., Coissac, E., & Zinger, L. (2018). *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring*. Oxford University Press.

The eDNA Society (2019) *Environmental DNA Sampling and Experiment Manual Version 2.1*. Otsu, Japan.

Thomas, A. C., Howard, J., Nguyen, P. L., Seimon, T. A., & Goldberg, C. S. (2018). ANDe™: A fully integrated environmental DNA sampling system. *Methods in ecology and evolution*, 9(6), 1379-1385.

Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Møller, P. R., Rasmussen, M., & Willerslev, E. (2012). Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS one*, 7(8).

Turner, C. R., Uy, K. L., & Everhart, R. C. (2015). Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, 183, 93-102.

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

Velichko, N., Averina, S., Gavrilova, O., Ivanikova, N., & Pinevich, A. V. (2014). Probing environmental DNA reveals circum-Baltic presence and diversity of chlorophyll a/b-containing filamentous cyanobacteria (genus *Prochlorothrix*). *Hydrobiologia*, 736(1), 165-177.

Weigand, H., Beermann, A. J., Ciampor, F., Costa, F. O., Csabai, Z., Duarte, S., ... & Strand, M. (2019). DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *The Science of the total environment*, 678.

Yusishen, M. E., Eichorn, F. C., Anderson, W. G., & Docker, M. F. (2020). Development of quantitative PCR assays for the detection and quantification of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) environmental DNA. *Conservation Genetics Resources*, 12(1), 17-19.