

eDNA-inventering av fiskfaunan i Mälaren, med fokus på svartmunnad smörbult – Stockholms län

Patrick Hernvall, Viktor Birgersson & Micaela Hellström



MIX Research
Sweden

eDNA-inventering av fiskfaunan i Mälaren, med fokus på svartmunnad smörbult – Stockholms län

Utgiven av:	MIX Research Sweden AB
Datum:	2023-02-14
Uppdragsgivare:	Länsstyrelsen i Stockholms län. Projektet har finansierats med medel från Havs- och vattenmyndigheten avseende främmande invasiva arter, anslag 1:11.
Författare:	Patrick Hernvall, Viktor Birgersson & Micaela Hellström
Kartor:	Rasmus Emanuelsson
Granskare:	Författarna samt uppdragsgivarna
Omslagsbild	Provtagning på station 10 (Viktor Birgersson)
Fältarbete	Patrick Hernvall, Viktor Birgersson
Uppdraget utfördes av:	MIX Research Sweden AB Adress: Uppsala Science Park, Dag Hammarskjölds väg 34A, 75237 Uppsala E-post: info@mixresearch.se Telefon: 070-782 03 10
Rapporten citeras som:	Hernvall, P. Birgersson, V. Hellström, M. 2022. eDNA-inventering av fiskfaunan i Mälaren, med fokus på svartmunnad smörbult – Stockholms län. MIX Research Sweden. Rapport 2022:14.



MIX Research
Sweden

SAMMANFATTNING

Miljö-DNA, eller eDNA (från engelskans environmental DNA), är samlingsnamnet på de genetiska avtryck som alla levande organismer lämnar efter sig i miljön i form av till exempel fotspår, svett, slem och fingeravtryck. Eftersom genetiska analyser utvecklats mycket under de senaste decennierna är det fullt möjligt att fånga upp dessa avtryck för att identifiera arter som finns i en given miljö. eDNA kan utvinnas från en liten mängd vatten och med hög precision ange vilka arter som är närvarande i till exempel sjöar, dammar, floder och hav. Detta verktyg är välutvecklat i vattenmiljöer och har visat sig vara användbart för miljöövervakningen. eDNA är vidare relativt kortlivat i vattenmassan och ger därför en bild av arters förekomst i nutid.

Den 18–19 augusti 2022 utförde MIX Research Sweden AB, på uppdrag av Länsstyrelsen i Stockholm, en eDNA-undersökning med flerartsanalys av fisk med fokus på den invasiva arten svartmunnad smörbult. Sammanlagt inventerades 20 lokaler i Mälaren, varav fem även undersöktes 2018. Studiens syfte var att undersöka fisksamhället i stort med särskilt fokus på eventuella förekomster av svartmunnad smörbult. Vidare undersöks skillnader av eDNA-baserad artförekomst över tid på de fem lokaler som även undersöktes 2018. Rapporten syftar vidare till att identifiera skillnader mellan eDNA och traditionella inventeringsmetoder, samt hur tillämpning av dessa kan komplettera varandra.

Totalt detekterades 29 fiskarter i undersökningen. Svartmunnad smörbult detekterades inte på någon av lokalerna. Jämförelsen av relativ biomassa (eDNA) och biomassa (fångstvikt) av nätprovfiske visade på en relativt god samstämmighet, något som tidigare studier visat på. Jämförelserna av eDNA över tid på de fem lokaler där prov togs både 2018 och 2022 visade på tydliga säsongsvariationer.

Sammanfattningsvis visar resultatet att eDNA som metod har fördelar vid inventering av diversitet då metoden i regel detekterar fler arter än traditionella metoder som nätprovfiske, och i synnerhet sällsynta samt svårfångade arter. Vid nätprovfiske erhålls dock viktiga data om individers kön, storlek och hälsa. Vidare är eDNA kostnadseffektivt och kan ske i svårtillgängliga områden vilket möjliggör undersökningar på en större geografisk skala än vad som tidigare varit möjligt. På detta sätt kan metoden generera stora dataset som kan bidra till eventuella åtgärdsbeslut eller inducera uppföljande, mer detaljerade inventeringar. Kombinerade inventeringsmetoder med eDNA och traditionella metoder blir därför ett kraftfullt verktyg för att erhålla goda underlag för åtgärder samt beslut inom förvaltning och miljöövervakning.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	3
Innehållsförteckning	5
1 Inledning	6
2 Metoder	7
2.1 Fältarbete	7
2.2 Laboratoriearbete	9
2.3 Analyser DNA	9
3 Resultat	10
3.1 Sekvenseringsresultat	10
3.2 Fiskarternas förekomst på lokalerna	10
3.3 Jämförelse eDNA-undersökning 2022 och historiska provfisken	12
3.4 Jämförelse eDNA-undersökningar på fem lokaler mellan 2018 och 2022	16
4. Diskussion	19
5. Referenser	21
Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser?	22
Bilaga 2. Laboratoriearbete	23
Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA - kontroller	24
Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas	25
Bilaga 5: Resultat av kvalitetskontroller för flerartsanalyser	26
Bilaga 6: Rådata för detekterade arter, antal verifierade läsningar	27
Bilaga 7: Procentuell fördelning av arter 2018 – 2022	28

1 INLEDNING

Miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) är samlingsnamnet på de genetiska avtryck som alla levande organismer lämnar efter sig i miljön i form av bland annat fotspår, svett, slem och fingeravtryck (Pedersen m.fl. 2015). Taberlet m.fl. (2012) definierar eDNA som ”det DNA som kan studeras från efterlämnade spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet”. Då genetiska analyser har utvecklats mycket under de senaste decennierna är det fullt möjligt att genom vatten- eller jordprov fånga upp dessa avtryck och med precisa metoder identifiera de arter som finns i en given miljö. eDNA kan utvinnas från en liten mängd vatten och med hög precision ange vilka arter som är närvarande. Detta verktyg är välutvecklat i vattenmiljöer och har visat sig vara användbart inom miljöövervakningen (Harper m.fl. 2015, 2018, Lawson Handley 2015, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017, Bruce m. fl. 2021). eDNA är vidare relativt kortlivat i vattenmassan (maximalt cirka två veckor beroende på yttre faktorer) och ger därför en bild av arters förekomst i nutid (Brys m.fl. 2021).

Artinventeringar i svenska vatten dateras tillbaka till 1500 talet, och information om arters förekomst, levnadsvillkor och biologi är grundläggande som underlag för myndigheter då beslut skall fattas om artskydd, åtgärder eller tillståndsprövningar etc. Traditionella artinventeringar kan vara både tids- och resurskrävande vilket gör storskaliga undersökningar av arters utbredning och förekomster dyra och svåra att genomföra. Destruktiva inventeringsmetoder påverkar dessutom sällsynta eller hotade arter negativt. Eftersom eDNA-metoden är en icke-dödande metod är den idealisk för kartläggning av biologisk mångfald. Informationen kan användas för att lokalisera områden som kräver traditionella metoder för vidare undersökningar av arter gällande ålder, storleksfördelning, och reproduktionsframgång. En korrekt analys och tolkning av eDNA-resultat kräver kontinuerlig uppdatering av traditionell och genetisk taxonomi, molekylära metoder och arters ekologi.

Introduktion av invasiva arter faciliteras ofta genom mänsklig aktivitet och kan ha en negativ påverkan på lokala ekosystem. Dessa arter kan ändra dynamiken i lokala ekosystem och anses vara biologiska föroreningar som utgör ett stort hot för den lokala biologiska mångfalden. En sådan art är den svartmunnade smörbulten (*Neogobius melanostomus*) som har spridits från Svarta- och Kaspiska Havet till Östersjön via fartygstrafik då ballastvatten släppts ut. Den svartmunnade smörbulten registrerades 2008 i Karlskrona skärgård i Blekinge (Florin m.fl. 2021) och har sedan dess även noterats i bland annat Uppland, samt nyligen utanför Örnsköldsvik i Västerbotten. Vidare genomförde MIX Research Sweden en eDNA-undersökning av en nyligen restaurerad våtmark på Ålö (Utö) under våren 2022 där arten detekterades i anslutning till inloppet.

Det finns farhågor att arten kan ha tagit sig in i Mälaren, men artfynd har inte verifierats (TT 2022). Arten sammanblandas lätt med andra smörbultar. Det är av stor vikt att ta reda på om arten etablerat sig i Mälaren eftersom det finns en risk för påverkan av ekosystemet.

I augusti 2022 utförde MIX Research Sweden, på uppdrag av Länsstyrelsen i Stockholm, en eDNA-undersökning med flerartsanalys av fisk med fokus på svartmunnad smörbult. Totalt 20 lokaler inkluderades i undersökningen, av vilka fem även undersöktes 2018 (Hellström m.fl.

2018). Studiens syfte var att undersöka fisksamhället i stort med särskilt fokus på eventuella förekomster av svartmunnad smörbult. Vidare undersöks skillnader av eDNA-baserad artförekomst över tid på de fem lokaler som undersöktes 2018. Rapporten syftar vidare till att identifiera skillnader mellan eDNA och traditionella inventeringsmetoder, samt hur tillämpning av dessa kan komplettera varandra.

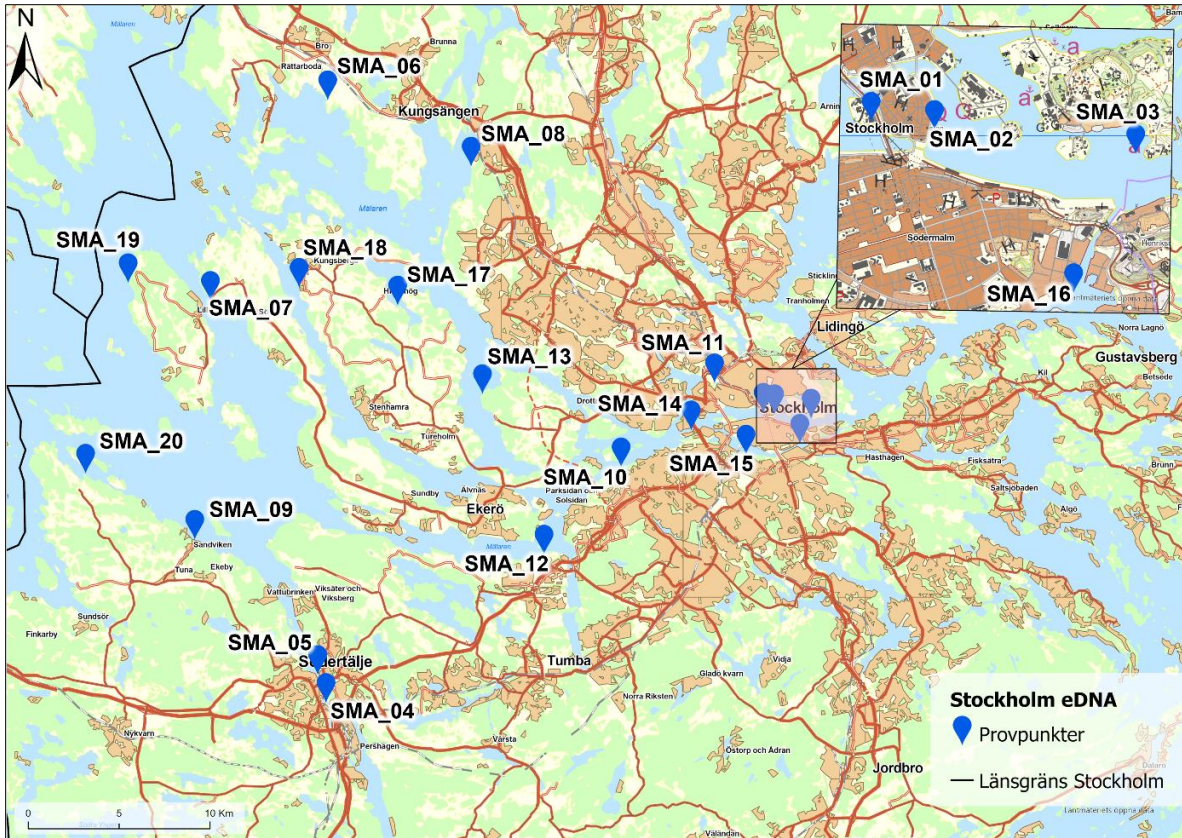
2 METODER

2.1 FÄLTARBETE

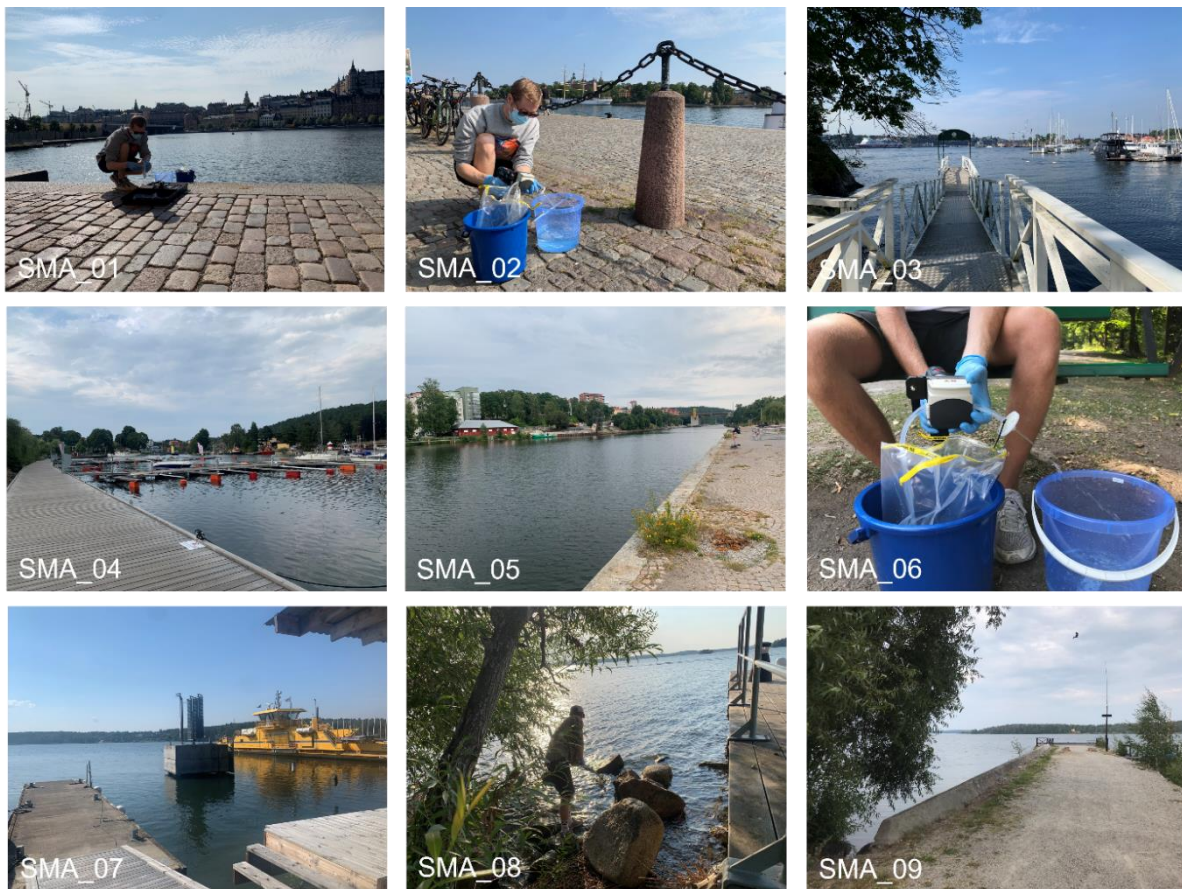
Fältarbetet utfördes den 18 – 19 augusti 2022 (Tabell 1, Figur 2; 3). Innan eDNA-provtagningen genomfördes steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila och DNA-fria produkter. För varje lokal samlades fem liter vatten in i form av delprover som slogs ihop till ett samlingsprov för ett representativt resultat (Harper m.fl. 2018, Kačergytė m.fl. 2021, Bruce m.fl. 2021). Omkring 3–5 liter vatten filtrerades med hjälp av en peristaltisk fältpump (Burkle GMBH) genom 5 µm GF/0,8 µm PES inkapslade filterenheter (NatureMetrics, UK). Filtren tömdes på vatten och placerades i -20 °C fältfrys innan de transporterades till MIX Research Swedens laboratorier för vidare analyser. Provtagningsutrustning steriliserades mellan lokalerna.

Tabell 1. Information om de undersökta lokalerna.

Lokalnamn	Prov	Datum	V ml	T °C H ₂ O	Djup (m)	Tid	Koordinat SWEREF 99 TM	
							Nord	Öst
Riiddarfjärden - Riiddarholmen (kaj)	SMA_01	2022-08-18	5000	24	0-2	10:38	6580144	674394
Nedströms Karl-Johanslussen (hamnområde)	SMA_02	2022-08-18	5000	24	0-2	11:00	6580061	675025
Waldermarsudde (småbåtshamn)	SMA_03	2022-08-18	4000	23	0-2	11:54	6579820	677031
Södertälje sluss (småbåtshamn)	SMA_04	2022-08-18	5000	23	0-2	18:00	6564176	650355
Södertälje kanal (kaj)	SMA_05	2022-08-18	5000	23	0-2	18:30	6565718	649894
Mälaren (Skarven 7)	SMA_06	2022-08-19	3000	25	0-2	17:00	6597336	650449
Mälaren (Prästfjärden 9)	SMA_07	2022-08-19	5000	24	0-2	12:50	6587750	643270
Mälaren (Görväln 5)	SMA_08	2022-08-19	4500	24	0-2	17:50	6593685	658335
Mälaren (Prästfjärden 9)	SMA_09	2022-08_18	5000	23	0-2	17:30	6573155	643137
Mälaren (Fiskarfjärden 4)	SMA_10	2022-08_18	5000	24	0-2	15:10	6577138	666584
Mälaren (Ulvsundasjön 3)	SMA_11	2022-08_18	5000	24	0-2	10:00	6581775	671718
Mälaren (Röderstensfjärden 8)	SMA_12	2022-08_19	5000	23	0-2	10:00	6572338	662343
Mälaren (Fiskarfjärden 4)	SMA_13	2022-08_19	5000	24	0-2	15:45	6581170	658958
Mälaren (Riiddarfjärden 1)	SMA_14	2022-08-18	5000	23	0-2	13:35	6579170	670439
Mälaren (Årstaviken 2)	SMA_15	2022-08-18	5000	25	0-2	14:20	6577840	673450
Hammarby sjö	SMA_16	2022-08-18	5000	21	0-2	12:48	6578434	676412
Hilleshögsviken	SMA_17	2022-08-19	4000	24	0-2	15:00	6586259	654331
Mälaren (Långtarmen 6)	SMA_18	2022-08-19	4500	25	0-2	14:20	6587099	648520
Mälaren (Prästfjärden 9)	SMA_19	2022-08-19	5000	24	0-2	11:45	6587270	639473
Mälaren (Prästfjärden 9)	SMA_20	2022-08-18	4500	24	0-2	16:40	6578613	635622



Figur 1. Översikt av provtagningslokalernas placering i undersökningsområdet.



Figur 2. Bilder över provtagningslokaler SMA_01 – SMA_09.



Figur 3. Bilder över provtagningslokalerna SMA_10 – SMA_20.

2.2 LABORATORIEARBETE

Insamlat eDNA extraherades enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier specifikt byggda för analyser av eDNA. Samtliga prover analyserades med flerartsanalys efter förekomst av fisk (Miya m.fl. 2015). Varje PCR-prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs till ett prov under sekvenseringen och erhållna sekvenser matchades i första hand mot den internationella databasen NCBI för att identifiera arternas förekomst. Principerna för extraktioner och flerartsanalyser förklaras utförligare i Bilaga 1 – 4.

2.3 ANALYSER DNA

På en kort region av 12S-genen har fiskarter unika arts specifika variationer som kan liknas vid streckkoder som identifierar olika varor i butiker, där varje enskild art alltså innehar en unik DNA-streckkod. Varje gång en sekvens detekteras i sekvenseringsmaskinen, registreras den

vilket resulterar i ett specifikt antal detektioner per art. Antal detektioner ger en indikation på arternas relativa biomassa. En art med hög förekomst ger därmed upphov till fler detektioner än en art med låg förekomst (Bilaga 2). Detta ger en indikation på arternas relativa biomassa. I studier där eDNA-provtagning genomförts några dagar efter att en bestämd biomassa av fisk har planterats ut i en tidigare tom damm påvisades en stark korrelation mellan fiskbiomassa och antalet eDNA-detektioner av respektive art (Li m.fl. 2019). Bioinformatiken beskrivs i Bilaga 2 (anger relativ biomassa från mest till minst dominerande art). Kvalitetskontroller anges i Bilaga 4.

Artresultaten från eDNA provtagningarna jämfördes med alla tillgängliga historiska nätprovfisken från Sjöprovfiskedatabasen NORS - Nationellt Register över Sjöprovfisken (NORS 2022). Fångstdata från Mälaren (658080–162871) laddades ner för Prästfjärden, Riddarfjärden, Årstaviken och Ulvsundasjön. Artförekomst jämfördes mellan alla historiska nätprovfisken och eDNA från 2022. Resultatet visualiseras med cirkeldiagram. För lokaler där det var möjligt jämfördes även arternas andel av biomassan för nätfisken (40 nät) med den relativa biomassan (andelen eDNA läsningar). Vidare jämfördes eDNA-resultatet på de fem lokaler där prov togs både 2018 och 2022 (Hellström m.fl. 2018).

3 RESULTAT

3.1 SEKVENSERINGSRESULTAT

Totalt detekterades 29 unika fisksekvenser i denna undersökning (Bilaga 6). Av dessa identifierades 26 till artnivå medan två sekvenser utgjorde artkomplex. En av sekvenserna kunde inte bestämmas på högre nivå än till familjen karpfiskar (Cyprinidae). Artkomplex i detta sammanhang innebär att två arter maskeras som en eftersom de har identiska gensekvenser inom den del av DNA-regionen som analyseras (i detta fall en liten del av 12S genen). I denna studie kunde inte artkomplexen sik (*Coregonus maraena*) /siklöja (*Coregonus albula*) och vimma (*Vimba vimba*) /björkna (*Blicca bjoerkna*) särskiljas genom markörerna. Observera att en unik sekvens för vimma även detekterades i undersökningen.

Den genomsnittliga artdiversiteten var 13,65 och varierade från nio arter i prov SMA_14 (Riddarfjärden 1) till 17 arter i SMA_04 (Södertälje småbåtshamn) och SMA_10 (Fiskarfjärden 4). Det totala antalet detekterade arts specifika sekvenser för fiskmarkören i undersökningen var 826 176 och varierade mellan 19 845 – 91 575 per prov, vilket är höga värden och en indikation på högkvalitativ analys samt provtagning (Bilaga 5).

3.2 FISKARTERNAS FÖREKOMST PÅ LOKALERNA

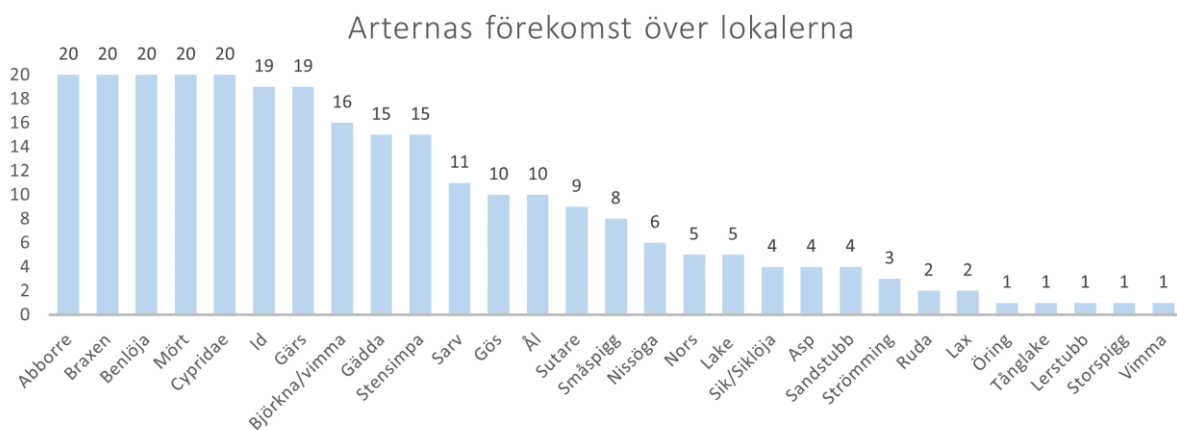
Fyra rödlistade arter (SLU Artdatabanken, 2020) registrerades – ål (*Anguilla anguilla*, CR), asp (*Leuciscus aspius*, NT), lake (*Lota lota*, VU) och vimma (NT). Vidare detekterades även tre arter inkluderade inom åtgärdsprogram för hotade arter (ÅGP) – vimma, asp och id (*Leuciscus idus*) (Tabell 2). Svartmunnad smörbult detekterades inte i något av proverna.

Tabell 2. Rödlistade arter samt arter som omfattas av åtgärdsprogram för hotade arter (ÅGP).

Art	Upptagen inom ÅGP	Rödlistning
Ål	Nej	Akut hotad (CR)
Asp	Ja	Nära hotad (NT)
Lake	Nej	Sårbar (VU)
Vimma	Ja	Nära hotad (NT)
Id	Ja	-

Mest frekvent detekterade arter var abborre (*Perca fluviatilis*), mört (*Rutilus rutilus*), braxen (*Abramis brama*) och benlöja (*Alburnus alburnus*) och en karpfisk som inte identifierades till art i samtliga 20 prover (Figur 4). Arternas relativa abundans inom varje lokal visas i Figur 5.

Sett till sekvensantal var abborre den vanligast förekommande arten som stod för 46 % av det totala sekvensantalet och utgjorde mellan 25–69 % av andelen detektioner i varje prov. Detta stämmer väl överens med nätfisken på utvalda lokaler där abborren dominerade.



Figur 4. Arternas förekomst över 20 undersökta lokaler. Y-axeln anger antal lokaler.



Figur 5. Fiskarternas dominans sett som relativ biomassa inom de olika provtagningslokalerna. Den relativa biomassan anger hur många gånger en sekvens av en art blivit läst (kolumner). Varje kolumn visar hur många procent en art är läst av totalt 100 %.

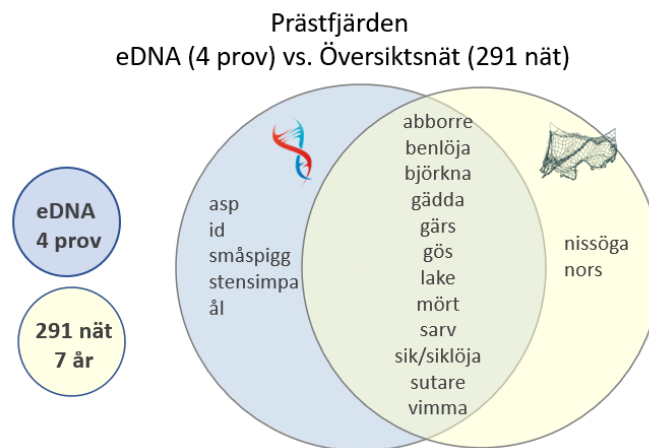
3.3 JÄMFÖRELSE EDNA-UNDERSÖKNING 2022 OCH HISTORISKA PROVFIKEN

Lokaler från eDNA-undersökningen sammanföll i fyra fall med historiska nätprovfiskedata baserat på översiktsnät i Mälaren som är tillgängligt i Sjöprovfiskedatabasen NORS - Nationellt Register över Sjöprovfisken (NORS 2022). Historiska provfisken utförda under juli/augusti från

Mälaren från Prästfjärden, Riddarfjärden, Årstaviken och Ulvsundasjön inkluderades i analysen. Provfiskedata från Görväln (SMA_08) fanns tillgängligt, men enbart från 1996 och lokalen exkluderades därför från analysen.

3.3.1 Prästfjärden

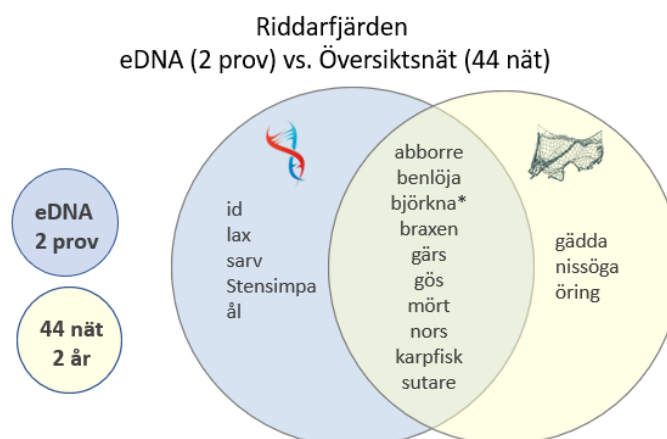
För Prästfjärden fanns tillgängliga artlistor över historiska provfiske utförda 2009–2011, 2013, 2016, 2019 och 2022. Totalt under denna period fanns fångstdata från 291 nät som jämfördes med fyra strandnära eDNA-prover (SMA_07, SMA_09, SMA_19 och SMA_20) från augusti 2022 (Figur 6).



Figur 6. Cirkeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst mellan historiska nätprovfisken som representerar sju år och 291 nät (gul cirkel) och fyra strandnära eDNA-prover tagna i augusti 2022 (blå cirkel). Det överlappande området visar arter som detekterats med båda metoderna. Arter i gula fältet registrerades enbart med nätfiske och i blå fältet enbart med eDNA.

3.3.2 Riddarfjärden

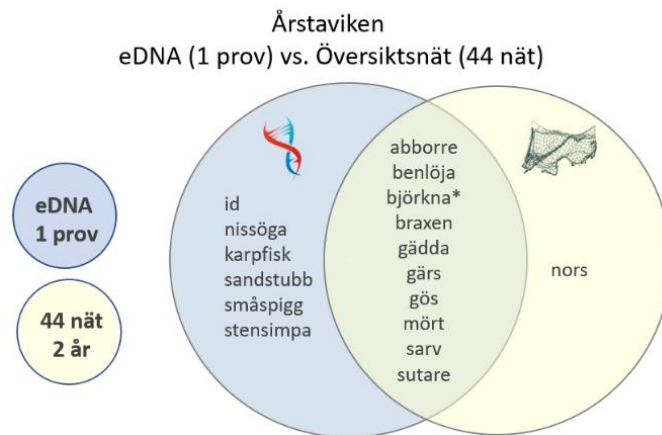
För Riddarfjärden jämfördes fångsten från 44 nät som lades 1996 och 2017 med två strandnära eDNA-prov (SMA_01, SMA_14) tagna i augusti 2022 (Figur 7).



Figur 7. Cirkeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst mellan historiska nätprovfisken som representerar två år och 48 nät (gul cirkel) och två strandnära eDNA-prov tagna i augusti 2022 (blå cirkel). Det överlappande området visar arter som detekterats med båda metoderna. Arter i gula fältet registrerades enbart med nätfiske och i blå fältet enbart med eDNA.

3.3.3 Årstaviken

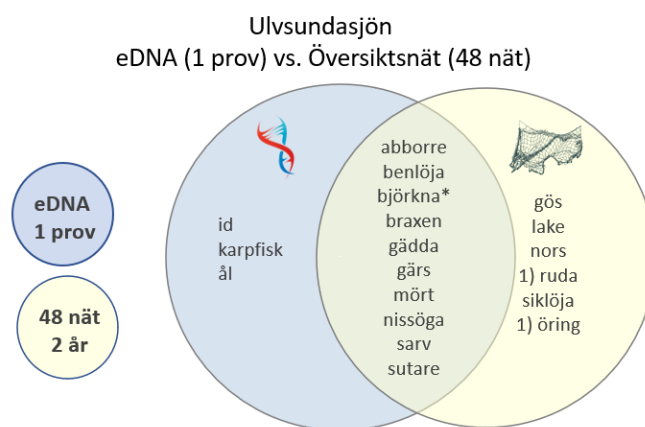
För Årstaviken jämfördes fångstdata från 44 nät från 2012 och 2016 med ett eDNA-prov (SMA_15) taget i augusti 2022 (Figur 8).



Figur 8. Cirkeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst mellan historiska nätprovfiske som representerar två år och 44 nät (gul cirkel) och ett strandnära eDNA-prov taget i augusti 2022 (blå cirkel). Det överlappande området visar arter som detekterats med båda metoderna. Arter i gula fältet registrerades enbart med nätfiske och i blå fältet enbart med eDNA.

3.3.4 Ulvsundasjön

För Ulvsundasjön jämfördes fångstdata från 48 nät från 2015 och 2021 med ett eDNA-prov (SMA_11) taget i augusti 2022 (Figur 9).



Figur 9. Cirkeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst mellan historiska nätprovfiske som representerar två år och 48 nät (gul cirkel) och två strandnära eDNA prov tagna i augusti 2022 (blå cirkel). Det överlappande området visar arter som detekterats med båda metoderna. Arter i gula fältet registrerades enbart med nätfiske och i blå fältet enbart med eDNA. Notera att 1) annoterar enbart ett exemplar av arten i nätprovfiske.

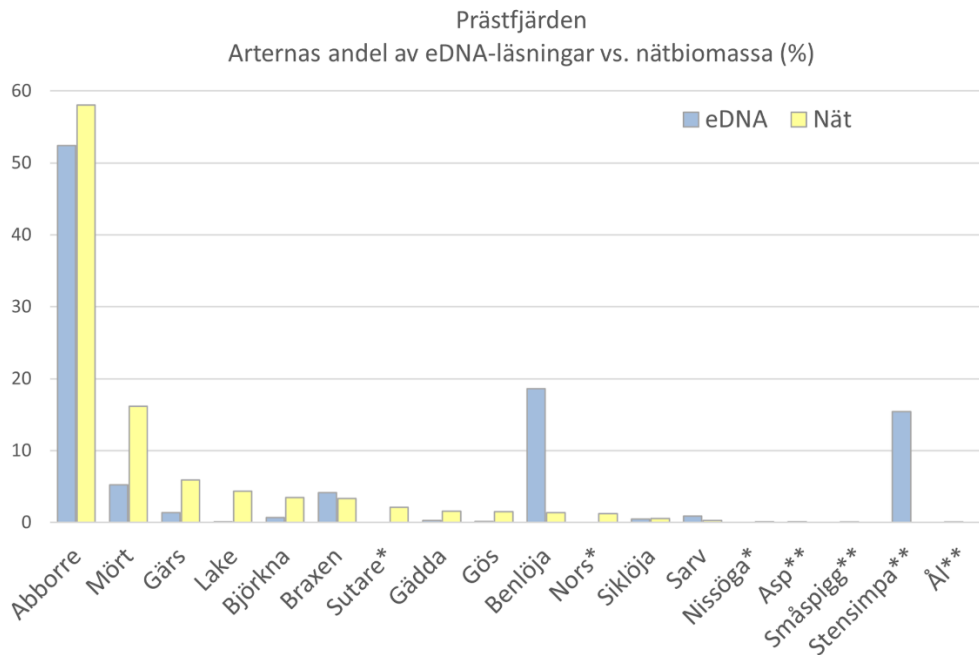
Notera att arter som asp, id och ål inte detekterades i provfiske. Dessa utgjorde få sekvenser men förekom på flera lokaler i eDNA-undersökningen. Abborre var klart dominerande i provfiske från 2022 och var även dominerande i eDNA-analyserna.

3.3.5 Relativ biomassa

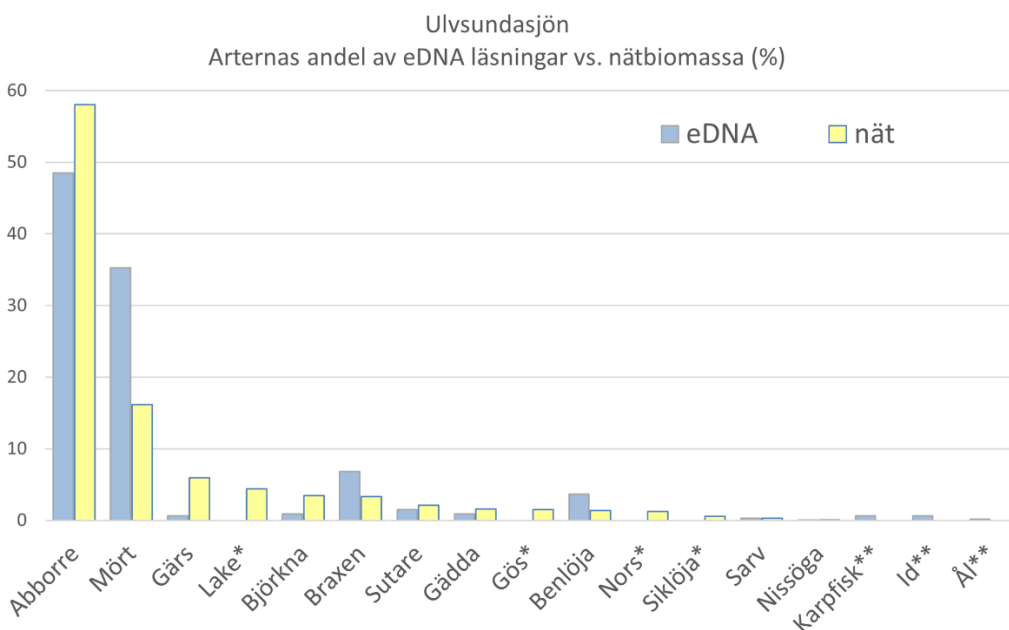
Fördelningen av antalet läsningar per eDNA-prov kallas ibland relativ biomassa. För att få en uppskattning av dominerande arter jämfördes arternas andel av biomassan (vikt i procent av totala fångstvikten) med relativ biomassa (antalet läsningar per prov). Dessa analyser var

möjliga att utföra baserat på eDNA- och nätfiskeresultat från Prästfjärden (2022) och Ulvsundasjön (2021).

I Prästfjärden jämfördes andelen (%) av totala biomassan för varje art, baserat på fångsten i 40 nät, med andel av sammanslagna eDNA-läsningar i fyra prover (Figur 10). Notera att nätfisket utfördes i juli 2022 och eDNA-proverna samlades in i augusti 2022. En liknande jämförelse genomfördes i Ulvsundasjön där andelen biomassa (%) från 24 nät som fiskades i augusti 2021 jämfördes med arternas relativa biomassa i ett eDNA-prov (Figur 11).



Figur 10. Stapeldiagram som visar andelen eDNA-läsningar varje art uppvisar inom lokalen (procent totala läsningar, den relativa biomassan) och arternas andel av biomassan i gram (procent av totalvikt) baserat på uppgifter från nätfisken. ** indikerar att arten enbart detekterades genom eDNA och * att arten enbart detekterades genom nätprovfiske.



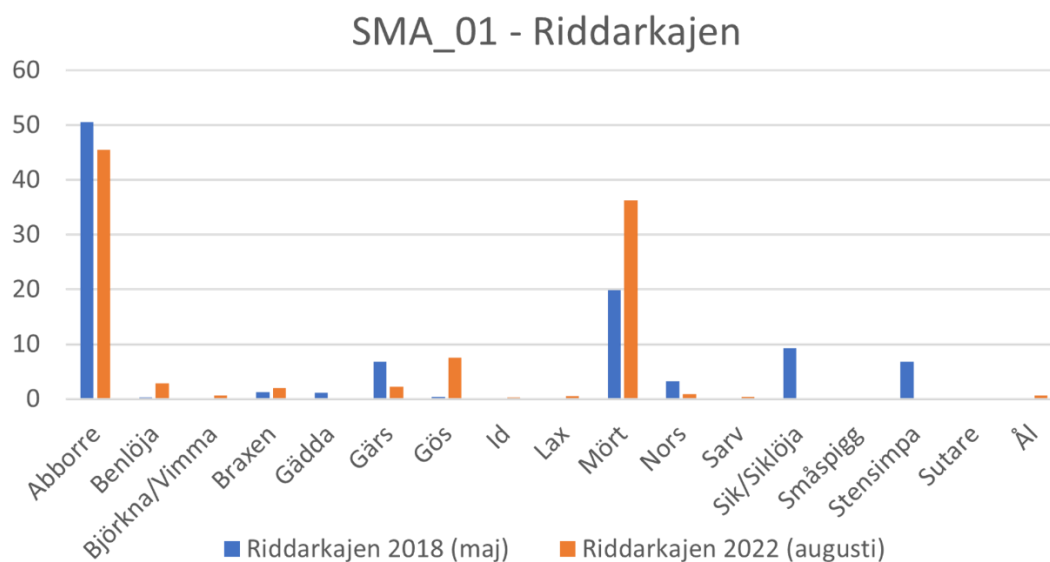
Figur 11. Stapeldiagram som visar andelen eDNA-läsningar varje art uppvisar inom lokalen (procent totala läsningar, den relativa biomassan) och arternas andel av biomassan i gram (procent av totalvikt) baserat på uppgifter från nätfisken. ** indikerar att arten enbart detekterades genom eDNA och * att arten enbart detekterades genom nätprovfiske.

3.4 JÄMFÖRELSE EDNA-UNDERSÖKNINGAR PÅ FEM LOKALER MELLAN 2018 OCH 2022

Fem av lokalerna från eDNA-undersökningen 2018 återbesöktes igen i augusti 2022. I detta avsnitt jämförs den relativa biomassan av arterna mellan provtagningen 2018 och 2022. Observera att eventuella skillnader i relativ biomassa inte kan tolkas som populationstrender i detta fall, utan snarare en indikation på säsongsvariationer i artsammansättning då investeringstillfällena skiljer sig åt (maj respektive augusti). Procentuell fördelning av arter för båda provtagningstillfällena finns i Bilaga 7.

3.4.1 Riddarkajen

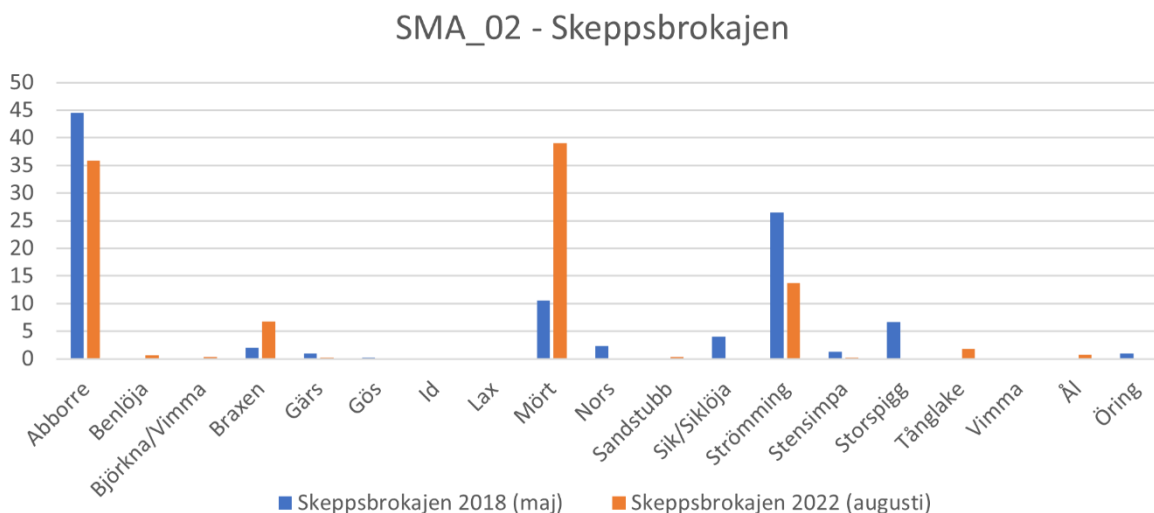
Resultatet från Riddarkajen visar på att de dominerande arterna var mört och abborre vid båda inventeringstillfällena. Noterbart är att lax (*Salmo salar*) endast detekterades i augusti medan gädda (*Esox lucius*) endast detekterades i maj. Vidare var den relativa biomassan av gös (*Zander lucioperca*) och mört högre i augusti (Figur 12).



Figur 12. Jämförelse av relativ biomassa mellan 2018 och 2022. Y-axeln anger procentuell andel utav det totala sekvensantalet.

3.4.2 Skeppsbrokajen

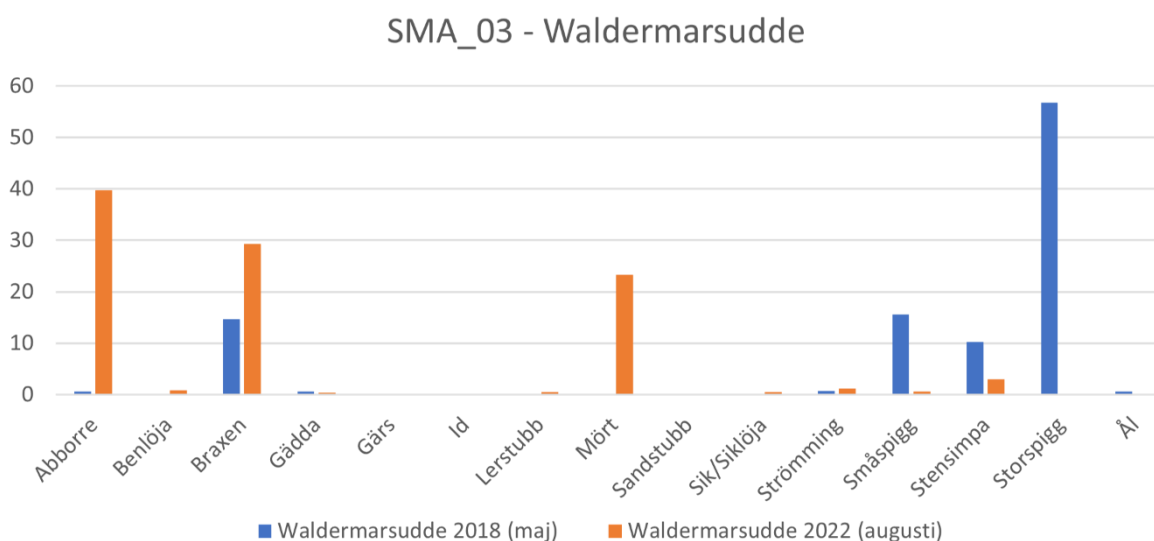
Dominerande arter vid båda inventeringstillfällena var abborre, strömming (*Clupea harengus*) och mört. Strömming utgjorde en betydligt större andel i maj vilket kan förklaras av att provtagningen då sammanföll med leken. Noterbart är även att storspigg (*Gasterosteus acuelatus*) endast detekterades i maj, i relativt höga värden (Figur 13).



Figur 13. Jämförelse av relativ biomassa mellan 2018 och 2022. Y-axeln anger procentuell andel utav det totala sekvensantalet.

3.4.3 Waldermarsudde

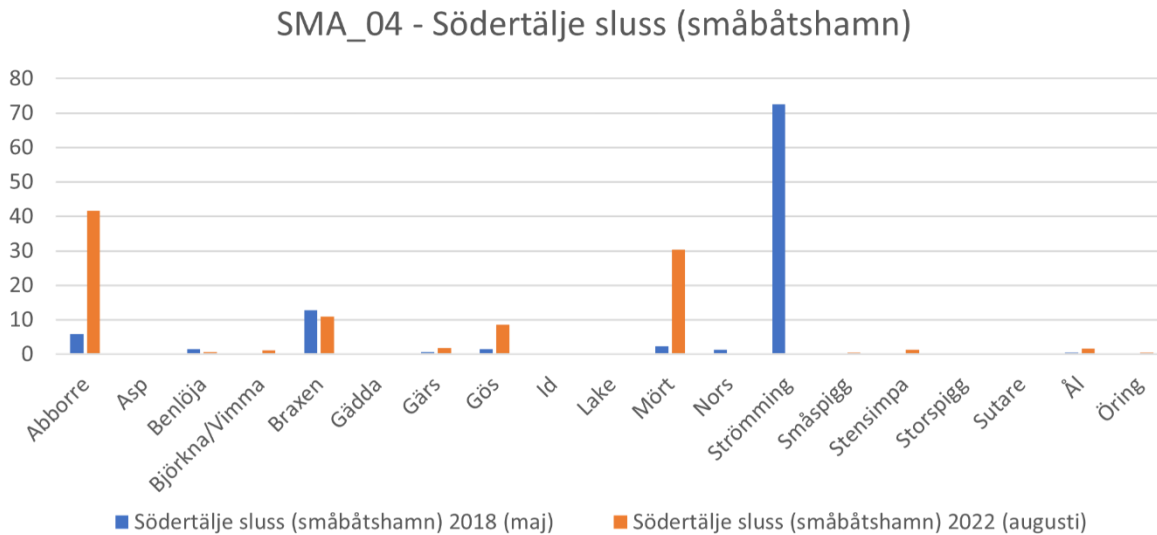
Vid Waldermarsudde kunde stora säsongsvariationer observeras mellan inventeringstillfällena. I maj var de dominerande arterna småspigg (*Pungitius pungitius*), stensimpa (*Cottus gobio*) och storspigg. I augusti dominerade däremot abborre, braxen och mört (Figur 14).



Figur 14. Jämförelse av relativ biomassa mellan 2018 och 2022. Y-axeln anger procentuell andel utav det totala sekvensantalet.

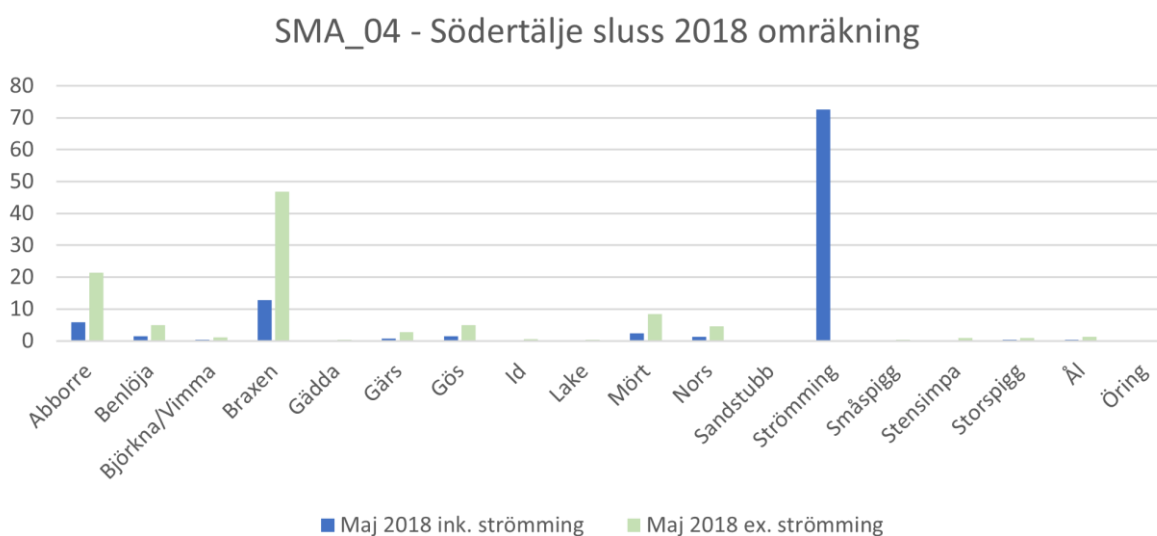
3.4.4 Södertälje sluss (småbåtshamn)

I maj 2018 förekom mycket stora mängder strömning i Södertälje småbåtshamn medan abborre och mört dominerade provtagningen i augusti. Då provtagningen i maj sammanföll med reproduktion för strömning blir den relativa biomassa för arten oproportionerligt stor eftersom även gameter (könsceller) detekteras (Figur 15).



Figur 15. Jämförelse av relativ biomassa mellan 2018 och 2022. Y-axeln anger procentuell andel utav det totala sekvensantalet.

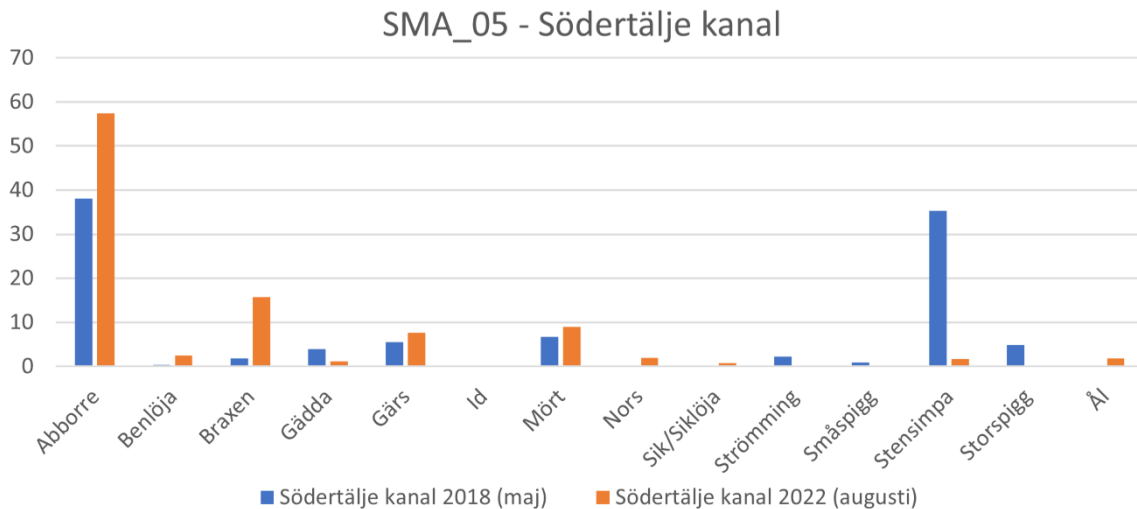
För att få en bättre bild av övriga arters relativa biomassa exkluderades därför strömning från analysen och artfördelningen av övriga arter räknades om. Denna metod har visat sig vara mycket användbar vilket baserar sig på månatlig provtagning i Moälven 2020 till 2021 där tydliga mönster för reproduktion kunde verifieras och omräkningstabeller användes. När detta gjordes kan man se indikation på reproduktion hos andra vårlekande arter som abborre och braxen (Figur 16).



Figur 16. Jämförelse av relativ biomassa 2018 innan (blå staplar) och efter (gröna staplar) exkludering av strömning. Y-axeln anger procentuell andel utav det totala sekvensantalet.

3.4.5 Södertälje kanal

Abborre, mört och gärs (*Gymnocephalus cernua*) var de dominerande arterna vid båda inventeringstillfällena. Stensimpa utgjorde dock en betydande del av den relativa biomassan i maj medan braxen hade motsvarande mönster i augusti. Storspigg detekterades endast i maj (Figur 17).



Figur 17. Jämförelse av relativ biomassa mellan 2018 och 2022. Y-axeln anger procentuell andel utav det totala sekvensantalet

4. DISKUSSION

Resultaten i denna rapport indikerar att svartmunnad smörbult vid tillfället för provtagning inte lyckats etablera sig i Mälaren. Undersökningen bekräftar vidare att Mälaren är en artrik sjö och att det finns tydliga distinktioner mellan arternas utbredning, något som traditionella inventeringsmetoder fastslagit sedan länge. Däremot visar resultatet att eDNA som metod har fördelar vid inventering av diversitet då metoden i regel detekterar fler arter än traditionella metoder som nätprovfiske, och i synnerhet sällsynta samt svårfångade arter. Vid nätprovfiske erhålls dock viktiga data om individers kön, storlek och hälsa.

Vad gäller biomassa visar jämförelsen i denna rapport på en relativt god samstämmighet mellan metoderna, något som tidigare studier även visat på (Li m. fl. 2019). Det är vidare känt att vissa arter blir över- respektive underrepresenterade vid nätprovfiske. Detta faktum är något som eDNA-data skulle kunna kompensera för. Resultatet i denna rapport ska emellertid tolkas med stor försiktighet vad gäller direkta jämförelser metoderna emellan avseende biomassa då tidpunkterna för inventeringarna skiljer sig åt.

Jämförelsen av eDNA-resultatet från de fem lokaler där prov togs både 2018 och 2022 visade på tydliga säsongsvariationer i fisksamhällets artsammansättning. Den relativa biomassan skiljde sig åt mellan säsongerna och mest noterbart var att strömring på två av lokalerna utgjorde en betydligt större andel i maj då provtagningen sammanföll med artens reproduktion. Då det är verifierat att förökning pågår kan den relativa biomassan (antal läsningar) bli oproportionerligt stor eftersom metoden även detekterar DNA från gameter (könsceller). eDNA kan alltså även användas som ett verktyg för att detektera lekperioder.

Ett flertal arter detekterades enbart under ett av provtagningstillfällena vilket belyser betydelsen av att inkludera flera säsonger vid inventering för att erhålla en så komplett bild av mångfalden som möjligt. Vidare visar dessa variationer på vikten av att provtagning sker under samma tidsperiod för att generera jämförbara data vilket är en förutsättning för att metoden ska implementeras inom miljöövervakningen.

Analyser samt artbestämning är beroende av referensdatabaser och trots att de flesta arterna i Sverige är sekvenserade finns det ännu luckor. En nationell satsning på sekvensering av mitokondriska genomet i samarbete med naturhistoriska museer, taxonomer och genetiker skulle kunna vara en lösning på detta problem. eDNA som metod har utvecklats mycket under de senaste 13 åren och olika faser av metodens användning standardiseras i nuläget inom CEN och SIS. Forskning pågår för att särskilja populationer inom arter och användningen av dessa analyser i framtiden stärker eDNA som inventeringsverktyg och komplement till andra inventeringsmetoder.

Sammanfattningsvis visar resultatet att eDNA kan utgöra ett bättre alternativ än traditionella metoder vid undersökning av biologisk mångfald och kartläggning av invasiva eller sällsynta arter. I regel bör metoderna dock inte betraktas som alternativ i motsats till varandra då de erbjuder olika och ofta kompletterande information. Provtagning av eDNA detekterar som visat fler arter än traditionella metoder som nätprovfiske men data som individers kön, hälsa och storlek erhålls inte. Vidare är eDNA kostnadseffektivt och kan ske i svårtillgängliga områden vilket möjliggör undersökningar på en större geografisk skala än vad som tidigare varit möjligt. På detta sätt kan metoden generera stora dataset som kan bidra till eventuella åtgärdsbeslut eller inducera uppföljande, mer detaljerade inventeringar. Kombinerade inventeringsmetoder med eDNA och traditionella metoder blir därför ett kraftfullt verktyg för att erhålla goda underlag för åtgärder samt beslut inom förvaltning och miljöövervakning.

5. REFERENSER

- Artdatabanken 2022. Hur blir en art rödlistad, <https://www.artdatabanken.se/det-har-gor-vi/rodlistning/hur-blir-en-art-rodlistad/> Uppdaterad 29 mars 2022.
- Bruce, K. Bourlat, S. Blackmann, R., **Hellström, M.**, m.fl. & Deiner, K. 2021. A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment". PenSoft Publishers Bulgaria 2021. ISBN 978-619-248-052-3 (paperback), ISBN 978-619-248-053-0 (e-book) DOI: 10.3897/ab.e68634
- Brys, R., Haegeman, A., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Staelens, A., Auwerx, J., & Ruttink, T. (2021). Monitoring of spatiotemporal occupancy patterns of fish and amphibian species in a lentic aquatic system using environmental DNA. *Molecular ecology*, 30(13), 3097-3110.
- De Cahsan, B., Nagel, R., Schedina, I. M., King, J. J., Bianco, P. G., Tiedemann, R., & Ketmaier, V. (2020). Phylogeography of the European brook lamprey (*Lampetra planeri*) and the European river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) species pair based on mitochondrial data. *Journal of fish biology*, 96(4), 905-912.
- Deiner, K., H. M. Bik, E. Mächler, M. Seymour, A. Lacoursière-Roussel, F. Altermatt, S. Creer, I. Bista, D. M. Lodge, N. de Vere, M. E. Pfrender, och L. Bernatchez. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26:5872-5895.
- Florin, A-B., Jonsson, A-L., Gisselman, F. (2021). Svartmunnad smörbult – en invasive främmande art i våra svenska vatten. Havs- och vattenmyndigheten. Rapport 2021:17.
- Harper, L. R., Buxton, A. S., Rees, H. C., Bruce, K., Brys, R., Halfmaerten, D., ... & Priestley, V. 2018. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia*, 1-17.
- Harper, L. R., Lawson Handley, L., Hahn, C., Boonham, N., Rees, H. C., Gough, K. C., ... & Hänfling, B. (2018). Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Ecology and evolution*, 8(12), 6330-6341.
- **Hellström, M.**, Näslund, J. & Spens, J. 2018. eDNA-inventering av svartmunnad smörbult i utvalda högriskområden vid Svenska Östersjökusten. *AquaBiota Rapport 2018:10*. 29 sid. ISBN: 978-91-85975-79-2
- Kačergytė, I., Petersson, E., Arlt, D., **Hellström, M.**, Knape, J., Spens, J., Žmihorski, M. & Pärt, T. (2021). Environmental DNA metabarcoding elucidates patterns of fish colonisation and co-occurrences with amphibians in temperate wetlands created for biodiversity. *Freshwater Biol.* 66, 1915–1929.
- Lawson-Handley, L., 2015. How will the “molecular revolution” contribute to biological recording? *Biological Journal of the Linnean Society* 115: 750–766.
- Leese, F., Altermatt, F., **Hellström M.** + 103 authors & Stenke, D (2016). DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Research Ideas and Outcomes (Rio)*, 2, e11321.
- Li, J., Lawson Handley, L. J., Harper, L. R., Brys, R., Watson, H. V., Di Muri, C., & Hänfling, B. (2019). Limited dispersion and quick degradation of environmental DNA in fish ponds inferred by metabarcoding. *Environmental DNA* 1 (3): 238–250.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ... & Kondoh, M. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088.
- NORS 2022. Databasen för provfisken i sjöar. <https://www.slu.se/miljoanalys/statistik-och-miljodata/sok-data/nors/>
- Olds, B. P., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Li, Y., Evans, N. T., Turner, C. R., ... Shirey, P. D. (2016). Estimating species richness using environmental DNA. *Ecology and Evolution*, 6, 4214–4226.
- Pedersen, M. W., S. Overballe-Petersen, L. Ermini, C. D. Sarkissian, J. Haile, **M. Hellstrom**, J. Spens, m.fl. 2015. Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 370:20130383
- Spens, J., A. R. Evans, ... **M. Hellström**. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793
- TT. 2022. Aggressiv smörbult på väg mot Mälaren. *Aftonbladet* 9 maj 2022. <https://www.aftonbladet.se/nyheter/a/5GdQj6/aggressiv-smorbult-pa-vag-mot-malaren>
- Vattenmyndigheten Norra Östersjön 2021. Åtgärdsprogram för vatten i Norra Östersjöns vattendistrikt 2022–2027 Vattenmyndigheterna i Sveriges fem vattendistrikt Diarienummer: 537-6274-2021

BILAGA 1. VAD MENAS MED ENARTS- OCH FLERARTSANALYSER?

Enartsstudier - qPCR eller ddPCR

Inventering av förekomst av en enstaka art med eDNA görs med så kallad qPCR eller ddPCR. Frågeställningen för dessa studier är: Finns art X här? Varje art analyseras med en markör som är specifik för precis den arten. Provsvaren anger närvaro/frånvaro av den specifika arten.

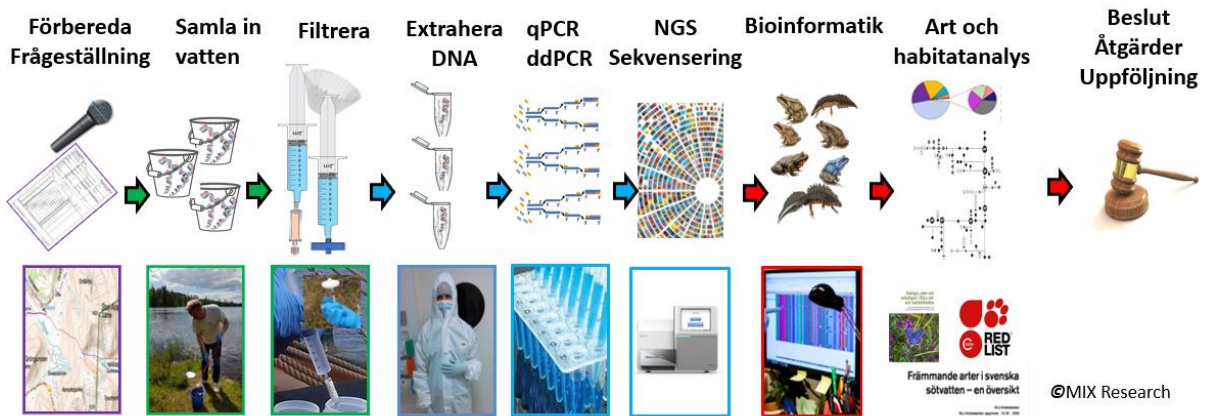
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundansen mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Analystiden för enartsanalyser är kortare än analystiden för flerartsanalyser.

Flerartsstudier - Metastreckkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

Frågeställningen för flerartsstudier är: Vilka arter finns här och hur hög är deras förekomst? Med andra ord behöver man inte på förhand veta vad man letar efter.

Invasiva och skygga arter kan identifieras och antalet arter som detekteras i en analys är obegränsat. Om man inventerar tre eller fler arter är denna metod att föredra och blir snabbt mer kostnadseffektiv än enartsanalyser. Analystiden för flerartsanalyser är längre än analystiden för enartsanalyser men mängden av data och information är så pass stor att inventeringarna kan producera "stort data" som inte har varit möjligt före eDNA- metastreckkodning (Figur B1-1)

Jämförelser mellan data som erhålls genom enarts- och flerartsanalyser visas i figur B1-2.



Figur B1-1. Flödesdiagram som visar de olika stegen för flerartsanalyser från fältplanering till beslut och åtgärder (laboratoriearbete och bioinformatik beskrivs i Bilaga 2).

Enartsanalys - Barkodning	CGCCGCGTTATACGAGA	Ja/Nej	Artlista	Dominans
	CGCCGCGTTATACGAGA	OTU 1	Match →	10 %
Flerartsanalys - Metabarkodning	CACCGCGTTATACGAGA	OTU 2	Match →	65 %
	CGCCGCGTTACACCACT	OTU 3	Match →	5 %
	CGCCGCGGCTACACCGTG	OTU 4	Match →	20 %

Figur B1-2. Typ av data som erhålls genom enartsanalyser och flerartsanalyser. Enartsanalyserna anger om en art är närvarande eller inte, medan flerartsanalyser resulterar i en artlista samt arternas dominans i förhållande till varandra inom ett prov.

BILAGA 2. LABORATORIEARBETE

Extraktion

eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA.

Flerartsanalyser

Flerartsanalyser för fisk analyserades med en markör i 12 S regionen som detekterar fisk (Miya m. fl. 2015). Varje PCR-prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs igen till ett prov under sekvenseringen. Som positiv laboratoriekontroll används ett prov med känd artsammansättning av tropiska arter som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyseras för att säkerhetsställa kvaliteten och tillförlitlighet av resultat.

Bioinformatik och verifiering

Varje enskild art har en unik streckkod eller DNA-sekvens. De unika sekvenserna jämfördes med en internationell databas (tillgänglig för allmänheten, som grundar sig på GenBank och upprätthålls av *National Center for Biotechnology Information*, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) där sekvenser på närmare 504 000 kända arter finns tillgängliga med 2,5 miljard sekvenser och 15,3 triljoner baspar enligt GenBank och NCBI hemsida (Sayers, m.fl. 2021). De olika sekvenserna matchades i första hand mot NCBI databasen och fick på så sätt fram arternas identitet. Vidare används en verifierad (vilket betyder att arterna som används för referens-DNA är verifierade av en auktoriserad taxonom) intern databas. Tack vare nya framsteg inom metastreckkodning för vertebrater och evertebrater är det möjligt att få träffar på artnivå istället för enbart familje- eller genusnivå.

Antalet läsningar per art ger en relativ uppskattning (relativ biomassa) av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov.

Referenser

- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ... & Kondoh, M. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088.
- NCBI websida <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Schoch, C. L., Sherry, S. T., & Karsch-Mizrachi, I. (2021). GenBank. *Nucleic acids research*, 49(D1), D92-D96.
- Spens, J., A. R. Evans, ... M. Hellström. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645.

BILAGA 3. KVALITETSSÄKRING AV DNA - KONTROLLER

Positiva och negativa kontrollprov

För tillförlitliga resultat vid eDNA-provtagning är positiva och negativa kontroller nödvändiga för att utesluta kontamineringar eller andra felkällor. Detta gäller alla DNA-undersökningar och innefattar alla utövare. Om en utförare avviker från denna praxis är resultaten inte tillförlitliga och därmed oanvändbara.

Utöver generella huvudprinciper för DNA-undersökningar (Goldberg, m.fl. 2016, Griffiths, m.fl. 2016) finns speciella regelverk för kriminaltekniska (Hedman, m.fl. 2017) och medicinska (SFMG, 2011) undersökningar. Strikta riktlinjer för ett standardiserat utövande av eDNA-undersökningar tas just nu fram inom EU under COST aktionen DNAquaNet.

Negativ kontroll: Ett prov med kommersiellt DNA fritt vatten (nukleas fritt vatten renat för molekylära undersökningar ex. Nuclease Free Water från Fishing Scientific) eller kolsyrat mineralvatten som ingår i fältmaterialet vid inventerade lokaler med samma provtagningsmetodik som vattenproverna. Detta prov kallas för negativ kontroll. Under hela undersökningen från fält till slutsekvensering bör negativa kontroller införas i varje steg av analyserna. De DNA-fria proverna analyseras så att kontaminering kan uteslutas och falska positiva provsvar inte uppkommer. Om DNA-signaler av mållartsgrupperna hittas i en negativ kontroll innebär det att undersökningen måste göras om ifall källan inte kan identifieras och konsekvenserna av kontamineringen fastställas.

Konsekvenserna av en kontaminerad negativ kontroll kan i praktiken innebära att arter som inte finns i en miljö detekteras (falsk positiv).

Positiv kontroll: En positiv kontroll innebär att ett prov som innehåller ett känt DNA testas för att verifiera att den använda metodiken fungerar som den skall. Om DNA-signaler inte hittas i en positiv kontroll innebär det att metodiken måste justeras och analysen eller undersökningen måste göras om.

En positiv kontroll utan DNA-signal kan i praktiken visa att arter som finns i en miljö inte detekteras (falsk negativ).

Referenser

- Goldberg, Caren S., m.fl. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7.11: 1299-1307.
- Griffiths Anthony et al. 2016. *An Introduction to Genetic Analysis*. 11th edition. WH Freeman. New York. ISBN-13: 978-1464109485.
- Hedman, Johannes m.fl.. 2017. Pre-PCR processing-projektet, P4 Stärkt beredskapskapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad provberedning. -Nationellt Forensiskt Centrum, NFC 2017-05-07. NFC Rapport Avdelningskansliet 2017:04.
- SFMG, Svensk Förening för Medicinsk Genetik. 2011. Riktlinjer för kvalitetssäkring i klinisk genetisk verksamhet. http://sfgm.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfgm_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf

BILAGA 4: KVALITETSKONTROLLER SOM REDOVISAS

1. Mängden insamlat/filtrerat vatten dokumenteras för att kunna avgöra hur mycket prov som samlats in totalt. Alla eDNA-mätningar ställs i relation till hur mycket vatten som filtrerats.
2. Total eDNA-koncentration för samtliga prov (inkl. negativa) anges. Koncentrationen varierar avsevärt naturligt men ger ändå en första indikation om hur eDNA-extraktionen lyckats.
3. Inhibitionskontroll dokumenteras och redovisas. Inhibition betyder risk för att arter som finns i proverna inte detekteras därför att DNA inhiberas av humus etc. Detta går att åtgärda så länge inhibitionstest utförs. Resultatet av antiinhibering före och efter utförandet redovisas så att resultatens tillförlitlighet kan bedömas.
4. Band på gel efter målinriktad PCR dokumenteras (närvaro/frånvaro) inklusive negativa kontroller. Detta visar att PCR har fungerat och kontroll av vilka prover som har spår av målarter, eller riskerar att vara kontaminerade, kan utföras.
5. Negativa kontroller indelade i a) fält-negativa (filter-negativa) b) extraktions-negativa samt c) PCR-negativa utförs och utfallet redovisas. Detta möjliggör en kontroll av vilka prover som riskerar att vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.
6. Positiva kontroller (används inte alltid): a) Fält-positiva där ett område känt för artförekomst provtas för kontroll att arten detekteras i fält. b) PCR-positiva för enartsanalyser (gäller qPCR och ddPCR) där DNA från målartern testas. c) Positiv flerartskontroll, där prov från ett artificiellt sammansatt samhälle ("mock community") används som positiv kontroll vid PCR och sekvensering. Falska positiva prover redovisas. De positiva proverna försäkrar att PCR och bioinformatiken fungerar som avsett.
7. För enartsanalyser anges närvaro och frånvaro av arten, för flerartsanalyser anges andel (%) av målarterna i ett givet prov. Detta ger en bild av hur väl sekvenseringen av målarterna lyckats.
8. Andel sekvenser (%) av människa, ko och gris (vildsvin) och bakterier som förekommer som bakgrundssekvenser redovisas. Detta möjliggör en kontroll av att tillräckligt många läsningar täcker målarterna.
9. Minst 12st. PCR-replikater per art/artgrupp och eDNA-prov utförs. Dessa sammanslås i sekvenseringen. Färre replikater minskar analys säkerheten avsevärt.
10. Antal prover för en specifik MiSeq-körning (sekvensering) överstiger inte 100 stycken exklusive sekvenseringskontroller. Detta säkerställer att antalet läsningar per prov inte ska bli alltför lågt för att kunna detektera ovanligare arter.

BILAGA 5: RESULTAT AV KVALITETSKONTROLLER FÖR FLERARTSANALYSER

Värden för kontrollerna anges i tabell B5-1. Alla negativa kontroller var negativa för målarter. DNA-koncentrationer var normala. Miya 12S markören för fisk resulterade i 820 091 målartsläsningar.

Tabell B5-1. Kvalitetsgranskning av eDNA och kontroller. eDNA-koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR. PCR-negativ innefattar 12 replikat. eDNA koncentration ng/μL. Kont% anger % av sekvenser från t.ex. ko/hund/människa som togs bort som naturlig kontaminering.

Prov	DNA koncentration (ng/μL)	Markör	Positiva PCRs	Index koncentration (ng/μL)	Rå-sekvenser #	Rapporterade sekvenser #	Diversitet målarter	Icke-målarter %	Kontaminering %
SMA_01	21,50	12S	12	8,547	106613	47601	14	0	0,00
SMA_02	101,00	12S	12	9,235	92720	40147	15	0	0,00
SMA_03	240,00	12S	12	9,025	55409	23746	14	1,6	0,03
SMA_04	119,00	12S	12	8,585	86443	39415	17	0,04	0,02
SMA_05	49,80	12S	11	9,096	93396	42908	12	0,04	0,00
SMA_06	158,00	12S	12	6,692	91177	36968	14	0	0,00
SMA_07	52,70	12S	12	10,07	49219	25657	12	0	0,00
SMA_08	38,80	12S	12	8,69	86014	41833	14	0,1	0,14
SMA_09	70,40	12S	12	9,032	95460	39747	11	0	28,56
SMA_10	82,80	12S	11	7,158	52590	23624	17	0	0,00
SMA_11	65,50	12S	10	9,033	93688	42956	13	0	0,00
SMA_12	56,80	12S	12	9,298	67105	32272	15	0	0,00
SMA_13	113,00	12S	12	8,304	77445	35168	14	0	0,00
SMA_14	72,30	12S	12	9,136	43819	19955	9	0	0,00
SMA_15	87,20	12S	12	9,536	73291	30962	16	2,37	0,03
SMA_16	75,90	12S	12	9,555	73761	32669	14	0,02	0,03
SMA_17	125,00	12S	12	7,599	68932	28389	12	0	0,00
SMA_18	13,20	12S	12	8,982	63161	60123	14	0	0,73
SMA_19	27,30	12S	12	7,792	93579	90484	11	0	0,13
SMA_20	47,70	12S	12	8,52	94354	92654	15	0	0,00
SMA_NEG	0,05	12S	2	3,47	24567	17657	0	100	100,00
Lab_NEG	<0,05	12S	0	-	-	-	-	-	-

BILAGA 6: RÅDATA FÖR DETEKTERADE ARTER, ANTAL VERIFIERADE LÄSNINGAR

Tabell B6_1. Antalet eDNA-läsningar per detekterad art inom de olika provlokalerna. Siffrorna anger hur många gånger en sekvens blivit läst på artnivå och anger relativ biomassa. Flera läsningar anger högre biomassa.

Arter (latin)	Arter	Similarity	SMA_01	SMA_02	SMA_03	SMA_04	SMA_05	SMA_06	SMA_07	SMA_08	SMA_09	SMA_10	SMA_11	SMA_12	SMA_13	SMA_14	SMA_15	SMA_16	SMA_17	SMA_18	SMA_19	SMA_20	SMA_NEG	
<i>Anguilla anguilla</i>	Äl	100,00	294	274	-	679,00	776,00	-	-	144,00	-	83,00	69,00	50,00	74,00	-	-	-	-	200,00	-	-		
<i>Clupea harengus</i>	Strömming	100,00	-	5 449	284,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 037,00	-	-	-	-		
<i>Cobitis taenia</i>	Nissöga	100,00	-	-	-	-	-	26,00	-	-	-	13,00	28,00	17,00	-	-	229,00	-	-	244,00	-	-		
<i>Abramis brama</i>	Braxen	100,00	941	2 713	6 924,00	4 286,00	6 680,00	6 793,00	85,00	837,00	407,00	2 196,00	2 917,00	323,00	4 507,00	343,00	2 341,00	2 565,00	1 826,00	7 325,00	3 306,00	6 344,00	-	
<i>Alburnus alburnus</i>	Benlöja	100,00	1 388	258	205,00	254,00	1 028,00	2 347,00	3 443,00	2 908,00	9 182,00	939,00	1 563,00	7 930,00	3 228,00	64,00	675,00	183,00	8 318,00	3 182,00	23 814,00	9 055,00	-	
<i>Blicca bjoerkna/Vimba vimba</i>	Björkna/Vimma	100,00	288	136	-	454,00	-	2 069,00	22,00	21,00	-	26,00	375,00	72,00	39,00	51,00	69,00	129,00	443,00	2 348,00	-	1 686,00	-	
<i>Carassius carassius</i>	Ruda	100,00	-	-	-	-	-	1 648,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	52,00	-	-	-	-	-	
<i>Leuciscus aspius</i>	Asp	100,00	-	-	-	81,00	-	-	-	38,00	35,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	91,00	
<i>Leuciscus idus</i>	Id	100,00	156	46	20,00	40,00	35,00	64,00	28,00	244,00	55,00	19,00	260,00	195,00	102,00	-	243,00	34,00	170,00	289,00	65,00	262,00	-	
<i>Rutilus rutilus</i>	Mört	100,00	17 187	15 535	5 498,00	11 908,00	3 818,00	1 122,00	1 000,00	13 574,00	2 520,00	551,00	15 002,00	4 564,00	1 886,00	6 001,00	15 101,00	11 996,00	4 481,00	19 847,00	3 583,00	5 742,00	-	
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Sarv	100,00	170	-	-	-	-	8 938,00	37,00	32,00	-	-	138,00	-	1 146,00	-	561,00	62,00	1 761,00	613,00	-	2 226,00	-	
<i>Tinca tinca</i>	Sutare	100,00	47	-	-	74,00	-	446,00	-	-	-	-	648,00	19,00	57,00	-	45,00	-	-	95,00	-	119,00	-	
<i>Vimba vimba</i>	Vimma	100,00	-	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Cyprinidae</i>			94	56	19,00	113,00	68,00	1 871,00	63,00	96,00	57,00	60,00	267,00	133,00	526,00	15,00	126,00	57,00	1 046,00	839,00	231,00	1 854,00	-	
<i>Esox lucius</i>	Gädda	100,00	-	-	93,00	84,00	517,00	93,00	50,00	126,00	-	29,00	385,00	1 387,00	1 774,00	-	270,00	53,00	738,00	2 059,00	-	616,00	-	
<i>Lota lota</i>	Lake	100,00	-	-	-	-	-	-	-	91,00	59,00	28,00	-	-	-	-	-	-	25,00	161,00	-	-	-	
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Storspigg	100,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pungitius pungitius</i>	Småspigg	100,00	-	-	136,00	152,00	-	-	32,00	-	-	114,00	-	228,00	-	-	37,00	-	-	244,00	-	147,00	-	
<i>Osmerus eperlanus</i>	Nors	100,00	432	-	-	68,00	873,00	-	-	-	-	29,00	-	-	-	58,00	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pomatoschistus microps</i>	Lerstubb	100,00	-	-	121,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pomatoschistus minutus</i>	Sandstubb	100,00	-	108	35,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	122,00	134,00	-	-	-	-	-	
<i>Gymnocephalus cernua</i>	Gärs	100,00	1 018	74	19,00	705,00	3 265,00	361,00	20,00	192,00	1 661,00	2 609,00	260,00	267,00	154,00	845,00	653,00	189,00	335,00	-	1 440,00	171,00	-	
<i>Perca fluviatilis</i>	Abborre	100,00	21 535	14 318	9 390,00	16 281,00	24 483,00	9 648,00	20 741,00	18 694,00	21 825,00	11 832,00	20 662,00	16 502,00	21 005,00	8 947,00	9 703,00	15 897,00	8 829,00	21 693,00	22 282,00	63 028,00	-	
<i>Perca fluviatilis</i>	Abborre	100,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	82,00	-	
<i>Sander lucioperca</i>	Gös	100,00	3 546	-	-	3 317,00	-	18,00	-	-	51,00	4 305,00	-	233,00	-	64,00	47,00	-	279,00	-	239,00	-	-	
<i>Zoarces viviparus</i>	Tånglake	100,00	-	710	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Coregonus albula</i>	Siklöja	100,00	-	-	122,00	-	327,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32,00	-	-	1 165,00	-	-	
<i>Salma salar</i>	Lax	100,00	216	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Salma trutta</i>	Öring	100,00	-	-	-	144,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Cottus gobio</i>	Stensimpa	100,00	-	75	717,00	507,00	740,00	-	19,00	4 508,00	3 654,00	684,00	-	73,00	291,00	3 515,00	505,00	-	-	695,00	33 876,00	152,00	-	
			47312	39830	23 583	39 147	42 610	35 444	25 540	41 505	39 506	23 547	42 574	31 993	34 847	19 845	30 727	32 420	28 251	59 634	90 201	91 575	0	
<i>Anas falcata/Anas strepera</i>	Praktand/Snatterand	100,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,00	-
<i>Anas platyrhynchos</i>	Gräsand	100,00	-	-	-	35	-	-	-	74	-	-	-	-	-	-	1 586	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bucephala clangula</i>	Knipa	99,47	-	-	-	-	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fulca atra</i>	Sothöna	100,00	-	-	885	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	153	-	-	-	-	-	-	-
			0	0	885	35,00	38,00	0	0	74,00	0	0	0	0	0	0	1 739,00	18	0	0	0	0	0	
<i>Bos taurus</i>	Ko	100,00	-	-	14,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Canis lupus</i>	Hund	100,00	-	-	-	-	-	-	-	60,00	-	-	-	-	-	-	25,00	-	-	-	-	-	-	-
<i>Homo sapiens</i>	Människa	100,00	-	-	-	-	24,00	-	-	58,00	2 512,00	-	-	-	-	-	-	23,00	-	461,00	119,00	-	-	-
			0	0	14	0	24	0	0	118	2512	0	0	0	0	0	25	23	0	461	119	0	0	
Totalt antal sekvenser			47312	39830	24 482	39 182	42 672	35 444	25 540	41 697	42 018	23 547	42 574	31 993	34 847	19 845	32 491	32 461	28 251	60 095	90 320	91 575	0	

BILAGA 7: PROCENTUELL FÖRDELNING AV ARTER 2018 – 2022

Tabell B7. Jämförelse av procentuell fördelning av arter mellan åren 2018 och 2022.

Art	Riddarkajen (SMA_01)		Skeppsbrokajen (SMA_02)		Waldermarsudde (SMA_03)		Södertälje sluss (småbåtshamn) (SMA_04)		Södertälje kanal (SMA_05)	
	2018 (maj)	2022 (augusti)	2018 (maj)	2022 (augusti)	2018 (maj)	2022 (augusti)	2018 (maj)	2022 (augusti)	2018 (maj)	2022 (augusti)
Abborre	50,6	45,5	44,5	35,9	0,6	39,8	5,9	41,6	38,1	57,5
Asp	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0
Benlöja	0,3	2,9	0	0,6	0	0,9	1,4	0,6	0,3	2,4
Björkna/Vimma	0,1	0,6	0	0,3	0	0	0,3	1,2	0	0
Braxen	1,3	2	2	6,8	14,7	29,4	12,8	10,9	1,8	15,7
Gädda	1,1	0	0	0	0,6	0,4	0,1	0,2	3,9	1,2
Gärs	6,8	2,2	1	0,2	0	0,1	0,7	1,8	5,5	7,7
Gös	0,4	7,5	0,2	0	0	0	1,4	8,5	0	0
Id	0	0,3	0	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0	0,1
Lake	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0
Lax	0	0,5	0	0,1	0	0	0	0	0	0
Lerstubb	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0
Mört	19,9	36,3	10,6	39	0	23,3	2,3	30,4	6,7	9,0
Nors	3,2	0,9	2,3	0	0	0	1,3	0,2	0,2	2,0
Sandstubb	0	0	0	0,3	0	0,1	0	0	0	0,0
Sarv	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0
Sik/Siklöja	9,3	0	4	0	0	0,5	0	0	0	0,8
Småspigg	0,1	0	0	0	15,6	0,6	0,1	0,4	0,9	0
Strömning	0	0	26,5	13,7	0,7	1,2	72,6	0	2,2	0
Stensimpa	6,8	0	1,3	0,2	10,3	3,0	0,2	1,3	35,3	1,7
Storspigg	0	0	6,6	0	56,8	0	0,3	0	4,9	0
Sutare	0	0,1	0	0	0	0	0	0,2	0	0
Tånglake	0	0	0	1,8	0	0	0	0	0	0
Vimma	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0
Ål	0,1	0,6	0	0,7	0,6	0	0,4	1,7	0,2	1,8
Öring	0	0	1	0	0	0	0	0,4	0	0



MIX Research
Sweden