

# eDNA-inventering av fisk i Gullspångsälven med fokus på asp (*Leuciscus aspius*)

Patrick Hernvall, Viktor Birgersson & Micaela Hellström



MIX Research  
Sweden



# eDNA-inventering i Gullspångsälven med fokus på asp (*Leuciscus aspius*)

<b>Utgiven av:</b>	MIX Research Sweden AB
<b>Datum:</b>	2023-11-08
<b>Uppdragsgivare:</b>	Fortum Sverige AB
<b>Författare:</b>	Patrick Hernvall, Viktor Birgersson & Micaela Hellström
<b>Kartor:</b>	Rasmus Emanuelsson
<b>Granskare:</b>	Författarna samt uppdragsgivarna
<b>Omslagsbild</b>	Provtagning på station GUL_03 (Viktor Birgersson)
<b>Fältarbete</b>	Patrick Hernvall & Viktor Birgersson
<b>Uppdraget utfördes av:</b>	MIX Research Sweden AB Adress: Uppsala Science Park, Dag Hammarskjölds väg 34A, 75237 Uppsala E-post: info@mixresearch.se Telefon: 070-782 03 10
<b>Rapporten citeras som:</b>	Hernvall, P., Birgersson, V., Hellström, M. 2023. eDNA-inventering i Gullspångsälven med fokus på asp ( <i>Leuciscus aspius</i> ). MIX Research Sweden. Rapport 2023:09.



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 miljöövervakning. eDNA är vidare relativt kortlivat i vattenmassan och ger därför en bild av arters förekomst i nutid.

Den 24–25 april 2023 utförde MIX Research Sweden AB, på uppdrag av Fortum Sverige AB, en eDNA-undersökning med flerartsanalys av fisk. Sammanlagt inventerades 13 lokaler i Gullspångsälven. Studiens syfte var att undersöka fiskesamhället i stort med särskilt fokus på eventuella förekomster av asp.

Asp detekterades på 10 av 13 lokaler och uppvisade den näst högsta relativa biomassan på 15,23 %.

Totalt detekterades 21 unika fisksekvenser i undersökningen av vilka 19 detekterades till artnivå och två till artkomplex. Omkring hälften av dessa arter påträffades på samtliga stationer. Sett till relativ biomassa var stensimpa den vanligast förekommande arten som stod för 31,5 % av det totala sekvensantalet.

Resultaten i denna rapport visar att Gullspångsälven är ett artrikt system som potentiellt innehåller en viktig funktion som reproduktionsområde för asp. Undersökningen bekräftar vidare att eDNA är en effektiv metod för att studera artmångfald och förekomst i akvatiska system som rinnande vatten. Kombinerade inventeringsmetoder med eDNA och traditionella metoder blir 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.....	10
3 Resultat.....	10
3.1 Sekvenseringsresultat.....	10
3.2 Fiskarternas förekomst över lokalerna.....	10
3.3 Fiskarternas förekomst inom lokalerna.....	12
4. SLUTSATSER.....	12
TACK .....	13
5. Referenser .....	14
Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser? .....	15
Bilaga 2. Laboratoriearbete.....	16
Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA - kontroller .....	17
Bilaga 5: Resultat av kvalitetskontroller för flerartsanalyser .....	19
Bilaga 6: Rådata för detekterade arter, antal verifierade läsningar.....	20

# 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 (Taberlet m.fl. 2012). Pedersen m.fl. 2015 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. 2018, Lawson-Handley 2015, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017, Bruce m. fl. 2021, Hellström m. fl. 2023). 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.

Aspens utbredning i Sverige är begränsad och främst knuten till vattenförekomster i Mälardalen (såsom Mälaren, Hjälmaren och Fyrisån), samt i Emån, Dalälven, Vänern, Göta älv och i Motala ströms vattensystem (Kullander m.fl. 2012). I Gullspångsälven har det vid tidigare inventeringar påträffats rom på ett fåtal platser i Stora Åråsforsen och i Kolstrandskanalen (Havs- och vattenmyndigheten 2016). Det har också fångats individer med lekvårtor i en smoltfälla som stod utplacerad under april 2021. Huruvida det sker någon stabil lek i större omfattning är dock oklart och mycket tyder på någon form av störning (Länsstyrelsen Västra Götaland 2022). Likt många andra arter är aspen känslig för vandringshinder som försvårar framkomsten till lämpliga lekhabitat. Den har också påverkats negativt av bland annat regleringar och andra exploateringar som skett i, eller i närheten av vattendrag, vilket gjort att beståndet minskat kraftigt de senaste 50 åren.

I april 2023 utförde MIX Research Sweden AB, på uppdrag av Fortum Sverige AB, en eDNA-undersökning med flerartsanalys av fisk med fokus på asp. Totalt 13 lokaler inkluderades i undersökningen varav dubbelprover togs ifrån en station.



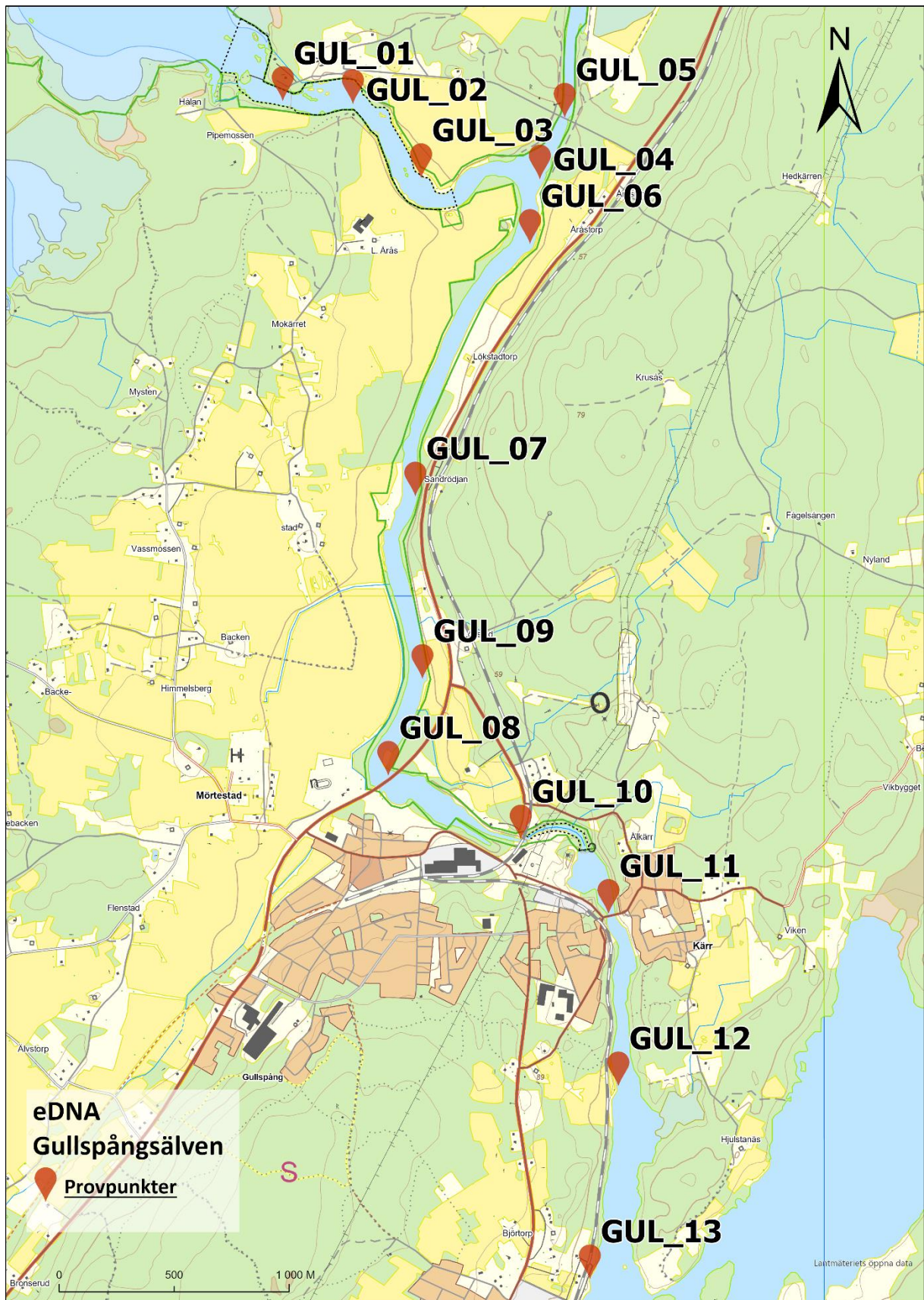
## 2 METODER

### 2.1 FÄLTARBETE

Fältarbetet utfördes den 24 – 25 april 2023 (Tabell 1, Figur 1 & 2). 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 (Spens m.fl. 2017, Harper m.fl. 2018, Kačergytė m.fl. 2021, Bruce m.fl. 2021). Provtagningen följde svenska och europeiska standarder för insamling av vatten för eDNA (SIS 2023). Totalt 3,5 liter vatten från varje station filtrerades direkt på lokalen 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 en -20 °C fältfrys innan de transporterades till MIX Research Swedens laboratorier för vidare analyser. Provtagningsutrustning steriliserades mellan lokalerna.

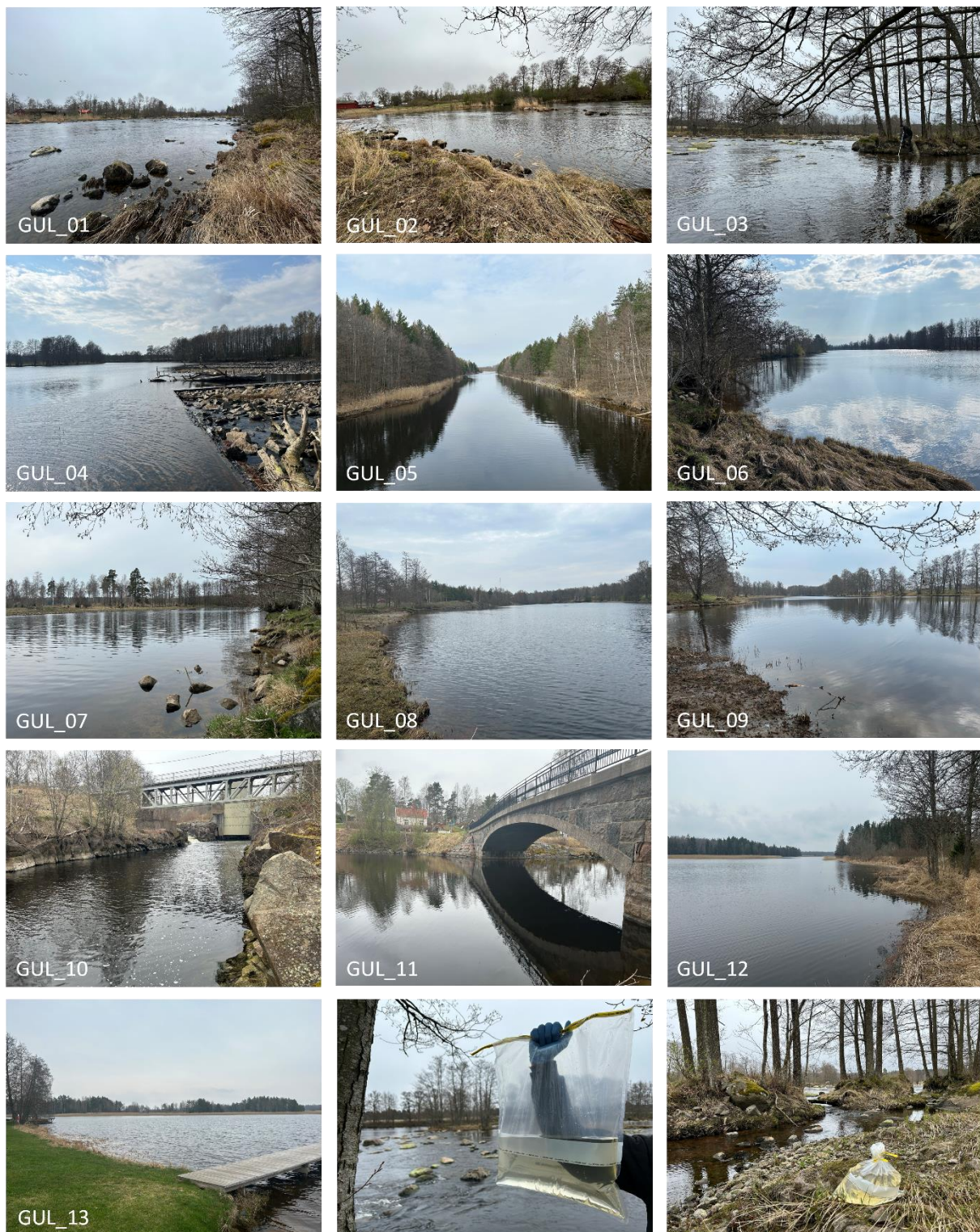
Tabell 1. Information om de undersökta lokalerna. Notera att proverna GUL\_01a och GUL\_01b är två separata prover tagna på samma plats.

Lokalnamn	Datum	V ml	T °C H <sub>2</sub> O	Djup (m)	Tid	Koordinat SWEREF 99 TM	
						Nord	Öst
GUL_01a & 01b	2023-04-25	3500	7	1-2	11:40	6542152	447646
GUL_02	2023-04-25	3500	7	1-2	11:10	6542140	447951
GUL_03	2023-04-25	3500	7	1-2	10:30	6541818	448248
GUL_04	2023-04-24	3500	8	1-2	16:30	6541812	448764
GUL_05	2023-04-24	3500	8	1-2	16:00	6542080	448872
GUL_06	2023-04-24	3500	7	1-2	16:15	6541531	448721
GUL_07	2023-04-24	3500	7	1-2	15:30	6540433	448223
GUL_08	2023-04-24	3500	7	1-2	14:45	6539219	448105
GUL_09	2023-04-24	3500	7	1-2	15:15	6539639	448253
GUL_10	2023-04-24	3500	7	1-2	14:00	6538941	448681
GUL_11	2023-04-24	3500	7	1-2	13:40	6538618	449062
GUL_12	2023-04-24	3500	7	1-2	13:15	6537868	449105
GUL_13	2023-04-24	3500	7	1-2	12:30	6537028	448981



Figur 1. Översikt av provtagningslokalernas placering i undersökningsområdet.





Figur 2. Bilder över provtagningslokalerna GUL\_01 - GUL\_13.

## 2.2 LABORATORIEARBETE

Insamlat eDNA extraherades enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i MIX Research Swedens laboratorier specifikt byggda för analyser av eDNA. Samtliga prover analyserades med flerartsanalys för förekomst av fisk (Miya m.fl. 2015, 2020). Varje PCR-prov utfördes i 4 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 inom en lokal. 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. Kvalitetskontroller anges i Bilaga 4.

## 3 RESULTAT

---

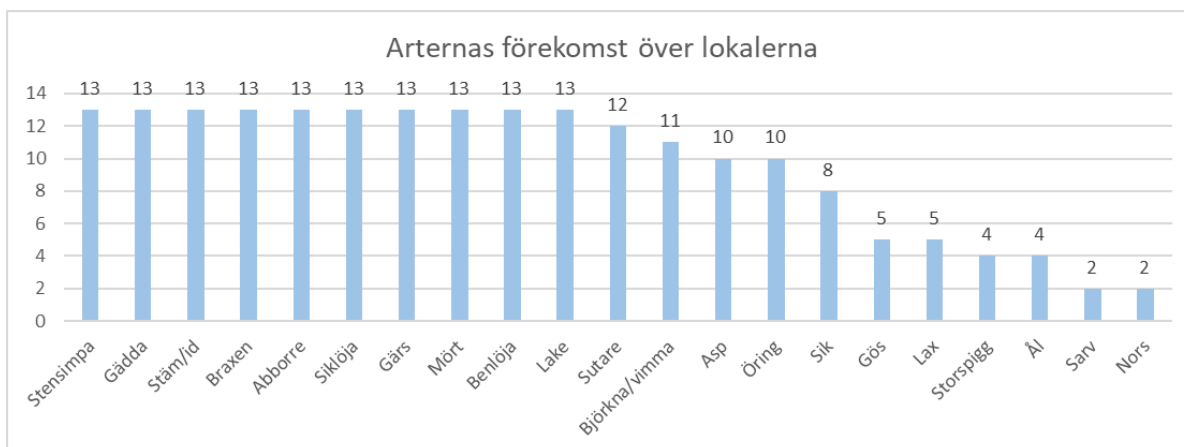
### 3.1 SEKVENSERINGSRESULTAT

Totalt detekterades 21 unika fisksekvenser i denna undersökning (Bilaga 6). Av dessa identifierades 19 till art samt två till artkomplex. 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 vimma (*Vimba vimba*) /björkna (*Blicca bjoerkna*) och id (*Leuciscus idus*) /stäm (*Leuciscus leucicus*) särskiljas genom markörerna.

### 3.2 FISKARTERNAS FÖREKOMST ÖVER LOKALERNA

Tre rödlistade arter (SLU Artdatabanken, 2020) registrerades; ål (*Anguilla anguilla*, CR), lake (*Lota lota*, VU) och asp (*Leuciscus aspius*) (NT). Vimman är även den rödlistad och klassad som nära hotad (NT), men eftersom den i denna undersökning inte kunde särskiljas från björkna kan förekomst inte bekräftas. Omkring hälften av de detekterade arterna förekom på samtliga stationer (Figur 4). Till de mer ovanliga hörde bland annat nors (*Osmerus eperlanus*), sarv (*Scardinius erythrophthalmus*), ål och storspigg (*Gasterosteus aculeatus*) (Figur 4).

Stensimpa (*Cottus gobio*) var den vanligast förekommande arten som stod för 31,5 % av det totala sekvensantalet, följt av asp (15,2 %) och gädda (*Esox lucius*) (13,2 %). Av de 21 detekterade arterna utgjorde åtta (stensimpa, asp, gädda, stäm/id, braxen, abborre, siklöja och gärs) över 90 % av det totala sekvensantalet (tabell 2).



Figur 3. Arternas förekomst över de undersökta lokalerna.

Tabell 2. Samtliga detekterade arter med sekvensantal och procentuell andel av det totala antalet sekvenser visat som relativ biomassa.

Latinskt namn	Svenskt namn	Sekvensantal	Relativ biomassa
<i>Cottus gobio</i>	Stensimpa	201 363	31,50%
<i>Leuciscus aspius</i>	Asp	97 389	15,23%
<i>Esox lucius</i>	Gädda	84 673	13,24%
<i>Leuciscus leuciscus/idus</i>	Stäm/id	49 629	7,76%
<i>Abramis brama</i>	Braxen	49 619	7,76%
<i>Perca fluviatilis</i>	Abborre	47 156	7,38%
<i>Coregonus albula</i>	Siklöja	33 414	5,23%
<i>Gymnocephalus cernua</i>	Gärs	26 686	4,17%
<i>Rutilus rutilus</i>	Mört	15 789	2,47%
<i>Alburnus alburnus</i>	Benlöja	15 605	2,44%
<i>Lota lota</i>	Lake	9 030	1,41%
<i>Salmo trutta</i>	Öring	4 275	0,67%
<i>Tinca tinca</i>	Sutare	1 644	0,26%
<i>Blicca bjoerkna/Vimba vimba</i>	Björkna/vimma	873	0,14%
<i>Coregonus marena</i>	Sik	709	0,11%
<i>Sander lucioperca</i>	Gös	554	0,09%
<i>Salmo salar</i>	Lax	368	0,06%
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Storspigg	247	0,04%
<i>Anguilla anguilla</i>	Ål	168	0,03%
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Sarv	107	0,02%
<i>Osmerus eperlanus</i>	Nors	15	0,00%
<b>Total</b>		<b>639 313</b>	<b>100,00%</b>



### 3.3 FISKARTERNAS FÖREKOMST INOM LOKALERNA

Tabell 3 visar den procentuella andelen av antal läsningar per art (relativ biomassa) inom varje lokal. Asp (*Leuciscus aspius*) detekterades på 10 av 13 lokaler (GUL\_10, GUL\_11 & GUL\_12 saknade detektion).

Den genomsnittliga artdiversiteten var 15,6 och varierade från 18 arter i GUL\_01, GUL\_04 och GUL\_08 till 12 arter i GUL\_11 (Tabell 3).

Fyra prov (GUL\_04, GUL\_08, GUL\_09, GUL\_11) visade förekomst av mindre vattensalamander (*Lisotriton vulgaris*).

Tabell 3. Fiskarternas inbördes dominans inom de olika provtagningslokalerna (kolumner) angivet i relativ biomassa. Den relativa biomassan anger hur många gånger en sekvens av en art blivit läst. Varje kolumn visar hur många procent en art är läst av totalt 100 %. Relativ biomassa som anges i blått överstiger 20 % av biomassan inom en lokal, celler som anges i gult har en biomassa mellan 9,5 och 19,5 %.

Arter	GUL_01a	GUL_01b	GUL_02	GUL_03	GUL_04	GUL_05	GUL_06	GUL_07	GUL_08	GUL_09	GUL_10	GUL_11	GUL_12	GUL_13
Äl	0.04		0.06		0.11	0.11								
Braxen	0.32	0.39	3.22	3.88	7.60	1.44	8.36	7.11	6.77	6.60	8.35	28.88	16.31	28.39
Benlöja		0.13	2.92	1.55	3.82	3.23	3.36	4.04	0.62	1.91	3.27	4.16	5.65	3.02
Björkna/vimma		0.02	0.02	0.06	0.34		0.21	0.17	0.21	0.19	0.00	0.41	0.44	0.13
Stäm/id	0.55	0.46	3.39	6.29	0.79	33.91	2.75	12.03	15.54	9.73	2.71	0.21	0.19	0.80
Asp	72.74	69.12	10.82	1.09	5.35	6.54	1.01	2.80	3.46	1.45				0.22
Mört	0.13	0.15	0.84	2.00	1.60	0.79	5.61	3.71	3.05	3.99	4.97	3.42	5.92	3.61
Sarv							0.12		0.10					
Sutare	0.01	0.01	0.11	0.12	0.18		0.27	0.32	0.24	0.28	0.85	0.38	1.20	0.77
Gädda	0.28	0.36	1.36	9.55	11.50	6.18	17.99	13.44	12.35	15.34	13.10	40.16	48.20	33.11
Lake	0.10	0.04	0.45	0.34	0.63	1.83	1.66	1.10	2.94	1.02	0.94	2.39	4.84	4.39
Nors					0.01			0.02						
Storspigg	0.01			0.17	0.21								0.25	
Gärs	0.15	0.20	0.85	4.33	5.34	5.81	8.85	10.01	2.73	4.42	2.27	4.45	3.33	4.03
Abborre	0.49	0.46	5.11	3.06	4.48	5.25	7.86	15.05	9.36	10.18	9.92	11.54	13.07	18.69
Gös		0.01				0.17			0.11	0.18				0.90
Siklöja	0.13	0.15	1.07	2.77	9.85	16.80	8.21	5.39	6.31	10.85	1.52	2.18	0.03	1.49
Sik		0.01		0.19			0.87	0.01	0.11		0.14		0.19	0.15
Lax					0.25				0.21		0.12		0.11	0.21
Öring	0.12	0.07	0.53	1.56	1.03	0.44	2.34	0.57	1.13	0.37	0.44			
Stensimpa	24.92	28.42	69.25	63.05	46.89	17.49	30.55	24.22	34.77	33.49	51.40	1.82	0.28	0.09
Totalt	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

## 4. SLUTSATSER

Den höga detektionsgraden av asp i kombination med dess relativa biomassa antyder att Gullspångsälven kan fungera som ett viktigt lekområde för arten. Det faktum att aspen påträffades på flera lokaler indikerar också en möjlig spridning och reproduktiv framgång inom en stor del av vattendraget. Undersökningen kan inte bekräfta att lek pågick, men de yttre förutsättningarna gällande period och vattentemperatur, tillsammans med den höga detektionsgraden talar för det. Leken sker i april-maj under omkring en veckas tid då vattentemperaturen nått 6 °C (Kullander m.fl. 2012). När denna undersökning genomfördes i slutet av april låg temperaturen på omkring 7 °C. För att komma till klarhet huruvida lek förekommer och utreda hur pass framgångsrik den är bör undersökningen kompletteras med traditionella inventeringsmetoder på de platser där höga detektionsgrader påträffades. Undersökningen visar att eDNA kan utgöra ett kraftfullt verktyg för övervakning av fiskpopulationer, särskilt när det gäller arter med specifika lekvanor. Eftersom aspen har en tydlig lekperiod med en viss koppling till vattentemperaturen, möjliggör eDNA en effektiv övervakning av arten vid optimala förhållanden.



Undersökningen bekräftar vidare att eDNA är en effektiv metod för att studera artmångfald i akvatiska system. Resultaten visar att Gullspångsälven är ett artrikt system som innehar en viktig funktion för många olika arter. Inventering med eDNA är tidseffektivt och kan ske i svårtillgängliga områden vilket innebär att undersökningar kan genomföras på stor geografisk skala. På detta sätt kan metoden generera stora dataset på ett sätt som tidigare inte varit möjligt. Storskaliga eDNA-inventeringar kan på så sätt bidra till eventuella åtgärdsbeslut eller inducera uppföljande, mer detaljerade inventeringar. Metoden är ett användbart verktyg i miljöövervakningen och är till nytta för att inventera arter före och efter åtgärder, som vid exempelvis utrivningar av kraftverksdammar eller anläggning av fiskvägar. Kombinerade inventeringsmetoder med eDNA (artförekomst) och traditionella metoder på utvalda platser (ålder, storlek, kön, lek) blir ett kraftfullt verktyg som ger större resolution och bättre dataunderlag för åtgärder samt beslut inom förvaltning och miljöövervakning.

Undersökningen visar också att arter som förekommer i små mängder kan undgå detektion. På lokal GUL\_01 togs två prover vilket gjorde att artantalet steg från 14 arter i prov GUL\_01a till 16 arter i prov GUL\_01b, med ett sammanlagt antal på 18 arter. Vi rekommenderar två självständiga prov per lokal som samlas in enligt SIS (2023). Tidigare undersökningar (Hellström m.fl. 2023) visar att artdetektionen stiger då antalet prov ökar från ett till två replikat med en detektionsprecision från 87,9 % till 97 %. Detektionsgraden för elfiske är cirka 30 - 60 % av fiskförekomsterna (Hellström m. fl. 2023).

## TACK

---

Ett stort tack till Marco Blixt, Fortum Sverige AB, för ett stort engagemang i fiskefrågor och för upplysande diskussioner. Rafael Augusto vid MIX Research Sweden AB som extraherade DNA. Övrigt laboratoriearbete utfördes av Micaela Hellström från MIX Research Sweden AB med assistens av Dasha Svobodova, Barbara Morrissey och Victoria Pritchard.

## 5. REFERENSER

---

- SLU Artdatabanken (2020). Rödlistade arter i Sverige (2020). SLU, Uppsala.
- Bark, J., Cronander, J., Larsson, M., Wengström, N. (2019). Ursprungliga och nuvarande uppväxtmiljöer för Gullspångslax och Gullspångsöring. Sportfiskarna. Sveriges Sportfiske- och Fiskevårdsförbund.
- 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.
- 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.
- 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.
- Havs- och vattenmyndigheten 2016. Åtgärdsprogrammet för asp. Havs- och vattenmyndighetens rapport 2016:27.
- **Hellström M**, Andersson-Li M, **Birgersson V**, Brys R, Halfmarten D, **Hernvall P**, Hänfling B, Näslund J, Sjöstedt J, Spens J, Tang C, Tjärnström M, Öhman M, Bruce K (2023). LifeDNAquatic: Riktlinjer för optimal hantering och analys av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöövervakning. Naturvårdsverket Rapport 7106 mars 2023.
- Kačergytė, I., Petersson, E., Arlt, D., **Hellström, M.**, Knappe, 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.
- Kullander, S.O., Nyman, L., Jilg, K., Delling, B. (2012). Nationalnyckeln till Sveriges flora och fauna. Strålfeniga fiskar. Actinopterygii. ArtDatabanken, SLU, Uppsala.
- 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.
- Länsstyrelsen i Västra Götalands län. 2022. Bevarandeplan för Natura 2000-området SE054213 Gullspångsälven.
- 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.
- Miya, M., Gotoh, R.O. & Sado, T. (2020). MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fish Sci* 86, 939–970.
- 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.
- SIS Swedish Standard (2023). Water quality - Sampling, capture and preservation of environmental DNA from water. SS-EN 17805:2023
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793.

# 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.

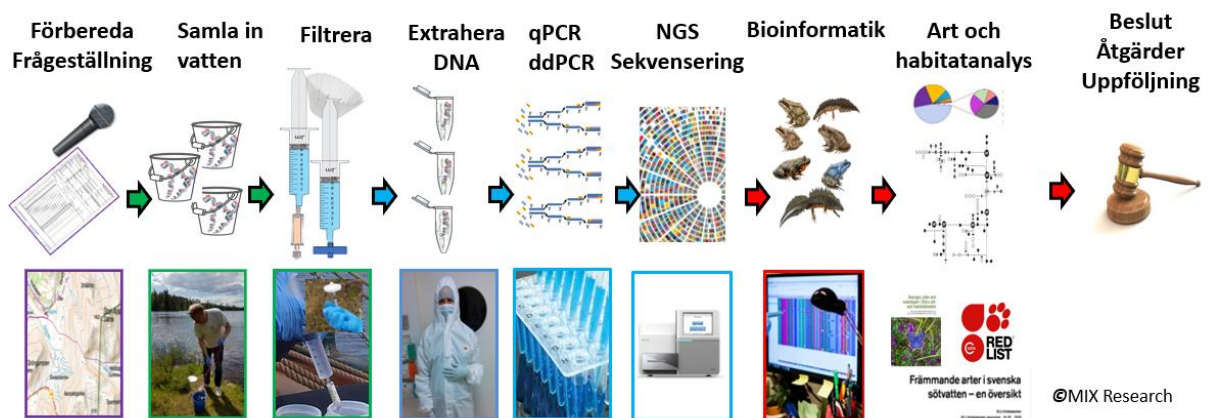
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundansen mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Analystiden för enartsanalyser är kortare än analystiden för flerartsanalyser.

## 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 fyra markörer i 12S-regionen som detekterar fisk (Miya m.fl. 2015, Miya m.fl. 2020). Varje PCR-prov utfördes i 4–6 replikat som sammanslogs 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 säkerställa kvaliteten och tillförlitligheten av resultatet.

### *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 2,9 miljarder sekvenser och 19,6 triljoner baspar enligt GenBank och NCBI hemsida (Sayers m.fl. 2023). 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.
- Miya, M., Gotoh, R.O. & Sado, T. (2020). MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fish Sci* 86, 939–970.
- NCBI websida <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Sherry, T.S., Yankie, L. & Karsch-Mizrachi I. GenBank 2023 update, *Nucleic Acids Research*, Volume 51, Issue D1, 6 January 2023, Pages D141–D144, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1012>
- 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 t.ex. Nuclease Free Water från Fisher 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://sfmg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg\\_riktlinjer-for-kvalitetssakring\\_rev101228.pdf](http://sfmg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg_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 4st. 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 180 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. DNA-koncentrationer var höga. Miya 12S-markören för fisk resulterade i 693 710 läsningar av vilka 639 313 kodade för fisk. Sekvenser för människa, hund och ko togs bort från analyserna eftersom de är vanliga kontaminationer och till en viss del kan förekomma i reagenserna.

*Tabell B5-1. Kvalitetsgranskning av eDNA. eDNA-koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR. PCR-negativ innefattar 4 replikat.*

Prov	DNA koncentration (ng/μL)	Markör	Rapporterade målartssekvenser #
GUL_01a	>60	12S	53 614
GUL_01b	>60	12S	61 298
GUL_02	44,80	12S	37 406
GUL_03	42	12S	61 681
GUL_04	53,00	12S	45 597
GUL_05	33,20	12S	67 136
GUL_06	>60	12S	45 213
GUL_07	43,70	12S	57 795
GUL_08	45,20	12S	54 574
GUL_09	39,50	12S	29 640
GUL_10	22,60	12S	29 416
GUL_11	32,80	12S	40 913
GUL_12	34,80	12S	18 689
GUL_13	45,50	12S	36 341

## 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 inom ett prov och anger relativ biomassa. Flera läsningar anger högre biomassa.

Arter (latin)	Arter	GUL_01a	GUL_01b	GUL_02	GUL_03	GUL_04	GUL_05	GUL_06	GUL_07	GUL_08	GUL_09	GUL_10	GUL_11	GUL_12	GUL_13
<i>Anguilla anguilla</i>	Ål	21	0	24	0	49	74	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Abramis brama</i>	Braxen	171	240	1 203	2 394	3 466	970	3 778	4 112	3 692	1 956	2 456	11 816	3 048	10 317
<i>Alburnus alburnus</i>	Benlöja	0	79	1 091	953	1 740	2 170	1 519	2 334	337	566	961	1 704	1 055	1 096
<i>Blicca bjoerkna/Vimba vimba</i>	Björkna/vimma	0	12	8	36	157	0	94	98	112	56	0	169	82	49
<i>Leuciscus aspius</i>	Asp	38 997	42 370	4 046	670	2 441	4 390	455	1 621	1 889	431	0	0	0	79
<i>Rutilus rutilus</i>	Mört	72	89	315	1 236	729	533	2 538	2 147	1 665	1 184	1 462	1 401	1 106	1 312
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Sarv	0	0	0	0	0	0	55	0	52	0	0	0	0	0
<i>Tinca tinca</i>	Sutare	6	6	41	77	81	0	120	187	133	83	249	156	224	281
<i>Esox lucius</i>	Gädda	151	220	509	5 890	5 245	4 152	8 133	7 765	6 738	4 546	3 854	16 430	9 008	12 032
<i>Lota lota</i>	Lake	56	27	169	210	289	1 229	750	638	1 604	303	277	976	905	1 597
<i>Osmerus eperlanus</i>	Nors	0	0	0	0	6	0	0	9	0	0	0	0	0	0
<i>Cottus gobio</i>	Stensimpa	13 363	17 422	25 903	38 892	21 382	11 739	13 813	13 999	18 975	9 927	15 119	744	53	32
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Storspigg	4	0	0	102	95	0	0	0	0	0	0	0	46	0
<i>Gymnocephalus cernua</i>	Gärs	78	123	319	2 669	2 433	3 902	4 001	5 785	1 492	1 309	669	1 820	623	1 463
<i>Perca fluviatilis</i>	Abborre	264	280	1 911	1 885	2 045	3 527	3 554	8 697	5 107	3 016	2 917	4 720	2 442	6 791
<i>Sander lucioperca</i>	Gös	0	5	0	0	0	111	0	0	58	53	0	0	0	327
<i>Coregonus albula</i>	Siklöja	68	94	402	1 706	4 492	11 276	3 712	3 117	3 445	3 216	448	890	5	543
<i>Salmo salar</i>	Lax	0	0	0	0	116	0	0	0	117	0	36	0	21	78
<i>Salmo trutta</i>	Öring	66	44	197	964	471	294	1 057	329	616	109	128	0	0	0
<i>Leuciscus leuciscus/idus</i>	Stäm/id	297	283	1 268	3 879	360	22 769	1 242	6 954	8 481	2 885	798	87	35	291
<i>Coregonus</i>	Sikfisk	0	4	0	118	0	0	392	3	61	0	42	0	36	53
<b>Total</b>		<b>53 614</b>	<b>61 298</b>	<b>37 406</b>	<b>61 681</b>	<b>45 597</b>	<b>67 136</b>	<b>45 213</b>	<b>57 795</b>	<b>54 574</b>	<b>29 640</b>	<b>29 416</b>	<b>40 913</b>	<b>18 689</b>	<b>36 341</b>
<i>Lissotriton vulgaris</i>	Mindre vattensalamander	0	0	0	0	163	0	0	0	13	22	0	6	0	0
<b>Total</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>163</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>22</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>





MIX Research  
Sweden