

eDNA-inventering av fisk i småbåtshamnen i Lövsta



AquaBiota Report 2019:08

Författare: Micaela Hellström och Cecilia Edbom Blomstrand

AquaBiota Water Research



AquaBiota

STOCKHOLM, JUNI 2019

Beställare:

Undersökningen är utförd av AquaBiota Water Research AB för Sweco Energuide AB.

Författare:

Micaela Hellström (micaela.hellstrom@aquabiota.se)

Cecilia Edbom Blomstrand (cecilia.edbom.blomstrand@aquabiota.se)

Bilder:

Nicklas Wijkmark, Micaela Hellström

Kontaktinformation:

AquaBiota Water Research AB

Adress: Löjtnantsgatan 25, SE-115 50 Stockholm, Sweden

Tel: +46 8 522 302 40

www.aquabiota.se

Kvalitetsgranskad av:

Nicklas Wijkmark (nicklas.wijkmark@aquabiota.se)

Distribution:

Fri

Internetversion:

Nedladdningsbar hos www.aquabiota.se

Citera som:

Hellström M, Edbom Blomstrand, C. 2019. eDNA-inventering av fisk i småbåtshamnen i Lövsta, Hässelby. AquaBiota Report 2019:08. 13 sid.

AquaBiota Report 2019:08

Projektnummer: 2019011

ISBN: 978-91-85975-95-2

ISSN: 1654-7225

© AquaBiota Water Research 2019

INNEHÅLL

INNEHÅLL	3
Sammanfattning	5
1. Inledning	6
2. Material och Metoder	7
2.1 Fältmetoder	7
2.2 Laboratoriemetoder	8
2.3 eDNA kvalitet samt kvalitetskontroll	8
2.4 Jämförande studier	8
3. Resultat och diskussion	9
3.1. Sekvenseringsresultat	9
3.2 Arternas förekomst - sammanlagd översikt	9
3.3 Jämförelse; tidigare fiskundersökningar och eDNA	11
3.3 Slutsatser	12
Referenser	Fel! Bokmärket är inte definierat.
Bilagor B1 - B6	
B1.1 Extraktion, PCR och sekvensering	14
B 1.2. Bioinformatik och verifiering	15
B2. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar	16
B3. Kvalitetssäkring av eDNA	17
B 4: Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser	18
B 5: Resultat av kvalitetskontroller	19
B6. eDNA resultat. Antal läsningar per art och prov.	20

SAMMANFATTNING

På uppdrag av Sweco Energuide AB utfördes en eDNA undersökning av fiskförekomster vid den plats där Lövsta kraftvärmeverk kan komma att byggas. Resultaten jämfördes med befintliga skrivbordsundersökningar för fisk från prov och sportfiskedata.

Akvatiskt miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) har under det senaste decenniet visat sig vara ett lovande verktyg för inventering av vattenorganismer för miljöövervakning. Undersökningsmetoden baserar sig på det faktum att alla levande organismer, både växter och djur, kontinuerligt avger genetiska avtryck i miljön i form av slem, avföring, svett och döda celler. Dessa genetiska spår kallas eDNA. Akvatiskt eDNA är spåren som organismer avger i vattenmiljön. eDNA kan utvinnas ur små mängder vatten (100 mL – 5 L) och genom molekyllära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område utan att man varken ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat ger analyserna en bild av artförekomst i nutid.

Insamlingen av vatten utfördes under en halvdag i april 2019 vid Lövsta småbåtshamn i Hässelby. Sammanlagt sex vattenprover från fem lokaler inom det planerade området, och en lokal utanför, samlades in för undersökningen och analyserades.

I Lövsta småbåtshamn påträffades 16 fiskarter av Mälarens 32 rapporterade arter (36 i avrinningsområdet). I närheten av undersökningsområdet har nätprovfisken detekterat 8 fiskarter av vilka en lake individ detekterats. Elfiske i de grunda vattnen har detekterat lake och spigg. I denna undersökning påträffades arter som är svårfångade i provfisken.

Av rödlistade arter detekterades små mängder ål, samt större mängder lake. Lake detekterades även genom drop-video som AquaBiota utförde för vegetationsundersökning i juni 2018. Stensimpan är listad i EU:s Annex II lista till EU:s habitatdirektiv. Det är den sötvattensfisk som det satsas mest på i EU:s LIFE-restaureringsprojekt. Stensimpan detekteras sällan i provfisken mer är mycket vanligt genom eDNA detektion.

Under en provtagning en vecka efter eDNA undersökningen varnade skyltar i hamnområdet för tungmetaller i sediment i småbåtshamnen. Området är litet och fiskarterna som påträffades finns även utanför området. I övrigt rekommenderas det att vidta försiktighetsåtgärder vid byggandet av hamnanläggningen för att skydda kringliggande områden från ökad grumling och sedimentation.

1. INLEDNING

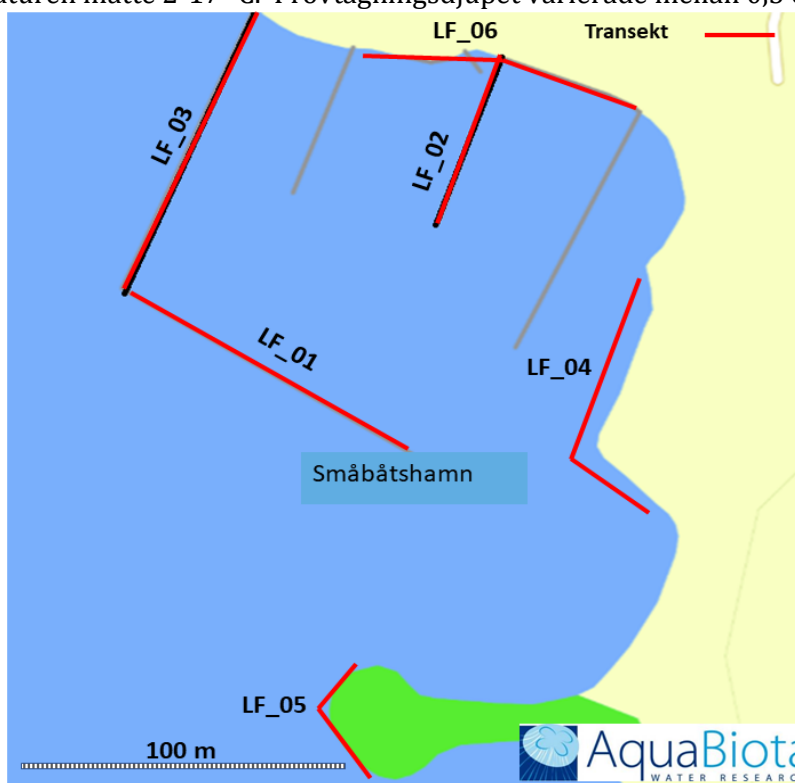
Undersökningsmetoden miljö-DNA eller eDNA (environmental DNA) baserar sig på det faktum att alla levande organismer, -både växter och djur, -kontinuerligt avger genetiska fotavtryck i miljön i form av slem, avföring, respiration, svett och döda celler (Pedersen m.fl. 2015). Definitionen på eDNA anges som; "det DNA som kan studeras från dessa spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet" (Taberlet m.fl. 2012). I akvatiska miljöer kan detta material utvinnas ur små mängder vatten och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område, utan att man varken ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat (ca. 1-2 veckor) ger analyserna en bild av artförekomst i nutid. eDNA har visat sig ha en stor potential som verktyg för inventering av vattenorganismer (Bohmann m.fl. 2014, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017). Vidare har flera studier visat att eDNA i sjöar och rinnande vatten detekterar flera arter än vad provfisken gör (Hänfling m.fl. 2016, Hellström & Spens 2017 a, b, c, Hellström m.fl. 2018).

På uppdrag av Sweco Energiguide AB utfördes en eDNA undersökning av fiskförekomster vid den plats där Lövsta kraftvärmeverk kan komma att byggas. Resultaten jämfördes med befintliga skrivbordsundersökningar för fisk från prov och sportfiskedata. Uppdragets mål var att inventera fiskarter som kan reproducera sig i området och som kan påverkas av byggnationer i småbåtshamnen.

2. MATERIAL OCH METODER

2.1 Fältmetoder

Fältarbetet utfördes 26 april 2019. Provtagningsstranssektorer anges i figur 1 och provpunkterna i tabell 1 i tabell 1. Koordinaterna anges som decimalgrader i WGS84. Lufttemperaturen mätte 2-17 °C. Provtagningsdjupet varierade mellan 0,5 och 3 meter.



Figur 1. Karta över provtagningsstranssektorer i Lövsta småbåtshamn. Transekt LF_05 är referenslokal samt transekt LF_04 befinner sig utanför småbåtshamnen.

Tabell 1. Provpunkter. Position, djup vid provtagningen, volym filtrerat vatten (mL), vattentemperatur, provtagningsstidpunkt och mållart för varje provpunkt. SBH = småbåtshamn. Proven samlades in 26 april 2019

Provpunkt namn	Latitud (N)	Longitud (Ö)	Djup (m)	Volym (mL)	H ₂ O °C	Tid
LF_01 Lövsta SBH brygga 1 a	59,386297	17,782318	0,5	5000	5,8	10:45
LF_02 Lövsta SBH brygga 1 b	59,386927	17,783431	0,5	5000	5,8	10:45
LF_03 Lövsta SBH brygga 2	59,386914	17,78192	0,5	4000	5,4	10:30
LF_04 Lövsta utanför SBH	59,38663	17,784616	0,5	5000	6,1	12:25
LF_05 Lövsta halvudde	59,385271	17,783146	0,5	5000	7,5	12:30
LF_06 Lövsta SBH strandlinje	59,387194	17,783302	0,5	5000	5,2	11:00

Innan provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria engångsförpackningar. På de grunda

lokalerna samlades 5 liter vatten in per prov i form av 10 stycken underprover som var jämt fördelade längs transekten som visas i figur 1. Transekt LF_05 utgjorde en referenspunkt utanför småbåtshamnen och transekt LG_04 var placerat vid utkanten av hamnen där de nya byggnationerna kan komma att utföras. Vattnet blandades och filtrerades. Negativa fältkontroller utgjordes av rent vatten som hanterades med samma provtagningsutrustning och filtrerades på plats för att utesluta kontaminering av DNA mellan prover eller från provtagare. Insamling och fixering följde Spens m.fl. (2017).

2.2 Laboriemetoder

Laboriemetoderna beskrivs i bilaga 1,2,3 och 4.

2.3 eDNA kvalitet samt kvalitetskontroll

Kvalitetskontrollerna samt mängden följer direktiven i bilaga 3 och anges i bilaga 4.

2.4 Jämförande studier

eDNA resultaten jämfördes med 24 befintliga provfisker (KUL) som gjorts i området, intervjuer med sportfiskare på plats, Limnordic ABs databas, elfisken i grunda vikar i området (Nöbelin 2010) samt med eventuella arter som visades på dropvideo i en vegetationsinventering. Både artförekomster men även antal arter som förekom per ansträngning detekterades.



Fältprovtagning. Foto Micaela Hellström.

3. RESULTAT OCH DISKUSSION

3.1. Sekvenseringsresultat

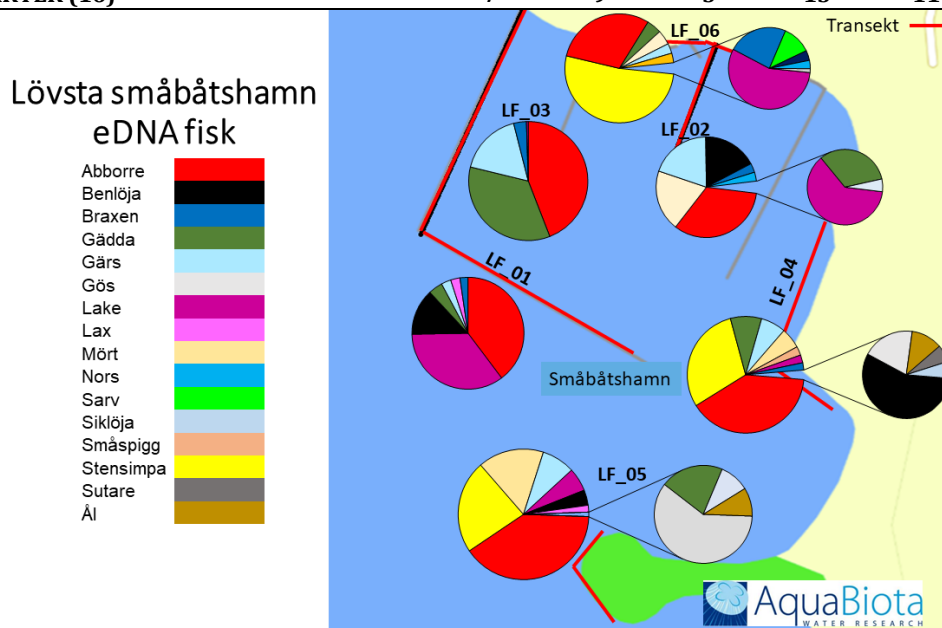
Sekvenseringsresultaten anges i bilaga 4 och bilaga 6. Alla negativa kontroller var negativa.

3.2 Arternas förekomst – sammanlagd översikt

Tabell 2 och figur 2 listar de sammanlagt 16 fiskarter som inkluderades i eDNA analyserna vid Lövsta småbåtshamn.

Tabell 2. Arternas förekomst över lokalerna. Figuren visar arternas förekomst över de olika lokalerna. Abborre, gädda, gers och lake förekom på alla lokaler.

Fiskart	Fiskrt latin	LF_01	LF_02	LF_03	LF_04	LF_05	LF_06
Abborre	<i>Perca fluviatilis</i>	X	x	X	X	X	x
Benlöja	<i>Alburnus alburnus</i>	X	X		X	X	X
Braxen	<i>Abramis brama</i>	X	X	X	X		X
Gädda	<i>Esox lucius</i>	X	X	X	X	X	X
Gers	<i>Gymnocephalus cernua</i>	X	X	X	X	X	X
Gös	<i>Sander lucioperca</i>				X	X	x
Lake	<i>Lota lota</i>	X	X	X	X	X	X
Lax	<i>Salmo salar</i>	X				X	
Mört	<i>Rutilus rutilus</i>		X		X	X	X
Nors	<i>Osmerus eperlanus</i>		X				X
Sarv	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>						X
Siklöja	<i>Coregonus albula</i>		X		X	X	
Småspigg	<i>Pungitius pungitius</i>				X		X
Stensimpa	<i>Cottus gobio</i>				X	X	X
Sutare	<i>Tinca tinca</i>				X		
Ål	<i>Anguilla anguilla</i>				X	X	
# ARTER (16)		7	9	5	13	11	12



Figur 2. Pajdiagram som visar procentuell fördelning av fiskarter inom de olika lokalerna. Notera att ål enbart förekom vid kontroll-lokalen (LF_05) samt utanför småbåtshamnen (LF_04).

Antal läsningar av arternas sekvenser samt procentuella värden inom transekterna finns i finns listat i tabell B6_1 och B6_2 i bilaga 6.

De vanligaste arterna var abborre, gers, gädda och lake, varav abborre dominerade på alla lokaler. Lokalerna utanför småbåtshamnen (referenslokalen) och lokal LF_04 var mycket artrika. Lake är rödlistad som nära hotad (NT). Ål är rödlistad som akut hotad (CR; ArtDatabanken 2015) och förekom på referenslokalen samt LF_04 utanför småbåtshamnen. Lax finns i Mälaren men förökar sig inte. Arten förekom på referenspunkten samt vid utsidan av brygga 1 (LF_01). De olika arternas betydelse listas nedan.

Abborre (*Perca fluviatilis*) är en art vars förekomst överskattas vid provfisken med översiktsnät eftersom de lättare fastnar i dessa. Abborre är sämre anpassad för höga vattenhastigheter, och är en s.k. lugnvattenfisk. Abborre förekom i alla provpunkter och visade mycket högt antal eDNA läsningar som visas i figur 2 samt bilaga 6.

Benlöja (*Alburnus alburnus*) är stimlevande och mycket vanlig. Arten ansamlas ofta i anslutning till inlopp och utlopp i sjöar. Benlöjan äter ytinsekter och utgör föda för rovfiskar och fåglar. Arten är tålig mot värme och övergödning.

Braxen (*Abramis brama*) är likt abborre en lugnvattenart. Under vintern samlar sig braxen i relativt täta och passiva aggregationer, vilket leder till en säsongrelaterad överdominans på lokaler där ansamlingarna finns.

Gers (*Gymnocephalus cernua*) är en fiskart som är vanlig i hela Sverige och förekommer i de flesta sötvatten. Arten Gers har identifierats som möjlig värdfisk för den rödlistade arten flat dammussla (*Pseudanodonta complanata*) tillsammans med stensimpa då mussellarverna kan genomgå hela sin utvecklingsfas på dessa arter. Gers äter bottenlevande djur och abborr-rom, arten trivs på mjukbottnar och är tålig mot övergödning.

Gädda (*Esox lucius*) har etablerats naturligt vid samtliga provlokaler vilket nu, tillsammans med barriärer, sannolikt utgör den huvudsakliga begränsande faktorn för laxartad fisk, t ex öring (*Salmo trutta*) i dessa vattendrag.

Gös (*Sander lucioperca*) föredrar grumliga vatten och lerbottnar. Arten kan påverkas om bottnarna ändras. Gös är synnerligen viktig för yrkesfisket. I denna studie påträffades gös främst i referenslokalen samt i lokal LG_04 som är på utsidan av småbåtshamnen

Lake (*Lota lota*) vandrar under vintern upp i åar för att reproducera sig. Kallvattenarten lake är uppsatt på den svenska rödlistan som nära hotad (NT), pga. sannolik minskning i antalet populationer och utbredningsområde i Sverige som följd av varmare klimat. Laken föredrar stenar och bryggor, arten föredrar inte mjukbotten. Lake hittades på alla provpunkter i denna undersökning.

Lax (*Salmo salar*) i Mälaren reproducerar inte i sjön och förekomsterna härstammar från utsättningar.

Mört (*Rutilus rutilus*) är en försurningskänslig art som förekom i betydande mängder (antal DNA-träffar) vid varje provlokal. Riklig förekomst tyder på att lokalerna inte är försurningspåverkade.

Nors (*Osmerus eperlanus*) Norsen påträffades vid referenslokalen samt inne i småbåtshamnen. Norsen är en stimlevande fisk som utgör mycket viktig föda för fåglar. eDNA spår av nors kan bero på närvaro av nors eller fågelexkrement.

Sarv (*Scardinius erythrophthalmus*) är en vegetationsälskande stimfisk som är vanlig i Mälaren. Arten livnär sig på små ryggradslösa djur i de tidiga utvecklingsskedena medan fullvuxna fiskar lever på växter och insekter.

Siklöja. (*Coregonus albula*). Ett av de bästa fisken i Mälaren anses vara siklöja. Arten är vanlig och föredrar stora öppna ytor. Siklöja hittades på referenslokalen, utanför hamnen samt lokal FL_06.

Småspigg (*Pungitius pungitius*) är mycket tålig mot eutrofiering. Under sommaren 2018 drabbades småspiggen av massdöd i Mälaren på grund av den extremt heta sommaren.

Stensimpan (*Cottus gobio*) kräver syrerika hårbottenar och klart vatten för att trivas. Arten är en god indikator för vattenkvalitet. Stensimpan är nattaktiv och svårfiskad eftersom den lever gömd under stenar och grus. Stensimpan är listad i EU:s Annex II lista till EU:s habitatdirektiv. eDNA-metoden kan tillföra förbättrade detektioner av arten. Stensimpan kommer mycket ofta upp på eDNA undersökningar och är möjligtvis mer svårupptäckt än en sällsynt art. I denna studie hittades arten i stora mängder på referenslokalerna samt på Lokal 06. Småbåtshamnen är inte en lämplig reproduktions-, födo- eller vandringslokal för stensimpan.

Sutare (*Tinca tinca*) är en introducerad karpfisk som är tålig mot övergödning och höga temperaturer.

Ål (*Anguilla anguilla*) Ålens status i Sverige är klassad som akut hotad (CR) (Artdatabanken 2015). Ålfiske är tillåtet i utbyggda vattensystem där arten anses ha minimal möjlighet att vandra. Ålen är utsatt i Mälaren. Studier har visat att Mälarens ålar har problem att hitta ut till öppna havet för att vandra i Sargassohavet (Sjöberg 2015). I denna undersökning befann sig ålen utanför själva småbåtshamnen på lokal FL_04 och FL_05.

3.3 Jämförelser tidigare fiskdata och eDNA

Jämförelser mellan nätfiske över 24 år, ett elfiske 2010, lokalbefolkningens fångstberättelser, dropvideo (en session 2019) samt en eDNA session, visas i tabell 4.

Tabell 4. Jämförelse mellan resultat av olika metoder gällande fiskförekomstdata i området genom; nätfiske* (bottennät - BN), sportfiskedata, intervju med lokalbefolkning (anekdotal - AD) samt elfiskedata (Nöbelin 2010). Notera att enbart en lake-individ detekterades med nätfiske, 3 individer med elfiske. Fiskarternas rödlistastatus och möjligheter till reproduktion i Mälaren listat i tabellen. BN = Bottennät, EL = Elfiskedata, AD = Anekdot, DV = Dropvideo

Fiskart	Fiskrt latin	BN	EL	AD	DV	eDNA	Rödlista status	Reproducerar i Mälaren
Abborre	<i>Perca fluviatilis</i>	X		X	X	X		ja
Benlöja	<i>Alburnus alburnus</i>	X				X		ja
Björkna	<i>Blicca Bjoerkna</i>	X						ja
Braxen	<i>Abramis brama</i>	X		X		X		ja
Gädda	<i>Esox lucius</i>	X		X		X		ja
Gers	<i>Gymnocephalus cernua</i>	X		X	X	X		ja
Gös	<i>Sander lucioperca</i>	X				X		ja
Lake	<i>Lota lota</i>	X	X	X	X	X	Nära hotad (NT)	ja
Lax	<i>Salmo salar</i>			X		X		(utsättningar)
Mört	<i>Rutilus rutilus</i>	X		X		X		ja
Nors	<i>Osmerus eperlanus</i>	X				X		ja
	<i>Scardinius</i>					X		
Sarv	<i>erythrophthalmus</i>	X						ja
Siklöja	<i>Coregonus albula</i>					X		ja
Småspigg	<i>Pungitius pungitius</i>					X		ja
Stensimpa	<i>Cottus gobio</i>			X		X		ja
Sutare	<i>Tinca tinca</i>					X		ja
Ål	<i>Anguilla anguilla</i>					X	Akut hotad (CR)	(utsättningar)

*) 24 bottennät från NORS nätfiskedatabas noterades i provfisken. SLU, 1995-09-05. Görväln, 658080-162871 Mälaren)

3.4 Slutsatser

Under den tid AquaBiota undersökte småbåtshamnen i Lövsta framkom det att sedimenten var förorenade av tungmetaller, vilket meddelades på en varningsskylt i hamnen. Ett mycket stort antal fiskarter detekterades med hjälp av eDNA i området. De känsliga arterna detekterades på referenslokalerna utanför hamnen.

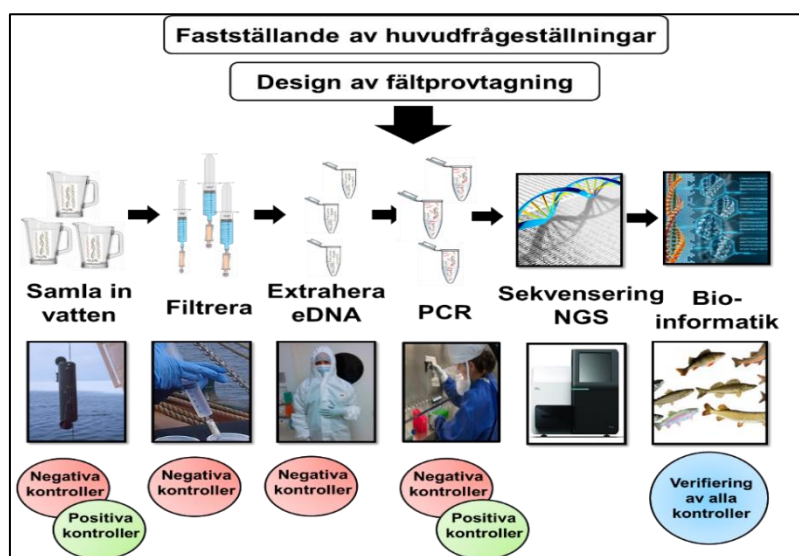
Området är litet och fiskarterna som påträffades finns även utanför området. I övrigt rekommenderas det att vidta försiktighetsåtgärder vid byggandet av hamnanläggningen för att skydda kringliggande områden från ökad grumling och sedimentation.

REFERENSER

- ArtDatabanken 2015. Rödlistade arter i Sverige 2015. ArtDatabanken SLU, Uppsala
- Bohmann, K., A. Evans, M. T. P. Gilbert, G. R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, D. W. Yu, och M. de Bruyn. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 29:358 – 367.
- 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.
- Hellström, M & Spens, J.** 2017 a. eDNA - Fiskförekomst i 10 kustmynnande vattendrag, Norrbottens län AquaBiota Rapport 2017:10. 30 sid. ISBN: 978-91-85975-67-9
- Hellström, M & Spens J.** 2017 b. eDNA - Fiskinventering vid Spjutmo kraftverk. AquaBiota Rapport 2017:12. 29 sid. ISBN: 978-91-85975-69-3
- Hellström, M & Spens J.** 2017 c. eDNA - Fiskinventering vid Spjutmo kraftverk. AquaBiota Rapport 2017:12. 29 sid. ISBN: 978-91-85975-69-3
- Hellström, M., Wijkmark N & Spens, J.** 2018. Fisk inventering med hjälp eDNA i Ore Älv, Dalarnas län. AquaBiota Rapport 2018:11. 23 sid. ISBN: 978-91-85975-80-8
- Hänfling, B., L. Lawson Handley, D. S. Read, C. Hahn, J. Li, P. Nichols, R. C. Blackman, A. Oliver, och I. J. Winfield. 2016. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*
- Kelly, R.P., Port, J.A., Yamahara, K.M. och L.B. Crowder. 2014. Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PloS One* 9 (1): e86175
- 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.
- 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.
- Nöbelin F. 2010. Elprovfisken I Mälaren och Yngern 2009. Länsstyrelsen i Stockholms län
- 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
- Sjöberg, N.B., 2015. Eel migration-results from tagging studies with relevance to management (Doctoral dissertation, Department of Ecology, Environment and Plant Sciences, Stockholm University).
- Spens, J.**, A. R. Evans, D. Halfmaerten, S. W. Knudsen, M. E. Sengupta, S. S. T. Mak, E. E. Sigsgaard, och **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
- Författarnamn i **fet stil** anger medarbetare på AquaBiota

BILAGA 1: Laboratoriearbete

B1.1 Extraktion, PCR och sekvensering



Figur B1. Flödesschema som visar de olika stegen för eDNA undersökningar. (Figur: Micaela Hellström)

Flödesschemat i figur B5 beskriver eDNA-processen från insamling till analys. eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Detta kunde ske genom ett exklusivt samarbete med MoRe Research i Örnköldsvik. Extraktionerna utfördes av molekylärbiologiska tekniker som är tränade i att extrahera eDNA. Proverna analyserades med flerartsanalyser för förekomst av fisk (bilaga 2) samt andra vertebrater. Varje PCR prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs under bioinformatiken. En modifierade markörer som amplifierar 12S rDNA regionen användes (KMiya m.fl 2015) . Principerna för metabarkodning förklaras mer utförligt i bilaga 1. Vidare användes en positiv DNA kontroll med känd artsammansättning som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyserades för att säkerhetsställa kvalitetskrav (bilaga 2).

B 1.2. Bioinformatik och verifiering

Varje enskild art har en unik streckkod (Se bilaga 1) eller sekvens. Varje unik sekvens fick en molekylär identitet. De olika sekvenserna kördes mot 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 mer än 370 000 kända arter finns tillgängliga (Benson m.fl. 2017, bilaga 1) med 0,6 miljarder sekvenser och 2,6 biljoner baspar enligt NCBI:s hemsida. De olika sekvenserna matchades mot databasen och fick på så sätt fisk, däggdjurs och groddjurs identitet. Tack vare nya framsteg inom metabarkodning är det möjligt att få information på artnivå istället för enbart familje- eller genus- nivå. Antalet läsningar per art gav en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekom i ett prov

Bilaga 2. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar

Varje levande art utsöndrar genetisk arvs massa eller DNA i sin omgivning genom respiration, rörelser, filtrering, avföring, döda hudceller osv. Detta DNA som lämnas kvar i miljön utan att individen i sig provtas kallas miljödDNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA).

Vissa delar av en arts DNA är helt unikt för just den arten, medan andra delar av DNA ser likadant ut hos alla organismer i en grupp. Med hjälp av jättelika databaser över DNA-sekvenser, som är öppet tillgängliga för alla (ex <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), kan man välja ut en liten bit DNA som man kan kopiera industriellt. Dessa små bitar kallas primers. Eftersom primern är artspecifik fastnar den enbart på DNA för den valda arten. Resultatet, dvs en liten bit av DNA som primern kopierar kallas barcode (streckkod), och kan liknas vid den streckkod som används för att betala för just den enskilda varan i affärer. Dessa primers, en droppe eDNA, ett enzym och salter blandas i ett provrör. Provröret placeras i en maskin som gör DNA kopior för just den arten. Detta kallas för PCR (Polymerase Chain Reaction) och bygger på hur levande celler kopierar sin arvs massa vid celledelning.

Enartsstudier qPCR eller ddPCR levereras ej i detta projekt

Inventering av förekomst av en enstaka art med eDNA görs med så kallad qPCR. Frågeställningen för dessa studier är: **Finns art X här?** Varje art analyseras med en markör som är specifik för precis den arten. Prosvaren anger närvaro/frånvaro av just den arten och en relativ eDNA-abundans mellan olika provtagningslokaler. Minst 12 qPCR replikat skall analyseras för att ge tillförlitliga resultat.

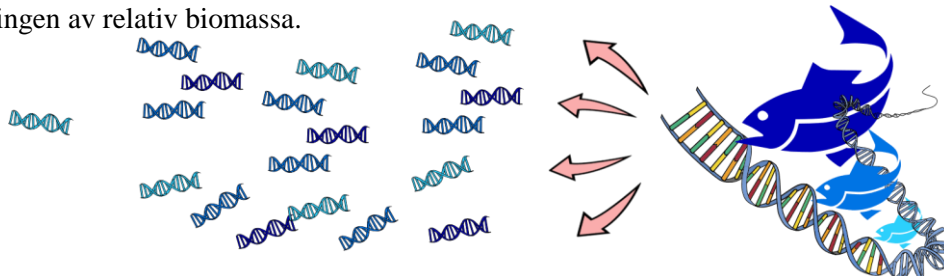
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundanser mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Som exempel kan nämnas att 1000 DNA kopior av gädda inte motsvarar 1000 kopior av abborre och analyserna kan inte tillförlitligt svara på vilken av arterna som är mest förekommande.

Flerartsstudier –Metastreckkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

Frågeställningen för flerartsstudier är; **Vilka arter finns här och vilka av dessa är vanliga eller sällsynta?** Med andra ord behöver man inte på förhand veta vad man letar efter.

Metastreckkodning eller metabarcoding innebär att man designar en primer som är gemensam för alla arter inom en grupp – indelade exempelvis med fokus på fisk, fokus på groddjur eller fokus på musslor. Eftersom man analyserar flera olika arter på en gång kallas metoden metastreckkodning. Anledningen till att man inte kan analysera alla djurgrupper samtidigt med en primer är det inte finns lämpliga målregioner i genomen som både är gemensamma för alla arter men samtidigt varierar så pass mycket att enskilda arter kan identifieras.

Invasiva eller skygga arter kan identifieras och antalet arter som kommer upp i en analys är obegränsat. Om man inventerar 3 eller fler arter är denna metod att föredra, och blir snabbt mer kostnadseffektiv än enartsanalyser. Flerartsanalyser visar även vilka arter man har fått och vilket dominansförhållande dessa har till varandra i ett vattendrag. Med andra ord kan den relativa biomassan räknas ut. Notera dock att under parningstiden förekommer DNA av de arter som förökar sig i större mängder då könsceller släpps ut i vattnet, vilket kan interferera med bestämningen av relativ biomassa.



Bilaga 3. Kvalitetssäkring av eDNA

Därför är kontrollprover nödvändiga vid eDNA-provtagning

En undersökning med hjälp av eDNA som saknar positiva och negativa kontroller kan inte ge tillförlitliga resultat. Detta gäller egentligen för 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 (Griffiths m.fl. 2016) finns speciella regelverk för kriminaltekniska (Hedmanm.m.fl. 2017) och medicinska (SFMG, 2011) undersökningar. Strikta riktlinjer för ett standardiserat utövande av eDNA-undersökningar tas just nu fram inom EU med utgångspunkt från Goldberg m.fl. (2016). Dessa regler kommer att kräva negativa och positiva kontroller som ett grundläggande krav.

Negativ kontroll; Ett prov med vatten som inte innehåller DNA filtreras vid inventerade lokaler med samma provtagningsmetodik. Detta prov kallas för negativ kontroll. Vidare analyseras DNA-fria prover i olika steg av undersökningen så att man kan försäkra sig om att kontaminering inte förekommer i fält eller laboratorium och orsakar falska positiva provsvar. Om DNA-signaler hittas i en negativ kontroll innebär det att undersökningen måste göras om.

Konsekvenserna av en kontaminerad negativ kontroll kan i praktiken innebära att:

- | | |
|---|--|
| a) en frisk person får en cancerdiagnos | b) fel person binds till ett brott |
| c) faderskapstest anger fel far till ett barn | d) arter som inte finns i ett område 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.

Konsekvenserna av en positiv kontroll utan DNA-signal kan i praktiken innebära att:

- | | |
|---|--|
| a) en cancersjuk person blir inte diagnostiserad och dör | b) en skyldig person kan inte bindas till brottet |
| c) ett faderskapstest kan inte knyta rätt far till barnet | d) arter som finns i ett område detekteras inte (falsk negativ) |

Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser

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 samlats in.*
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 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 vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.*
6. 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. Det totala antalet sekvenseringsläsningar, samt andel (%) av målarterna i läsningarna redovisas. *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 12 PCR replikat per art/artgrupp och eDNA prov utförs. Maximalt 4 av dessa sammanslås i sekvenseringen. *Färre replikat minskar analyssäkerheten 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.*



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

Bilaga 5: Resultat av kvalitetskontroller

Bakgrunden till kvalitetskontrollerna anges i Bilaga 4. Värden för kontrollerna anges i tabell B5_1. DNA var rent och visade hög kvalitet. Alla negativa kontroller var negativa för målarter. De positiva kontrollerna var positiva. Kontaminant-DNA tillhörande hund och människa som är vanliga i reagenser och vattnet runtomkring oss togs automatiskt bort från analysen. Strömning antas vara en kontaminering av föda/fågelavföring och togs bort från analyserna.

Resultaten av MiSeq parvis sekvensering för 12S (230 baspar) som detekterar groddjur och fisk, inkluderade i denna rapport 1 103 080 sekvenser som godkändes genom alla kvalitetsfilter. Av dessa var mindre än 0,001% kontamineringsar så som människa och hund. Dessa läsningar inkluderade en separat groddjursundersökning från Lövsta golfbana. Totalt matchade 799 074 sekvenser målarterna fisk. Detta är en indikation på hög kvalitet på eDNA och slutgiltigt data. Sekvenseringsdata för markörerna analyserades genom en pipeline som är specialdesignad av NatureMetrics Ltd. Datat testades mot både NCBI och NatureMetrics kurerade referensdatabaser.

Tabell B5-1. Kvalitetsgranskning av eDNA och kontroller. eDNA koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR. Band på gel av målarter efter PCR visar att provanalyserna har fungerat. PCR negativ innefattar 12 replikat. Filtrerad volym vatten anges i liter, eDNA koncentration ng/μl, inhibering samt anti-inhibering, band gel PCR anger om målarterna visade band på gel för närvaro före sekvenseringen. Kont% anger % av sekvenser från hund och människa togs bort som naturlig kontaminering. Alla negativa kontroller var negativa.

Provlokal	Hamn område	H2O V (L)	eDNA (ng/uL)	Inhibering	Anti-inhibition	Band Gel PCR	# PCR	kont%	Mållart kont% Miya
LF_01	Brygga 1	5	>17	Nej	Nej	Ja	12	<0,001	0
LF_02	Brygga3	5	>17	Nej	Nej	Ja	12	<0,001	0
LF_03	Brygga	4	>17	Nej	Nej	Ja	12	<0,001	0
LF_04	Nya bygge	5	>17	Nej	Nej	Ja	12	<0,001	0
LF_05	Referens	5	>17	Nej	Nej	Ja	12	<0,001	0
LF_06	Strandlinje	5	>17	Nej	Nej	Ja	12	<0,001	0
Lab neg		3	0	Nej	Nej	Nej	12	<0,001	0
Fält neg		3	0,17	Nej	Nej	Nej	12	<0,001	0

Bilaga 6: eDNA resultat. Antal läsningar per art och prov.

Tabell B6_1. Antal läsningar av arternas sekvenser. Målarternas sekvenser påträffades inte i det negativa provet (LF_NEG) vilket innebär att ingen kontaminering förekommit.

Fiskart	LF_01	LF_02	LF_03	LF_04	LF_05	LF_06	LF_NEG
Ål				390	151		
Strömning		7944					
Braxen	2450	3887	5357	2573		959	
Benlöja	14 255	23 463		1913	5467	161	
Mört		26 359		7375	23 464	5311	
Sarv						463	
Sutare				216			
Gädda	4360	1688	53 865	11 152	336	5387	
Lake	37 301	3235	461	2824	8339	2268	
Småspigg				3159		3493	
Nors		3827				133	
Gers	3001	26 254	26 775	8967	11 860	3605	
Abborre	42 370	44 961	68 487	51 489	57 564	36 907	
Gös				655	965	61	
Siklöja		283		211	159		
Lax	2878				2411		
Stensimpa				38 317	33 169	63 739	
TOTALA LÄSNINGAR	106 615	141 901	154 945	129 241	143 885	122 487	

Tabell B6_2 Arternas förekomst över lokalerna i procent. Figuren visar arternas förekomst över de olika lokalerna i procent. Abborre dominerade på alla lokaler.

Fiskart	LF_01	LF_02	LF_03	LF_04	LF_05	LF_06
Abborre	39,7	33,6	44,2	39,8	40,0	30,1
Benlöja	13,4	17,5		1,5	3,8	0,1
Braxen	2,3	2,9	3,5	2,0		0,8
Gädda	4,1	1,3	34,8	8,6	0,2	4,4
Gärs	2,8	19,6	17,3	6,9	8,2	2,9
Gös				0,5	0,7	0,05
Lake	35,0	2,4	0,3	2,2	5,8	1,9
Lax	2,7				1,7	
Mört		19,7		5,7	16,3	4,3
Nors		2,9				0,1
Sarv						0,4
Siklöja		0,2		0,2	0,1	
Småspigg				2,4		2,9
Stensimpa				29,6	23,1	52,0
Sutare				0,2		
Ål				0,3	0,1	
SUMMA	100	100	100	100	100	100

eDNA Inventering av fisk i småbåtshamnen i Lövsta

www.aquabiota.se