



Utvärdering av restaureringsåtgärder – eDNA-analys av fisk i nyanlagda våtmarker

Kommunbränslé i Ådalen AB



MIX Rapport 2025:10
MIX Research Sweden AB



MIX Research
Sweden

Utvärdering av restaureringsåtgärder – eDNA-analys av fisk i nyanlagda våtmarker

Kommunbränsle i Ådalen AB

Publicerad av:	MIX Research Sweden AB
Datum:	2025-11-12
Författare:	Viktor Birgersson, Patrick Hernvall, Micaela Hellström
Omslagsfoto:	Viktor Birgersson
Foton och illustrationer:	MIX Research Sweden
Fältarbete:	Viktor Birgersson, Patrick Hernvall
Kontaktuppgifter:	MIX Research Sweden AB Address: Uppsala Science Park, Dag Hammarskjölds väg 34A, 75237 Uppsala E-mail: info@mixresearch.se Telefon: 070-799 45 75
Etiska riktlinjer:	MIX Research Sweden arbetar objektivt och i enlighet med etablerad och standardiserad fält- och laboratoriepraxis. Vi säkerställer att all data som genereras och rapporteras är noggrant verifierad, kvalitetssäkrad och opartisk. Vi förbinder oss till att aldrig utelämna eller fabricera data i enlighet med kunders önskemål. Vår integritet och vårt engagemang för att leverera pålitliga och sanningsenliga resultat är grundläggande värderingar i vår verksamhet.
Citera som:	Birgersson, V., Hernvall, P., Hellström, M. 2025. Utvärdering av restaureringsåtgärder – eDNA-analys av fisk i nyanlagda våtmarker, Kommunbränsle i Ådalen. MIX Research SE Rapport 2025:10

SAMMANFATTNING

Miljö-DNA (eDNA) är genetiska spår som organismer lämnar i sin omgivning, exempelvis via slem, avföring eller hudceller. Genom moderna analyser kan dessa spår fångas upp för att identifiera arter i en miljö med hög precision. Metoden är särskilt välutvecklad i akvatiska system och ger en aktuell bild av arters förekomst.

MIX Research Sweden har, på uppdrag av Kommunbränsle i Ådalen AB, genomfört en eDNA-undersökning i nyanlagda våtmarker i Sollefteå kommun. Syftet var att kartlägga återkolonisering av fisk i de restaurerade våtmarkerna. Kontrollprov togs vidare i Gröningsån som har förbindelse med våtmarkerna.

Analysen visade att återkolonisering av fisk skett i samtliga våtmarker som undersöktes, där abborre och gädda dominerade på samtliga lokaler. Kontrollprover i Gröningsån visade god samstämmighet med befintligt elfiskedata på lokalerna, samtidigt som eDNA-analysen detekterade ytterligare arter som inte observerats vid tidigare inventeringar.

Undersökningen bekräftar att eDNA är ett effektivt verktyg för uppföljning av restaureringsåtgärder, där återkolonisering och förändringar i fiskfaunan kan följas över tid på ett standardiserat och reproducerbart sätt.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	3
1. Introduktion	5
2. Metoder	5
2.1 Fältarbete.....	5
2.2 Laboratoriearbete	7
2.3 DNA-analys	7
3. Resultat	8
3.1 Fiskanalys	8
3.1.1 Ärtrik-Stormyren	8
3.1.2 Norrmossaflon	8
3.1.3 Tjärnmyran	9
3.1.4 Gröningsån uppströms	9
3.1.5 Gröningsån nedströms	10
4. Diskussion	10
Referenser	12
Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser?	13
Bilaga 2. Laboratoriearbete	14
Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA-kontroller	15
Bilaga 4. Kvalitetskontrollerade resultat flerartsanalyser	16

1. INTRODUKTION

Miljö-DNA, eller eDNA (från engelskans *environmental DNA*), är ett samlingsbegrepp för de genetiska spår som alla levande organismer lämnar efter sig i sin omgivning. Dessa kan bestå av bland annat hudceller, slem, hår och andra biologiska rester (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”.

Tack vare de stora framsteg som gjorts inom genetiska analysmetoder under de senaste decennierna är det idag möjligt att samla in eDNA genom exempelvis vatten- eller jordprov och med hög precision fastställa vilka arter som finns i ett område. Metoden är särskilt välutvecklad för vattenmiljöer och har visat sig vara mycket användbar inom miljöövervakning (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 och ger därför en bild av arters förekomst i nutid (Brys m.fl. 2021). I studier har en exponentiell nedbrytningshastighet påvisats och full nedbrytning nås ofta på ett fåtal dagar. Nedbrytningshastigheten korrelerar vidare med faktorer som mikrober, enzymer och UV-strålning, vilka till stor del regleras av temperatur (Saito & Doi 2021).

Inventeringar av arter i svenska vatten har bedrivits sedan 1500-talet. Sådan kunskap är central för myndigheter vid beslut om artskydd, åtgärder och tillståndsprövningar. Traditionella inventeringsmetoder är dock ofta tids- och resurskrävande, och kan vara svåra att genomföra i stor skala. I vissa fall är de även destruktiva och kan påverka sällsynta eller hotade arter negativt. eDNA erbjuder här ett skonsamt alternativ, då metoden inte kräver att organismer fångas eller skadas. Resultaten kan även användas för att rikta traditionella undersökningar till specifika platser för mer detaljerad information om till exempel ålder, storleksfördelning och reproduktionsframgång. För att säkerställa tillförlitliga resultat krävs dock att analyser och tolkningar baseras på aktuell kunskap inom både traditionell och genetisk taxonomi, molekylära metoder och arters ekologi.

För att kartlägga återkolonisering av fisk i nyanlagda våtmarker i Sollefteå kommun har MIX Research Sweden, på uppdrag av Kommunbränsle i Ådalen AB, genomfört en eDNA-undersökning av fisk. Våtmarkerna utgörs av tidigare torvtäcker som vattenfyllets och har konnektivitet till Norr- och Sör-Gagnetsjöarna samt Gröningsån, vilket skapar goda förutsättningar för återetablering av akvatiska arter.

2. METODER

2.1 Fältarbete

Fältarbetet genomfördes den 21 augusti 2025 – totalt sex lokaler ingick i provtagningen (Figur 1; Tabell 1). Innan provtagningen påbörjades steriliserades all utrustning, och filtreringsutrustningen köptes in som sterila och DNA-fria produkter.

Vid varje lokal samlades cirka 10 liter vatten in genom att ta delprover från utloppen av respektive våtmark. Delproverna slogs samman till ett samlingsprov för att ge ett representativt resultat. Provtagningen utfördes enligt svenska och europeiska standarder för insamling av vatten för eDNA-analys (CEN 2023).



Figur 1. Översikt av provtagningslokaler och provtagningspunkter.

Tabell 1. Information om de provtagna lokalerna.

Lokalnamn	V ml	T °C H ₂ O	Djup (m)	Koordinat SWEREF 99 TM	
				Nord	Öst
Årtrik-Stormyren	1000	17	0–1	7022250	588262
Norrmossaflon	600	17	0–1	7021136	588721
Tjärnmyran	400	17,5	0–1	7018797	590332
Gammfäbodtjärnen	400	17,5	0–1	7020205	591419
Gröningsån uppströms	2000	16	0–1	7022601	588988
Gröningsån nedströms	2000	16,5	0–1	7020558	591129

Vatten filterades genom 5 µm GF/0,8 µm PES-inkapslade filterenheter. Vid varje lokal togs två prover som fixerades omedelbart efter filtrering och transporterades efter avslutat fältarbete till MIX Research Swedens laboratorier för vidare analys. För att undvika kontamination steriliserades provtagningsutrustningen mellan varje lokal.



Figur 2. Filtrering av insamlat vatten i fält.

2.2 Laboratoriearbete

Insamlat eDNA extraherades enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i MIX Research Swedens laboratorier specifikt utformade för analyser av eDNA. Samtliga prover analyserades med flerartsanalys för förekomst av fisk genom att använda markörer specifikt framtagna för att detektera denna organismgrupp. Varje PCR-prov utfördes i fyra replikat som sammanslogs till ett prov under biblioteksuppförandet och sekvenseringen. Erhållna sekvenser matchades i första hand mot den internationella databasen NCBI för att identifiera arternas förekomst.

Kompletterande information för flerartsanalyser presenteras i Bilaga 1 – 2.

2.3 DNA-analys

På en kort region av 12S-genen har fiskar unika artspecifika variationer som kan liknas vid streckkoder som identifierar olika varor i butiker, där varje enskild art 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. Detta ger en indikation på arternas relativa biomassa, eller dominans i ett område. Studier har visat en stark korrelation mellan fiskbiomassa och antalet eDNA-detektioner av respektive art (Li m.fl. 2019).

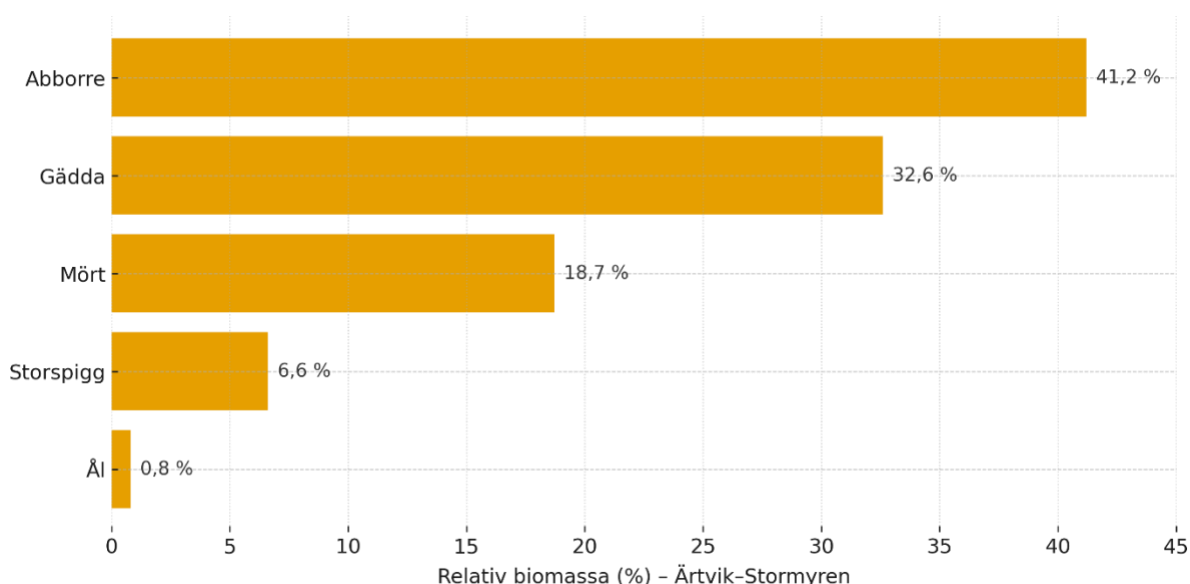
3. RESULTAT

3.1 Fiskanalys

Totalt detekterades 10 unika fisksekvenser i denna undersökning, varav samtliga kunde identifieras till artnivå. Det totala antalet detekterade artspecifika sekvenser för fiskmarkören i undersökningen var 308 572 och varierade mellan 17 983 – 69 062 per prov. Båda proven från Gammfäbodtjärnen uppvisade kraftig inhibition, och trots anti-inhibering samt rengöring misslyckades amplifiering.

3.1.1 Ärtrik-Stormyren

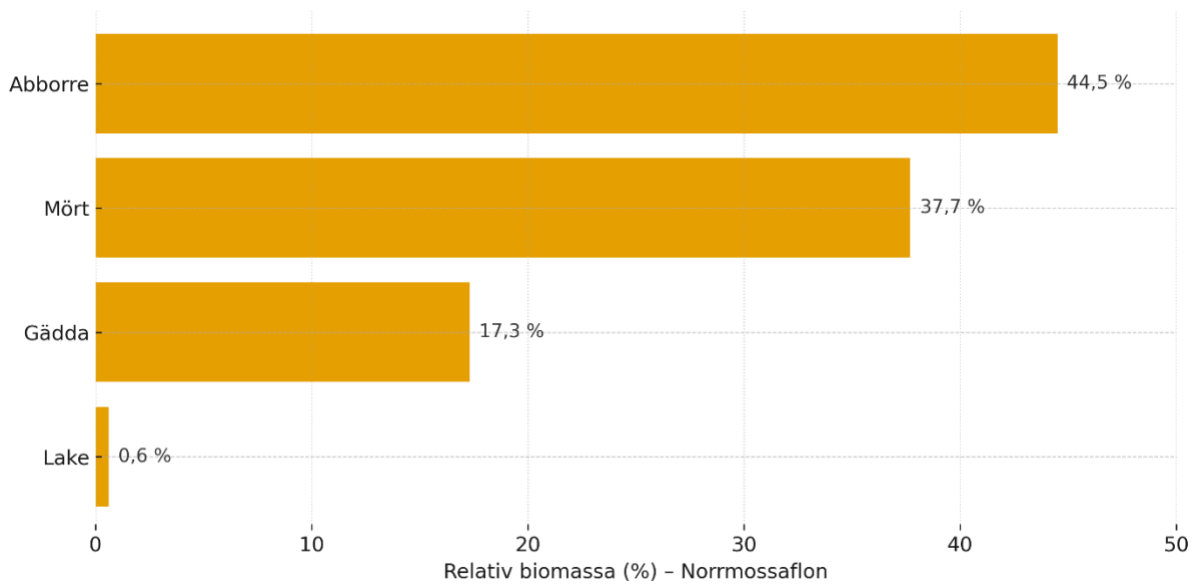
Provtagningen påvisade förekomst av totalt fem fiskarter, där abborre (*Perca fluviatilis*), gädda (*Esox lucius*) och mört (*Rutilus rutilus*) var dominerande. Tillsammans utgör arterna över 90 % av den totala relativa biomassan på lokalen. Noterbar detektion var ål (*Anguilla anguilla*) som förekom i ytterst få läsningar (Figur 3).



Figur 3. Artdetektioner samt relativ biomassa i Ärtrik-Stormyren.

3.1.2 Norrmossaflon

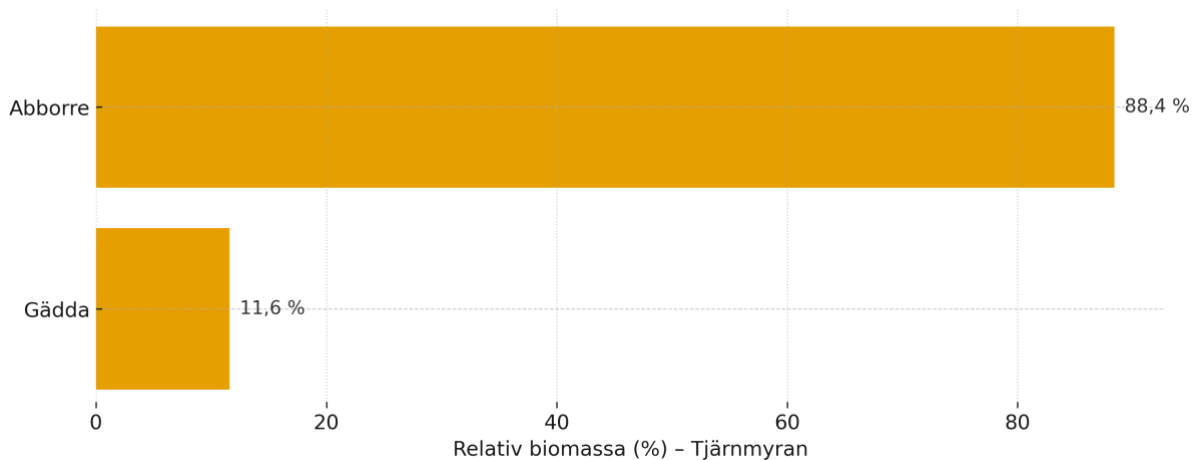
Provtagningen påvisade förekomst av totalt fyra fiskarter – där abborre, gädda och mört återigen dominerande, även här utgör arterna över 90 % av den totala relativa biomassan på lokalen. Noterbar detektion i Norrmossaflon var lake (*Lota lota*) som endast utgjorde 0,6 % av det totala antalet läsningar i provet (Figur 4).



Figur 4. Artdetektioner samt relativ biomassa i Norrmossaflon.

3.1.3 Tjärnmyran

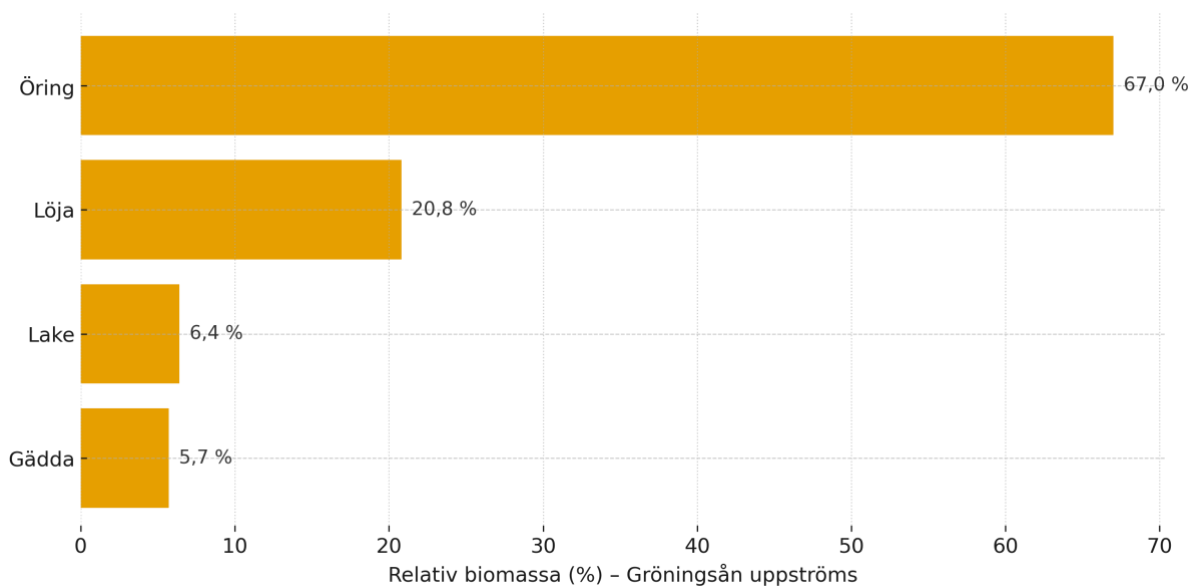
I Tjärnmyran kunde endast förekomst av abborre och gädda påvisas (Figur 5). Abborre var kraftigt dominant och utgjorde nära 90 % av den relativa biomassan.



Figur 5. Artdetektioner samt relativ biomassa i Tjärnmyran.

3.1.4 Gröningsån uppströms

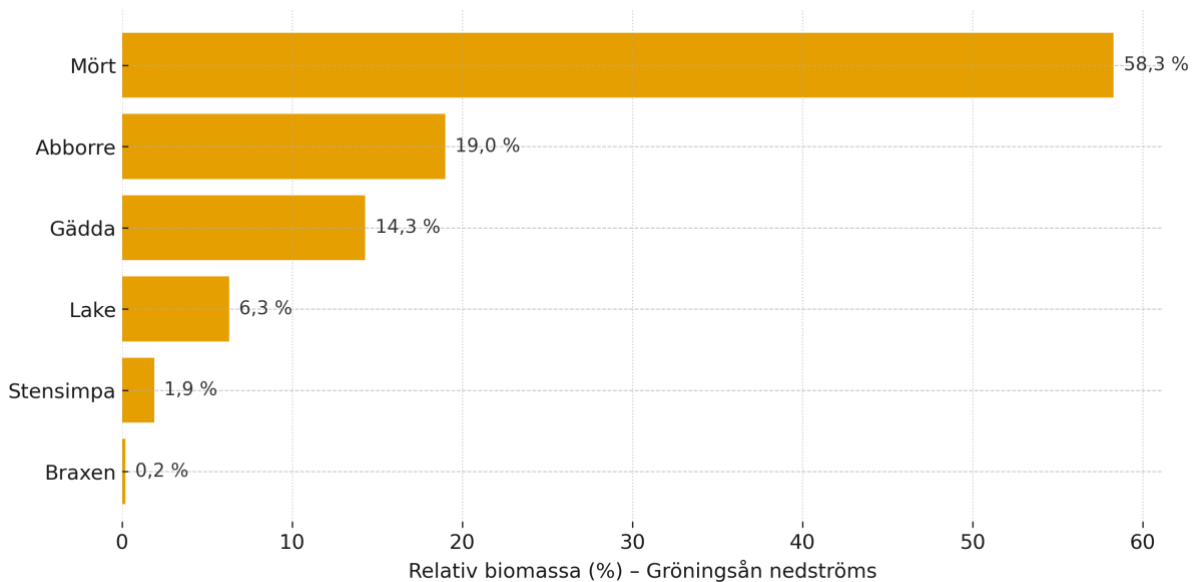
Provtagningen påvisade förekomst av totalt fyra fiskarter, där öring (*Salmo trutta*) och löja (*Alburnus alburnus*) var dominerande. Tillsammans utgör arterna omkring 90 % av den totala relativa biomassan på lokalen. Lake och gädda detekterades i lägre omfattning (Figur 6). Tidigare elfiske på lokalen observerade endast öring och lake (SERS 2021).



Figur 6. Artdetektioner samt relativ biomassa i Gröningsån uppströms.

3.1.5 Gröningsån nedströms

I Gröningsån nedströms dominerade mört, abborre och gädda artsammansättningen. Tillsammans utgör arterna över 90 % av den totala relativa biomassan på lokalen. Vidare detekterades även lake, stensimpa (*Cottus gobio*) samt braxen (*Abramis brama*) i lägre omfattning (Figur 7). Tidigare elfiske på lokalen observerade endast lake och stensimpa (SERS 2021).



Figur 7. Artdetektioner samt relativ biomassa i Gröningsån nedströms.

4. DISKUSSION

Resultaten från eDNA-analysen visar tydligt att återetablering av fisk skett i de nybildade våtmarkerna. Samtliga våtmarkslokaler uppvisade förekomst av flera fiskarter, och artsammansättningen dominerades av abborre, gädda och mört. Konnektiviteten till

Norr- och Sör-Gagnetsjöarna samt Gröningsån framstår därmed som viktiga spridningsvägar som har möjliggjort en snabb etablering av akvatiska arter i området.

Vid en jämförelse av tidigare elfiske i Gröningsån bekräftar eDNA-analysen förekomst av lake på båda lokalerna, samt endast öring uppströms och stensimpa nedströms. Vidare detekterades flertalet ytterligare arter som inte observerades vid den tidigare inventeringen. Flertalet studier har påvisat att inventeringar med eDNA ofta är effektivare än traditionella provfisken när det gäller att identifiera artdiversitet. Ofta detekteras arter som inte observeras med traditionella inventeringsmetoder (Keck m.fl. 2022; Hellström m.fl. 2023). Det är därför av stor vikt att följa noggranna protokoll och standardiserade metoder både vid provtagning och laborativt arbete för att kunna utesluta eventuella felkällor och osäkerheter som exempelvis kontaminering av prover.

Gröningsån nedströms uppvisade inslag av typiska sjöarter med en klar dominans av mört. Detta skulle delvis kunna förklaras av nedströms transport av DNA från Lillsjön eller uppströms liggande sel. Trots att nedbrytningen av DNA är snabb går det inte att utesluta att en detektion i vissa fall härrör från en annan plats. Utöver nedbrytning spelar även transport- och utspädningseffekter en avgörande roll för hur långt eDNA kan påvisas nedströms. När vattnet rör sig nedåt i systemet späds eDNA från uppströms källor ut i den ökande vattenvolymen, samtidigt som lokalt producerat eDNA kontinuerligt tillförs. Flera studier visar att eDNA-koncentrationer typiskt avtar kraftigt med avstånd från källan, ofta inom hundratals meter, till följd av kombinerade effekter av nedbrytning, sedimentation och utspädning (Jane et al. 2015; Shogren et al. 2017; Carraro et al. 2018). Detta innebär att tillförseln av eDNA från uppströms källor snabbt minskar och att signalen vid en given provpunkt i regel domineras av lokalt producerat DNA. Trots detta är transport av eDNA något som bör beaktas vid framtagande av provtagningsdesign och vid tolkning av resultat.

Provtagningen visade att vattnet på flera lokaler hade en så hög partikelhalt att filtreringen var tekniskt krävande, och i Sjömyran var filtrering inte möjlig. Detta är typiskt för unga, nyligen vattenfyllda våtmarker där sediment ännu inte stabiliserats. Den höga partikelhalten kan till viss del ha påverkat mängden insamlat DNA och begränsat detektionerna vid vissa lokaler. Det vore därför värdefullt att genomföra en uppföljande provtagning när partikelhalterna stabiliserats, vilket sannolikt skulle möjliggöra ett fullständigare provuttag och ge en ännu tydligare bild av våtmarkernas ekologiska utveckling. Att även inkludera andra organismgrupper som groddjur och insekter skulle ytterligare bidra till en mer heltäckande bild av ekosystemet.

Sammantaget visar undersökningen att restaureringsåtgärderna redan har resulterat i biologiskt aktiva våtmarker med befintlig fiskfauna. eDNA-metoden har tillhandahållit en standardiserad och reproducerbar kartläggning av återkoloniseringen och visar att våtmarkerna utvecklats till möjliga rekryterings- och spridningsmiljöer för flera fiskarter i området.

REFERENSER

- 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 i press.
- 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.
- Carraro, L., C. Stauffer, P. Ficetola, S. M. M. Stocker, & F. Altermatt. (2018). Estimating species distribution from environmental DNA transport in river networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 115(46):11724–11729.
- CEN (2023). Water quality - Sampling, capture and preservation of environmental DNA from water. EN 17805:2023 European Standard.
- 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, & 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.
- 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. (LifeDNAquatic: Riktlinjer för optimal hantering och analys av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöövervakning (naturvardsverket.se))
- Jane, S. F., T. M. Wilcox, K. S. McKelvey, M. K. Young, M. K. Schwartz, W. H. Lowe, B. H. Letcher, & A. R. Whiteley. (2015). Distance, flow, and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Freshwater Science* 34:681–692.
- Keck, F., Blackman, R. C., Bossart, R., Brantschen, J., Couton, M., Hürlemann, S., ... & Altermatt, F. (2022). Meta-analysis shows both congruence and complementarity of DNA and eDNA metabarcoding to traditional methods for biological community assessment. *Molecular Ecology*, 31(6), 1820-1835.
- 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 fishponds inferred by metabarcoding. *Environmental DNA* 1 (3): 238–250.
- 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
- Saito, T., & Doi, H. (2021). Degradation modeling of water environmental DNA: Experiments on multiple DNA sources in pond and seawater. *Environmental DNA*, 3(4), 850-860.
- Sveriges lantbruksuniversitet (SLU). (2021). Elfiskeregister (SERS). Institutionen för akvatiska resurser (SLU Aqua). Tillgänglig via: <https://www.slu.se/elfiskeregistret>
- Shogren, A. J., S. E. Tank, E. Andruszkiewicz, M. Olds, C. Jerde, & J. E. Bolster. (2017). Controls on eDNA movement in streams: Transport, retention, and resuspension. *Scientific Reports* 7:5065.
- Spens, J., A. R. Evans, ... Hellström, M. (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.



Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser?

Enartsstudier – qPCR eller ddPCR

Inventering av en enskilda art med eDNA utförs med kvantitativ PCR (qPCR) eller digital droplet PCR (ddPCR). Frågeställningen i dessa studier är enkel: "Finns art X i detta prov?"

Varje art analyseras med en specifik genetisk markör som enbart detekterar DNA från just den arten. Resultaten redovisas som närvaro eller frånvaro av den aktuella arten.






Om flera arter analyseras med separata enartsmetoder kan resultaten inte jämföras kvantitativt mellan arter (t.ex. art A vs art B), eftersom varje markör har unik effektivitet och känslighet.

Enartsanalyser har i regel kortare analysstid än flerartsanalyser och lämpar sig särskilt väl för riktade undersökningar, till exempel av hotade, invasiva eller svårupptäckta arter.

Flerartsstudier – metabarkodning med NGS (Next Generation Sequencing)

I flerartsstudier ställs istället frågan: "Vilka arter finns i provet – och hur vanligt förekommande är de?" Till skillnad från enartsanalyser kräver denna metod inte att man i förväg vet vilka arter man letar efter. Genom metabarkodning och sekvensering med NGS kan ett mycket stort antal arter detekteras samtidigt – inklusive sällsynta, skygga eller invasiva arter som ofta undgår traditionella inventeringsmetoder. Antalet arter som kan identifieras är i praktiken obegränsat. Vid inventering av tre eller fler arter blir metabarkodning vanligen mer kostnadseffektiv än separata enartsanalyser, eftersom flera målarter analyseras parallellt i samma process.

Även om analysstiden är längre genererar metoden omfattande och informationsrika dataset, vilket möjliggör helt nya typer av ekologiska analyser och storskaliga jämförelser – något som tidigare inte var möjligt före eDNA-metabarkodning. Jämförelser mellan data från enarts- och flerartsanalyser illustreras i Figur B1-1.

Enartsanalys - Barkodning	 CGCCGCGGTTATACGAGA	Ja/Nej	
			<u>Artlista</u> <u>Dominans</u>
	CGCCGCGGTTATACGAGA	OTU 1	Match →  10 %
Flerartsanalys - Metabarkodning	CACCGCGGTTATACGAGA	OTU 2	Match →  65 %
	CGCCGCGGTTACACCACT	OTU 3	Match →  5 %
	CGCCGCGGCTACACCGTG	OTU 4	Match →  20 %

Figur B1-1. 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 extraherades enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA.

Flerartsanalyser

För flerartsanalyser av fisk användes markörer som amplifierar 12S rRNA-genen (Miya m.fl. 2015). Varje PCR-prov utfördes i fyra 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

Sekvenseringsdatan genomgick en kvalitetskontroll och bearbetning enligt en ASV-baserad analysmetodik (Amplicon Sequence Variant) med hjälp av DADA2-paketet i R (Callahan m.fl. 2016). Rådata trimmades, filterades och felmodeller beräknades för att särskilja verkliga biologiska sekvenser från sekvenseringsfel. Därefter sammanfogades parvisa läsningar, chimeroer togs bort och unika sekvenser identifierades som enskilda ASVs. Resultatet är en högupplöst representation av den genetiska sammansättningen i varje prov, där varje ASV motsvarar en potentiell artsekvens.

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 581 000 kända arter finns tillgängliga med 4,7 miljarder sekvenser och 34 biljoner 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 kurerad (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 abundans) av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov.

Referenser

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583.
- 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., 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-undersökningar är användning av både positiva och negativa kontroller absolut nödvändig för att upptäcka och utesluta kontamineringar eller andra felkällor. Detta är en grundläggande princip för alla DNA-analyser och gäller samtliga utförare. Om en aktör avviker från denna praxis blir resultaten inte tillförlitliga och därmed vetenskapligt oanvändbara.

Utöver de allmänna huvudprinciperna för DNA-undersökningar (Goldberg m.fl. 2016; Griffiths m.fl. 2016) finns särskilda regelverk för kriminaltekniska (Hedman m.fl. 2017) och medicinska (SFMG, 2011) analyser. Strikta riktlinjer för ett standardiserat genomförande av eDNA-undersökningar håller för närvarande på att tas fram inom EU genom COST-aktionen DNAquaNet.

Negativ kontroll

En negativ kontroll utgörs av ett prov med DNA-fritt vatten (t.ex. nukleasfritt vatten avsett för molekylära analyser eller kolsyrat mineralvatten) som hanteras på samma sätt som de ordinarie vattenproverna i fält. Negativa kontroller bör införas i varje steg av arbetsflödet – från provtagning till slutlig sekvensering – för att säkerställa att ingen kontaminering har skett. Dessa kontroller analyseras för att utesluta falska positiva resultat.

Om DNA-sigener från målartrupper påträffas i en negativ kontroll måste källan till kontamineringen identifieras och dess konsekvenser bedömas. Om orsaken inte kan fastställas krävs att analysen upprepas. En kontaminerad negativ kontroll kan i praktiken leda till att arter detekteras i en miljö där de inte förekommer (falskt positivt resultat).

Positiv kontroll

En positiv kontroll består av ett prov som innehåller ett känt DNA-material och används för att verifiera att analysmetodiken fungerar korrekt. Om DNA-sigener uteblir i den positiva kontrollen tyder det på ett metodfel, vilket innebär att analysen måste justeras och göras om. En utebliven DNA-signal i en positiv kontroll kan i praktiken innebära att arter som faktiskt finns i en miljö inte detekteras (falskt negativt resultat).

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. Kvalitetskontrollerade resultat flerartsanalyser

Värden för kontrollerna anges i Tabell B4-1. Alla negativa kontroller var negativa för målarter. DNA-koncentrationerna var normala. 12S-markören för fisk resulterade i 308 572 målartsläsningar. Sekvenser för får ko, hund och kyckling togs bort från analysen eftersom de utgör kontamineringar som kan härledas både från innehållet i reagenser och miljön.

Tabell B4-1. Kvalitetsgranskning av eDNA och kontroller. eDNA-koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific). FNEG: negativ fältkontroll, NTC: no template PCR kontroll.

Prov	Anti-inhibition	DNA konc ng/ μ l	Markör	Replikat	Antal målartsläsningar
ÖEN_01	Ja	4,8	12S	4	17 983
ÖEN_02	Ja	1,66	12S	4	69 062
ÖEN_03	Ja	11,2	12S	4	32 757
ÖEN_04	Ja	8,29	12S	4	20 121
ÖEN_05	Ja	6,77	12S	4	30 086
ÖEN_06	Ja	7	12S	4	25 682
ÖEN_07	Ja	1,26	12S	4	23 666
ÖEN_08	Ja	1	12S	4	48 791
ÖEN_09	Ja	3,63	12S	4	20 659
ÖEN_10	Ja	4,83	12S	4	19 765
ÖEN_FNEG	-	-	12S	4	0
NTC	-	-	12S	4	0