

Inventering av fiskarter med eDNA analys i Moälven. Fiskförekomst och indikatorer för förorening

Micaela Hellström, Johan Spens, Patrick Hernvall &
Viktor Birgersson



MIX Research
Sweden

LIMNORDIC AB

Inventering av fiskarter med eDNA analys i Moälven.

Fiskförekomst och indikatorer för föroreningar.

Utgiven av:	MIX Research Sweden AB & Limnordic AB
Datum:	2025-11-25
Uppdragsgivare:	Örnsköldsviks kommun, Moälvsfisket
Författare:	Micaela Hellström, Johan Spens, Patrick Hernvall, & Viktor Birgersson
Granskare:	Författarna samt uppdragsgivarna
Omslagsbild	Provtagning i Galtbäcken. MIX Research Sweden AB
Foton:	MIX Research Sweden AB
Fältarbete	Micaela Hellström, Liselott Hellström, Johan Spens
Laboratoriearbete:	Micaela Hellström, Patrick Hernvall, Viktor Birgersson
Uppdraget utfördes av:	MIX Research Sweden AB Adress: Uppsala Science Park, Dag Hammarskjölds väg 34A, 75237 Uppsala E-post: info@mixresearch.se Telefon: 070-782 03 10 LIMNORDIC AB Järvedsvägen 41B, 891 77 Järved, Örnsköldsvik Johan.spens@gmail.com Telefon: 076 -12 72 112
Rapporten citeras som:	Hellström, M., Spens, J., Hernvall, P. & V. Birgersson. 2025. Inventering av fiskarter med eDNA i Moälven. Fiskförekomst och indikatorer för förorening. MIX Research 2025:08/Limnordic 2025:01
Etiska riktlinjer:	MIX Research Sweden Ab och Limnordic AB 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.



MIX Research
Sweden

LIMNORDIC AB

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 bland annat 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 som dessa och har visat sig vara användbart inom miljöövervakning. eDNA är vidare relativt kortlivat i vattenmassan och ger därför en bild av arters förekomst i nutid.

Örnsköldsvik kommun och Moälvsfisket har i decennier varit aktiv med att följa upp och observera förändringar av fiskartssammansättning och förändringar i Moälven. Observationer av fiskförekomster och förändringar i artsammansättningar är viktiga som dataunderlag för att på ett hållbart sätt planera sportfisket samt för att åtgärda kemisk och fysisk inverkan från mänskliga aktiviteter som påverkar miljön.

Denna undersökning är en del av inventeringsuppdraget. Flerartsanalyser med hjälp av akvatiskt eDNA (från engelskans environmental DNA) utfördes för fisk (13 lokaler), och flodpärlmussla och flodkräfta på två lokaler.

Artdetektioner baserade på eDNA identifierade 18 unika fiskarter. Flodpärlmusslan hittades på kontroll-lokalen i Moliden men inte på den undersökta lokalen. Flodkräfta registrerades inte vilket kan bero att provtagningen skedde efter ömsningen av skal.

Resultaten i rapporten fungerar som underlag för framtida skydds- och åtgärdsprogram för att uppnå miljömålen inom "Levande sjöar och vattendrag" och "Biologisk mångfald" i nära samarbete med uppdragsgivarna, länsstyrelsen och kommunen.

Innehållsförteckning

Sammanfattning	4
1 Inledning	6
2 Metoder	8
2.1 Fältarbete	8
2.2 Laboratoriearbete	9
2.3 Analyser, verifiering och miljödata	9
3 Resultat och slutsats	10
3.1 Enartsanalys av flodkräfta och flodpärlmussla	10
3.2 Fiskförekomst. Flerartsanalys och sekvenseringsresultat.....	10
3.2.1 Jämförelse mellan eDNA och provfisken	12
3.3 Vattenkemi under året 2025	13
3.4 Svar på frågor i denna undersökning	13
4 Tack	14
5 Referenser.....	14
Bilaga 1. Vad menas med en och flerartsanalyser?	16
Bilaga 2. Laboratorieanalyser	17
Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA - kontroller	18
Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas	19
Bilaga 5: qPCR resultat och kontroller.....	20
Bilaga 6: Fördelning av artläsningar inom lokalerna	21

1 INLEDNING

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

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 eller åtgärder och tillståndsprövningar angående infrastruktur. Traditionella artinventeringar kan vara både tids- och resurskrävande vilket ofta gör storskaliga undersökningar av arters utbredning och förekomster ogenomförbara. Vidare är många provtagningsmetoder destruktiva vilket kan påverka sällsynta och hotade arter negativt. Eftersom eDNA-metoden är en icke-dödande metod är den idealisk för kartläggning av biologisk mångfald. Informationen kan sedan användas för att lokalisera områden som kräver traditionella metoder för vidare undersökningar av habitat och arter gällande ålder, storleksfördelning och reproduktionsframgång. En korrekt analys och tolkning av eDNA resultat kräver kontinuerlig uppdatering av traditionell och genetisk taxonomi, molekylära metoder samt ekologiska kunskaper och information på hur fysiska och kemiska faktorer påverkar arters utbredning.

eDNA har visat sig vara en effektiv metod då det gäller att inventera stora mängder arter på kort tid, vilket ofta kan ge en mer precis bild av artsammansättningen på en lokal jämfört med andra metoder. Vidare är inventeringar på ett större antal lokaler och större geografisk skala möjlig, eftersom provtagningen i fält kräver mindre tid än traditionella metoder. En organism behöver inte fastna i ett nät eller upptäckas av en kamera för att detekteras.

MIX Research och Limnordic AB har på uppdrag av Örnsköldsviks kommun och Moälvsfisket undersökt 13 lokaler i Moälven för fiskförekomst (med fokus på indikatorarter). Alla 13 lokaler undersöktes för fiskförekomst och två lokaler analyserades för förekomst av flodkräfta och flodpärlmussla. Resultaten i rapporten fungerar som underlag för framtida skydds- och åtgärdsprogram för att uppnå miljömålen inom ”Levande sjöar och vattendrag” och ”Biologisk mångfald” i nära samarbete med uppdragsgivarna, länsstyrelsen och kommunen.

Uppdraget var en uppföljning på en rapport i Moälven från 2021 (Hellström & Spens 2021) och följande frågor presenterades

1. Har lax ökat/minskat i Moliden på 3 år? Omtag eDNA-prov Moliden 7030130-1635050?

2. Har lax ökat/minskat i Anundsjön på 3 år? Omtag eDNAprov Anundsjöns utlopp 7038293-1623731.?
3. Har lax ökat/minskat i Utterån? Omtag eDNAprov Nordsjöänget 7058730-1621720.
4. Hur långt har lax nykoloniserat Utterån? eDNAprov Almslått 7063674-1617548.
5. Hur långt har lax koloniserat i Forsån/Härktjärnsbäcken? eDNAprov Forsån 7037575-163106x.
7. Har havsöring nykoloniserat Galtbäcken? Stor havsöring-utsättning har skett i Galtbäcken men har aldrig följts upp. eDNAprov Galtbäcken 7035475-1634286.
8. Vilka arter finns i Kvarnbäcken? eDNAprov Kvarnbäcken 7054080-1624543.
9. Finns kräftor eDNAprov i Billstasundet 7026459-1636700 och i Bredbyn.
10. Finns flodpärlmussla i Moälven eDNAprov uppströms Fanbyviken 7040052-1615773?



Provtagning i Kvarnbäcken.

2 METODER

Metoderna från planering till beslut visas i flödesdiagrammet Figur B1 (Bilaga 1)

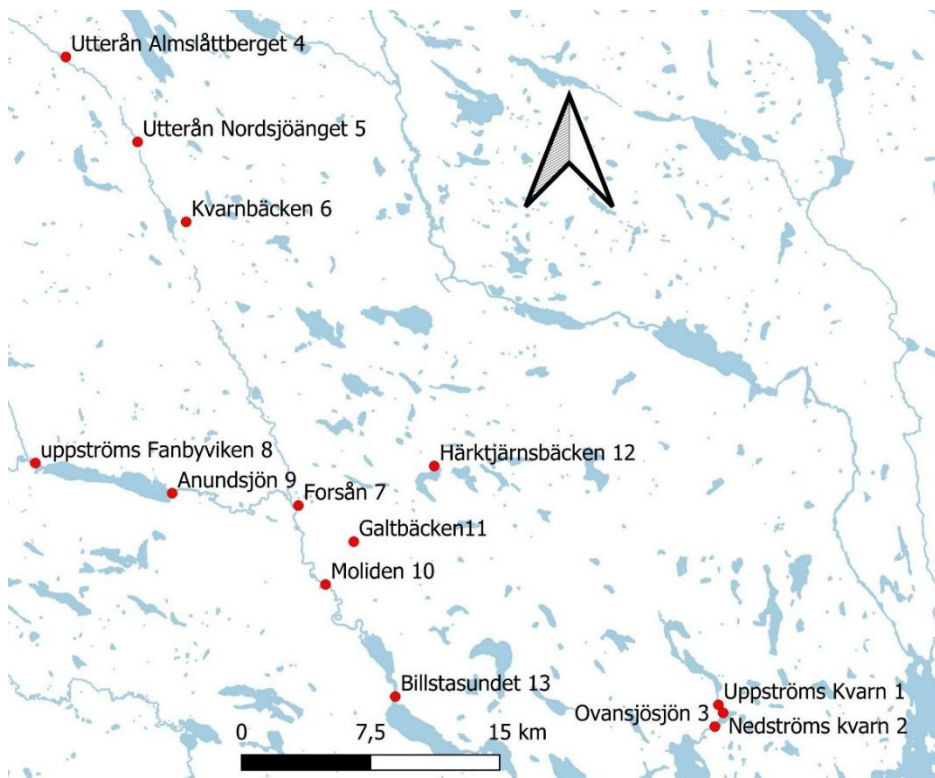
2.1 FÄLTARBETE

Under planeringsstadiet valde kommunen och Moälvsfisket i samråd med Limnordic ut 10 provtagningspunkter i Moälvens avrinningsområde, samt ytterligare 3 provpunkter i Idbyån i Västernorrlands län. Fältarbetet utfördes 6 - 7 augusti 2025 (Tabell 1, Figur 1). Innan eDNA-provtagningen genomfördes steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila och DNA-fria produkter. Vid varje insamlingsområde togs två separata prover. För varje prov samlades fem liter vatten in i form av delprover längs 200 m till 1000 m långa transekter som slogs ihop till ett samlingsprov för ett representativt resultat (Harper m.fl. 2018 a; b, Bruce m.fl. 2021, Hellström m.fl. 2023). Provtagningen följde CEN-standarden för insamling av eDNA (CEN 2023).

Redan i fält filtrerades 1–3 liter vatten med en peristaltisk fältpump (Burkle GMBH) genom 4 µm GF/0,8 µm PES-inkapslade filterenheter (MIX Research AB). Filtren tömdes på vatten och fixerades med 96 % Molekylär Grad 200 proof etanol (ThermoFisher Scientific, UK). Vattenprovtagaren steriliserades mellan lokalerna med Virkon S (Pharma Maxim), övrig utrustning var försteriliserad i engångsförpackningar. Tiden mellan insamling, filtrering och fixering var maximum 40 minuter. De fixerade proven - med minst 2 års hållbarhet i rumstemperatur (Hellström m.fl. 2023) - transporterades till MIX Research's laboratorier för vidare analys..

Tabell 1. Information om insamlade prover i fält; lokal-, provnamn, insamlingsdatum, målarter, total volym filtrerat vatten, vattentemperatur, samt position av transekternas mittpunkt (RT90, WGS 84).

Nr	Lokal	Datum	Fisk	Kräfta	FPM	V ml	TC H ₂ O	Lat RT90 N	Long RT90 W	WGS 84 Lat	WGS 84 Long
MO25_01	Bryngån (Uppströms Kvarn)	2025_08_06	x			1000	17,2	7025985	1655486	63.309246	18.907170
MO25_02	Bryngån (Nedströms kvarn)	2025-08-06	x			1000	17,7	7025515	1655760	63.304917	18.912173
MO25_03	Ovansjösjön	2025_08_06	x			800	18.0	7024714	1655278	63.297950	18.901804
MO25_04	Utterån (Älmslåtberget)	2025-08-06	x			900	18.0	7063674	1617548	63.661515	18.178999
MO25_05	Utterån (Nordsjöänget)	2025_08_06	x			800	18.0	7058730	1621720	63.615791	18.259337
MO25_06	Kvarnbäcken	2025-08-06	x			400	18.0	7054080	1624543	63.573134	18.312523
MO25_07	Forsån	2025_08_06	x			800	18.0	7037575	1631065	63.422872	18.430063
MO25_08	Moälven (uppströms Fanbyviken)	2025-08-06	x	x	x	400	18.0	7040052	1615773	63.450365	18.125901
MO25_09	Anundsjön	2025_08_06	x			1500	18.0	7038293	1623731	63.431926	18.283898
MO25_10	Moälven (Moliden)	2025-08-06	x			700	18.0	7032983	1632647	63.381137	18.457905
MO25_11	Galtbäcken	2025_08_06	x			250	18.0	7035475	1634286	63.402856	18.492729
MO25_12	Härktjärnsbäcken	2025-08-07	x		x	1900	18.0	7039871	1638965	63.440457	18.590070
MO25_13	Moälven (Billstasundet)	2025_08_07	x	x		700	19.0	7026472	1636700	63.321292	18.531884



Figur 1. Karta över provtagningsområdet samt utsatta provpunkter. Se tabell 1 för detaljerad information).

2.2 LABORATORIEARBETE

Insamlat eDNA extraherades enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i MIX laboratorier i Uppsala specifikt byggda för analyser av eDNA. Samtliga prover analyserades med flerartsanalyser för fisk (Bilaga 1-3) Kräftor och musslor analyserades med qPCR enartsanalys En Taq-Man probe (sökfragment) användes för att försäkra att inga närbesläktade arter detekterades. Laboratorieanalyserna förklaras i bilaga 1. Protokollen anges i bilaga 2, bilaga 3 och 4 anger kontroller och skallkrav.

Bioinformatiken för flerartsanalys av fisk beskrivs i bilaga B.2.3 (anger relativ biomassa från mest till minst dominerande art). Antalet läsningar i ett prov ger en uppfattning om den relativa förekomsten av arten vid en punkt. Kvalitetskontroller samt skallkraven beskrivs i bilaga 3 och 4. Vidare kontrollerades sekvenserna huvudsakligen mot NCBI:s databas samt mot en intern referensdatabas. Resultaten jämfördes även med andra eDNA rapporter och sekvenserna som kan ge upphov till olika resultat undersöktes noggrant för att nå verklighetsbaserade resultat.

2.3 ANALYSER, VERIFIERING OCH MILJÖDATA

På två lokaler jämfördes registrerad fiskförekomst mellan eDNA prover tagna för detta uppdrag under en tidpunkt, och tillgängligt historiskt provfiskedata från elfiskedatabasen SERS som upprätthålls av Sveriges lantbruksuniversitet (SERS 2025) och information från länsstyrelsen i Västernorrland och Örnsköldsviks kommun. Närvaro av arter från eDNA verifierades förutom genom elfiskedata även med uppdragsgivarna och länsstyrelsen.

3 RESULTAT OCH SLUTSATS

3.1 ENARTSANALYS AV FLODKRÄFTA OCH FLODPÄRLMUSSLA

Flodpärlmussla påträffades i Moliden men inte i Moälven ovan Fanbyviken. Flodkräfta påträffades inte i Moälven vid Billstasundet eller ovan Fanbyviken. Proverna togs ovanför reningsverket och flodkräftor har påträffats längre ner i systemet. Alla positiva och negativa kontroller gav utslag som väntat.

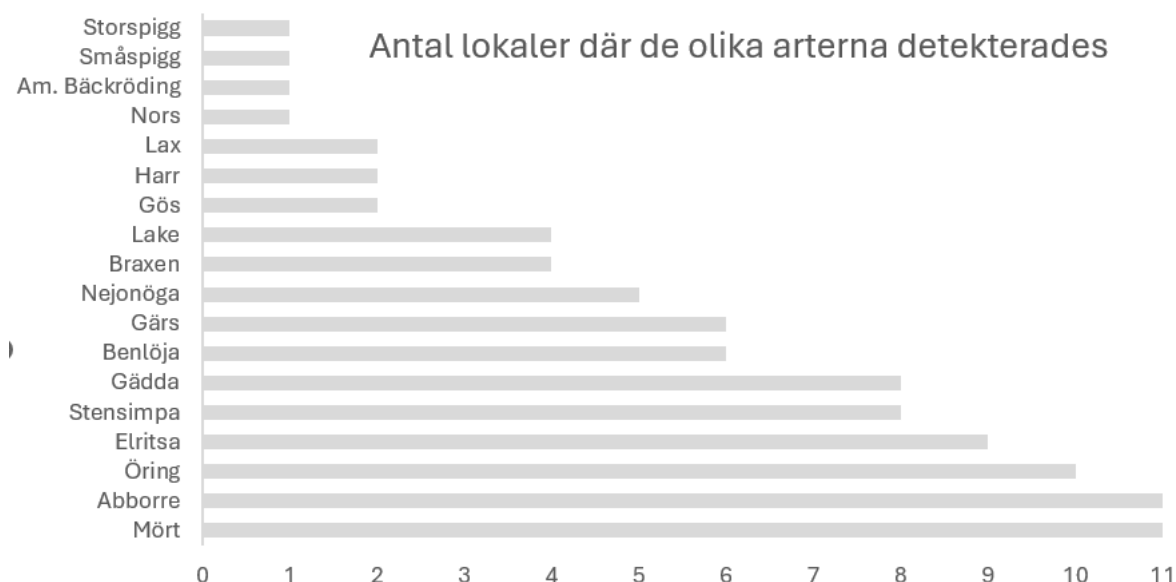
3.2 FISKFÖREKOMST. FLERARTSANALYS OCH SEKVENSERINGSRESULTAT

eDNA flerartsanalyser registrerade 18 unika sekvenser på artnivå. Resultaten och kvalitetskontrollerna samt skallkraven beskrivs i bilaga 3 och 4 och redovisas i bilaga 5. Totalantal läsningar och fullständiga artlistor beskrivs i bilaga 6.

Fiskmarkörerna detekterade 18 fiskarter. Fiskarnas förekomst över lokalerna visas i figur 2. Tabell 2 anger vilka arter som var närvarande på de olika lokalerna som visade 1-11 arter per lokal. Största antalet arter detekterades i Moälven Ö med 11 arter per prov. Härktjärnsbäcken visade mycket lågt antal läsningar.

Sekvenserna för bäck- och flodnejonöga är identiska. Enligt vissa forskare kan dessa två reproducera sig med varandra och diskussioner pågår om dessa är en och samma art eller inte (Beamish 1980, De Cashan m. fl. 2020). Arten annoteras som nejonöga i denna analys.

Artdetektioner som orsakats av så kallade. "tagjumps" här (falska positiva) uteslöts från analyserna.



Figur 2. Arternas förekomst över lokalerna n/13

Tabell 2. Fiskarterna som detekterades på de undersökta lokalerna. Total antal fiskarter detekterade med eDNA anges för varje lokal. Närvaro anges med "X". Färgerna på texten och i första kolumnen anger vilka familjer fiskarna hör till (mörkgrått = spiggar, röd = laxfiskar, mörkorange = laxfiskar, brandgul = nors, mörkgrön = gädda, ljusgrön = abborrfiskar, brun = torskfiskar, blå = karpfiskar, violett = simpor, svart = nejonöga).

ART	Bryngån (Uppströms Kvarn)	Bryngån (Nedströms kvarn)	Ovansjösjön	Moälven (uppstr. Fanbyviken)	Moälven (Moliden)	Moälven (Billstasundet)	Utterån (Almslåtberget)	Utterån (Nordsjöäng)	Anundsjön	Forsån	Galtbäcken	Härtljånsbäcken	Kvarnbäcken
Småspigg						X							
Storspigg										X			
Lax					X		X						
Öring		X		X	X	X	X			X	X	X	X
Am. Bäckröding													X
Harr					X					X			
Nors			X										
Gädda	X	X	X	X		X	X		X	X			
Abborre	X	X	X	X	X	X		X	X	X		X	X
Gös						X		X					
Gärs	X	X	X		X	X			X				
Lake		X								X		X	X
Mört	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X
Benlöja	X	X	X	X	X				X				
Braxen				X	X	X			X				
Elritsa	X	X	X		X	X	X	X	X	X			
Stensimpa	X	X	X	X	X		X	X		X			
Nejonöga					X			X	X	X			X
Totalt # Arter	7	9	8	7	11	9	5	7	9	10	1	3	6

Arternas spridning i Moälven på de undersökta lokalerna visar att småspigg och bäckröding var närvarande på 1 lokal medan abborre hittades på 11 lokaler (figur 2).

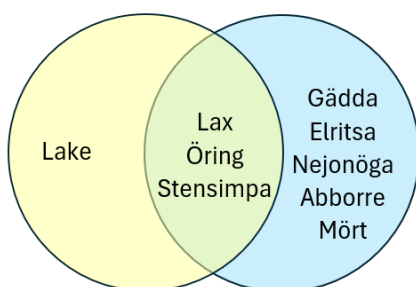
Arternas dominans i förhållande till varandra beskrivs i figur 3. Varje kolumn är en namngiven lokal och cirkelarna i bubbeldiagrammet anger hur många procent av DNA läsningar av de olika arterna förekommer i ett prov. Cirkelarna ökar i storlek ju mer en sekvens av en art påträffas. Detta ger en procentuell överblick av mer och mindre vanliga arter och visar även hur arterna dominerar i olika delar av systemet. Antalet läsningar per art ger en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov (Li m.fl. 2019, Di Muri m.fl. 2020) Exakta antalet läsningar ges i bilaga 6. Detta ger en procentuell överblick av mer och mindre vanliga arter och visar även hur arterna dominerar i olika delar av systemet.



Figur 3. Bubbeldiagram som visar dominansförhållanden av arter inom de 13 olika lokalerna (kolumner). Varje kolumn summeras upp till 100% och ger en uppfattning om arter med högre och lägre biomassa. Totala antalet råläsningar finns i bilaga 6. Färgerna på texten och i första kolumnen anger vilka familjer fiskarna hör till (mörkgrått = spigg, rött = laxfiskar, mörkorange = laxfiskar, brandgul = nors, mörkgrön = gädda, ljusgrön = abborrfiskar, brun = torskfiskar, blå = karpfiskar, violett = simpor, svart = nejonöga). Simpor räknas ej med då deras innehållande mjölke riskerar motverka en korrekt analys.

3.2.1 Jämförelse mellan eDNA och provfisk

Antal arter som upptäckts genom 3 utfisken med elfiske 2025 sammanslogs och jämfördes med eDNA läsningar av fisk i Utterån från två eDNA prov 2025. Stapeldiagrammet i figur 4 visar jämförelsen där provfiskens i SERS rapporterar sammanlagt 4 arter. Detta kan jämföras med ett eDNA prov 2025 som detekterade 8 arter baserat på 1,7 liter filtrerat vatten.



Figur 4. Venn-diagram som jämför detektion av fiskförekomst mellan elfiske och eDNA i Utterån 2025. Elfiskedata är taget från SERS lokal 7061136–1620272 (brandgul cirkel). Den blå cirkel anger arter som detekterades under eDNA provtagningen i denna undersökning. Det gröna fältet anger arter som detekterades med båda metoderna.

Flera studier världen över visar att eDNA är ett effektivt verktyg för att detektera artmångfald, och även arter som är sällsynta och svårångade registreras. Traditionella elfisken är inriktade

på att följa upp lax, öring och stensimpa och figur 4 visar att dessa arter fångas i elfiske. Elfiske som verktyg kan bestämma storlek och åldersklass, men är inte en lämplig metod då den biologiska mångfalden skall undersökas. Detta överensstämmer med publicerade eDNA-studier som jämför eDNA och provfisken (Hellström m.fl. 2023).

Hellström m. fl. 2023 visade att ett eDNA prov per lokal (där ett prov tas som flera underprover) ger en 97% säkerhet av fiskarter som förekommer mera än 5% och 54 % detektionssäkerhet av ovanliga målarter (arter <1%), två prover per lokal i liknande förhållanden höjer detektionssäkerheten till 80% av ovanliga arter.

3.3 VATTENKEMI UNDER ÅRET 2025

Länsstyrelsen i Härnösand har tagit vattenkemiprover under hela året. Situationen (pH) för lax, flodpärlmussla och flodkräfta har inte förbättrats, snarare blivit sämre. Nedströms Selstadammet hade Norra Anundsjöans pH-värde sjunkit ned till pH 5,5 under september 2025. Varken lax, flodpärlmussla eller flodkräfta reproducerar sig med denna vattenkvalitet enligt Havs- och Vattenmyndighetens statusklassning av god (Degerman 2015). Uppströms kalkdoseraren i Utterån hade pH sjunkit ned till pH 5,48 i september vilket kan vara en del av förklaringen till att lax inte koloniserar högre upp i Utterån (se eDNA Almslåtberget). Även S. Anundsjöån uppströms Myckelgensjösjön hade sjunkit till oroväckande pH 5,7 vilket inte är ett godtagbart pH för känsliga organismer. pH-målen inom kalkningsverksamheten baseras på förekomst eller tidigare förekomst av känsliga arter (Naturvårdsverket 2010). Gällande pH-mål är 6,2 för vattendrag med flodpärlmussla, 6,0 för vattendrag med lax och flodkräfta samt 5,6 för övriga vatten. pH-målen får inte underskridas någon gång under året (Degerman 2015).

3.4 SVAR PÅ FRÅGOR I DENNA UNDERSÖKNING

- Lax har inte ökat i N. Anundsjöån sett ifrån provet i Moälven uppströms Fanbyviken eller Anundsjön där ingen lax nu detekterades. Senare har dock lax vandrat förbi fisktrappen vid Kubbe-dammen i N. Anundsjöån.
- I Moälven vid Moliden bestod 8% av fisken av lax vilket är högre värde på eDNA än tidigare år. Tidigare eDNA-prov togs i Juni medan detta eDNA-prov togs i Augusti vilket är förväntat högre då laxen vandrar upp under sommaren-hösten.
- I Utterån vid Nordsjöänget syns lax-eDNA ökat till 4% av hela fiskbeståndet, men är förväntat högre p g av laxuppvandringen under sommaren-hösten.
- Laxen tycks dock inte kolonisera den övre delen av Utterån då ingen lax detekterades vid Almslåtberget. Här mäts pH till 5,48 under september 2025 vilket är för lågt för att lax ska trivas optimalt.
- Lax koloniserar inte Forsån/Härktjärnsbäcken då lax ej detekterades där.
- Havsöring har återkoloniserat Galtbäcken. Stor havsöring-utsättning har skett i Galtbäcken och aldrig uppföljts förrän nu. Lyckad nyetablering (introduktion) av öring detekterades med eDNA. Andra arter räknades inte med här p g av misstankar om "tagjumps" (falska positiva).

- Öring, bäckröding, lake, nejonöga är etablerade i Kvarnbäcken. Sannolikt vandrar mört och abborre upp i Kvarnbäcken från Uttersjön.
- Varken kräftor eller flodpärlmussla kunde detekteras med eDNAprov i Moälven vid Billstasundet 7026459-1636700 eller uppströms Fanbyviken i Bredbyn. Flodpärlmussla detekterades vid Moliden (positiv kontroll).

4 TACK

Tack till Moälvsfisket och Örnsköldsviks kommun för ett fantastiskt engagemang. Tack till Liselott Rasmussen för hjälp med fältprovtagning.

5 REFERENSER

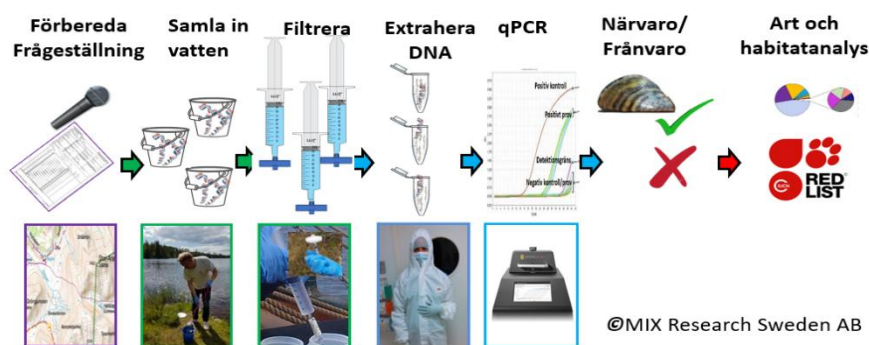
- Beamish, R. J. 1980. Adult biology of the river lamprey (*Lampetra ayresi*) and the Pacific lamprey (*Lampetra tridentate*) from the Pacific coast of Canada. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 37(11), 1906–1923.
- Bruce, K. Bourlat, S. Blackmann, R., Hellström, M., m.fl. & Deiner, 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.
- CEN. 2023. Standard: Water quality — Collecting and preserving water samples for capture of environmental DNA in aquatic environments (2023). N12 CEN-TC230-WG28. Publicerad 15 mars 2023. <https://www.sis.se/api/document/preview/80041747/>
- 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.
- De Cahsan, B., Nagel, R., Schedina, I. M., King, J. J., Bianco, P. G., Tiedemann, R., & Ketmaier, V. (2020). Phylogeography of the European brook lamprey (*Lampetra planeri*) and the European river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) species pair based on mitochondrial data. Journal of fish biology, 96(4), 905-912.
- Di Muri C, Lawson Handley L, Bean CW, Li J, Peirson G, Sellers GS, Walsh K, Watson HV, Winfield IJ, Hänfling B (2020) Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. Metabarcoding and Metagenomics 4: e56959
- Harper, L. R., Buxton, A. S., Rees, H. C., Bruce, K., Brys, R., Halfmaerten, D., ... & Priestley, V. 2018 a. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. Hydrobiologia, 1-17.
- Harper, L. R., Lawson Handley, L., Hahn, C., Boonham, N., Rees, H. C., Gough, K. C., ... & Hänfling, B. 2018 b. Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*). Ecology and evolution, 8(12), 6330-6341.

- Degerman, E. 2015 Effekter av kalkning på fisk i rinnande vatten Havs- och vattenmyndighetens rapport 2015:23).
- 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 maj 2023.
- Hellström, M & Spens J. 2021. Inventering av fiskarter med eDNA i Moälven. Fiskförekomst och indikatorarter för förorening. MIX Research 2021:07
- Kačergytė, I., Petersson, E., Arlt, D., Hellström, M., Knape, J., Spens, J., Żmihorski, 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.
- 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.
- Mauvisseau, Q., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Burian, A., & Brys, R. (2021). Effects of preservation strategies on environmental DNA detection and quantification using ddPCR. *Environmental DNA*, 3(4), 815-822.
- 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.
- Naturvårdsverket, 2010. Bedömningsgrunder för sjöar och vattendrag. Bilaga A till Handbok 2007:4.
- 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
- Riaz T, Shehzad W, Viari A, Pompanon F, Taberlet P, et al. (2011) ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 39: e145.
- SERS. 2021. Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Institutionen för akvatiska resurser. <http://www.slu.se/elfiskeregistret>
- Spens, J., A. R. Evans, ... M. Hellström. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793

BILAGA 1. VAD MENAS MED EN OCH FLERARTSANALYSER?

B1.1 Enartsanalyser - qPCR

Frågeställningen för dessa studier är: Finns art X här? Varje art analyseras med en markör som är specifik för precis den arten. Provsvarerna anger närvaro/frånvaro. (Figur B1-1) Inventering av förekomst av en art med eDNA görs med så kallad qPCR. Då flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundansen mellan art A och art B inte jämföras med varandra däremot kan i vissa mängdskillnader inom arten uppskattas. Analystiden för enartsanalyser är kortare än den för



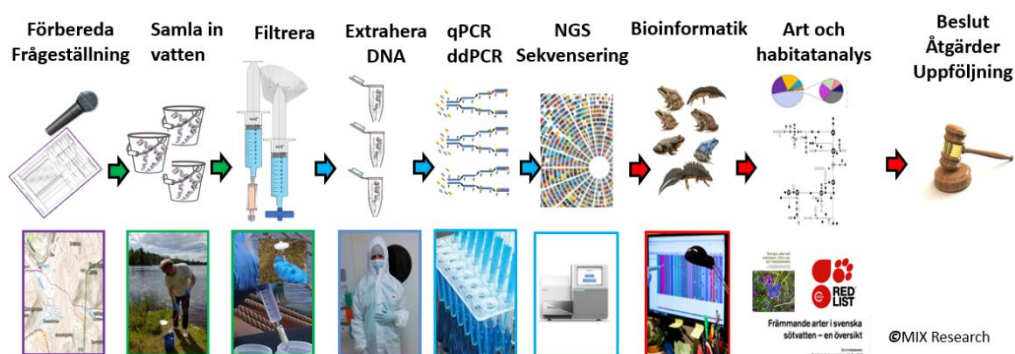
flerartsanalyser.

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

B1.2 Flerartsstudier - Metastreckkodning

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 B1-2).



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

BILAGA 2. LABORATORIEANALYSER

Extraktion

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

Enartsanalys - qPCR

Förekomst av flodpärlmussla analyserades med qPCR på en med en QuantStudio 1 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Primer/probe markörerna var noggrant testade för att undvika detektion av närbesläktade arter till flodpärlmussla och beskrivs i Mauvisseau m.fl. (2021). En standardkurva användes För varje vattenprov utfördes 6 tekniska qPCR replikat. För kvantifiering och verifiering av amplifikation konstruerades standardkurvor genom successiv spädning av vävnads-DNA, med spädningsfaktorer från 1:1 till 1:100 000. DNA-koncentrationen av spädningsarna kvantifierades kort före analys och analyserades i tre replikat, tillsammans med positiva och negativa kontroller. Samma sorts analys utfördes för flodkräfta med arts specifika probes och primers.

Flerartsanalyser

Flerartsanalyser för fisk, groddjur och däggdjur analyserades med fem markörer på 12S-genen. Fyra fiskmarkörer analyserades som multiplex för fisk (Miya m.fl. 2020). Varje PCR-prov utfördes i 4 replikat. Som positiv laboratoriekontroll används ett prov med känd artsammansättning av tropiska arter som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyseras för att säkerhetsställa kvaliteten och tillförlitligheten av resultatet. Protokollen för de olika markörerna är publicerade i Miya m.fl. 2020 och Kelly m.fl. 2015.

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 3,7 miljarder sekvenser och 25 triljoner baspar enligt GenBank och NCBI hemsida (Sayers m.fl. 2024). Bioinformatiken följde Jeunen m.fl. (2024 a,b). 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

- Jeunen, G. J., ... & Gemmell, N. (2024). tombRaider-improved species and haplotype recovery from metabarcoding data through artefact and pseudogene exclusion. *bioRxiv*, 2024-08.
- Jeunen, G. J., ... & Lamare, M. (2024). Streamlining large-scale oceanic biomonitoring using passive eDNA samplers integrated into vessel's continuous pump underway seawater systems. *Science of the Total Environment*, 946, 174354.
- Mauvisseau, Q., Halfmaerten, D., ... & Brys, R. (2021). Effects of preservation strategies on environmental DNA detection and quantification using ddPCR. *Environmental DNA*, 3(4), 815-822.
- 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., m.fl. (2024). GenBank 2024 update. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D134-D137.
- 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.



MIX Research
Sweden

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 målsgrupperna 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 beredskapscapacitet 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 4: KVALITETSKONTROLLER SOM REDOVISAS

- 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.
- Total eDNA-koncentration för samtliga prov (inkl. negativa) anges. Koncentrationen varierar avsevärt naturligt men ger ändå en första indikation om hur eDNA-extraktionen lyckats.
- 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.
- 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.
- Negativa kontroller indelade i a) fält-negativa (filter-negativa) b) extraktions-negativa samt c) PCR-negativa utförs. Detta möjliggör en kontroll av vilka prover som riskerar att vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.
- 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 målarten 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.
- 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.
- 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.
- Minst 4st. PCR-replikat per art/artgrupp och eDNA-prov utförs. Dessa sammanslås i sekvenseringen. Färre replikat minskar analyssäkerheten avsevärt. För enartsanalyser rekommenderas 6 replikat.
- 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: qPCR RESULTAT OCH KONTROLLER

Alla negativa fält- och laboratorieprov visade negativt utslag. Alla positiva laboratoriekontroller var positiva. Positiva kontrollen från Moliden gav utslag på 6/6 qPCR replikat (Figur B5_1).

Tabell B5_1. Kvalitetsgranskning av eDNA och kontroller. Provnamn (se tabell 1 i huvudtexten) eDNA-koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific) angivet i (ng/μl V= volym vatten filtrerat, Inhiberingskontroll utfördes med qPCR och alla prover genomgick antiinhiberings Powerclean. PC= Powerclean.

Provnamn	Poolade filter	Lokal	Datum	Tid	MI Filterart	DNA konc
MO25_01	2	Uppströms Kvarn	2025-08-06	09:32	1000	5,2
MO25_02	2	Nedströms kvarn	2025-08-06	10:02	1000	8,60
MO25_03	1	Ovansjösjön	2025-08-06	10:30	800	6,80
MO25_04	2	Utterån Almslåtberget	2025-08-06	11:58	900	6,60
MO25_05	2	Utterån Nordsjöänget	2025-08-06	13:16	800	2,10
MO25_06	2	Kvarnbäcken	2025-08-06	13:39	400	2,29
MO25_07	2	Forsån	2025-08-06	15:24	800	3,31
MO25_08	2	uppströms Fanbyviken	2025-08-06	17:25	400	1,35
MO25_09	1	Anundsjön	2025-08-06	18:04	1500	5,22
MO25_10	1	Moliden	2025-08-06	19:38	700	2,92
MO25_11	1	Galtbäcken	2025-08-06	20:02	250	1,25
MO25_12	1	Härktjärnsbäcken	2025-08-06	21:04	1900	9,78
MO25_13	1	Billstasundet	2025-08-06	22:12	700	0,80
MO25_neg	1	Filter field Neg	2025-08-06	19:40	1500	0,08
MO25_Xneg	1	Ex Neg			1000	< 0,001

Tabell B_6.1. Fiskmarkör. Resultat av antal läsningar per art och lokal. Siffrorna anger hur många gånger en sekvens blivit läst på artnivå och anger relativ biomassa. Flera läsningar anger högre biomassa. Totala antalet läsningar per prov anges. Färgerna på texten och i första kolumnen anger vilka familjer fiskarna hör till (grått = spiggar, röd = laxfiskar, mörkorange = laxfiskar, brändgul =nors, mörkgrön = gädda, ljusgrön = abborrfiskar, brun = torskfiskar, blå =karpfiskar, violett= simpör, gul= nejonöga. Notera att två prover tagits på lokalerna Billstasundet. Resultaten för dessa anger både delproverna (liten text) och sammanslagning av de två proverna (fet text)

BILAGA 6: FÖRDELNING AV ARTLÄSNINGAR INOM LOKALERNA													
	Upströms Kvarn	Nedströms kvarn	Ovansjösjön	Utterån Almslättnberget	Utterån Nordsjöänglet	Kvarnbäcken	Forsån	Upströms Fanbyviken	Anundsjön	Moliden	Galtbäcken	Härtyärnsbäcken	Billstasundet
Småspigg							958						5 836
Storspigg										7 661			
Lax				6 357	25 108	121 036	67 249	8 151		3 053	7 111	34	9 698
Öring	16 921					17 685							
Am. Bäckröding							8 456			1 890			
Harr													
Nors			2 194										
Gädda	31 487	6 519	34 284	23			8 826	6 187	10 319				20 772
Abborre	86 586	42 422	155 327	1 539	1 523	27 908	27 024	26 427	27 753		15		7
Gös									3				16 795
Gärs	4 207	7 858	1 254						11 510	7 783			10 625
Lake		5 750			17	2 601					16		
Mört	150 135	82 975	98 701	20	533	2 811	4 645	18 804	57 593	6 429			3
Benlöja	919	1 817	14 299					20 010	40 593	24 614			
Braxen								13 980	4 523	820			4 272
Elritsa	29	17	23	8 082	14 416		20 013		8	14 224			7 092
Stensimpa	2 333	37 783	2 593	20 091	20 393		117 590	10 722		55 094			
Nejonöga					65	187	4 725		398	821			
Totalt # läsningar:	275 696	202 062	308 675	34 573	63 765	143 259	262 971	104 878	151 374	150 142	7 111	65	75 100



MIX Research
Sweden