

# Övervakning av svartmunnad smörbult

- pilotstudie med eDNA och provfiske i  
Göteborgs skärgård 2021



Länsstyrelsen  
Västra Götaland

## Övervakning av svartmunnad smörbult

– *pilotstudie med eDNA och provfiske i Göteborgs skärgård 2021*

Per Sundberg, Alizz Axberg, Felix Bravell & Yannic Wocken

SeAnalytics AB(eDNA)

Jimmy Ahlsen, Johanna Bergkvist & Marina Magnusson

Marine Monitoring AB (provfiske)

Utgivare: Länsstyrelsen Västra Götaland

Kontaktperson: Anna Dimming, Vattenavdelningen

Foto framsida: Per Sundberg, & Yannic Wocken

Rapport: 2022:14

ISSN: 1403-168X

Mer information hittar du på: [lansstyrelsen.se/vastragotaland/](https://lansstyrelsen.se/vastragotaland/)

## Sammanfattning

---

Den invasiva främmande arten svartmunnad smörbult (*Neogobius melanostomus*) upptäcktes första gången i Karlskrona skärgård 2008. Därefter har fynd rapporterats från många lokaler från Göteborg på västkusten och runt kusten upp till Gävle i Bottenhavet. Eftersom arten har en stor invasionspotential kommer den sannolikt sprida sig vidare varför förekomst och spridning bör övervakas om man önskar göra några insatser för att minimera spridningen.

Övervakning och inventering av fiskförekomster sker traditionellt genom olika typer av provfiske vilket är tidskrävande och destruktivt eftersom även andra fiskarter fångas. Djur (och växter) lämnar genetiska DNA-spår efter sig i miljön, och detta kan användas för att påvisa förekomst av en art utan att den behöver fångas, eller observeras. Tekniken benämns eDNA (från engelskans "environmental DNA") och används alltmer inom miljöövervakningen. Grunden bygger på att det går att hitta korta DNA-strängar som på ett unikt sätt identifierar en art och som kan fångas upp i ett vattenprov. Det finns många undersökningar som har visat att tekniken fungerar, men huvuddelen av dessa undersökningar är från mer slutna miljöer som sjöar och åar. Det är mindre känt hur det fungerar i den mer öppna marina miljön.

Om eDNA ska kunna användas är det viktigt att tekniken testats i olika steg, Det gäller att hitta den för arten unika DNA-sekvensen, bekräfta att den inte "plockar upp" närstående arter, testa under kontrollerade laboratorieförhållanden. Det är också viktigt att med olika försök verifiera att det fungerar i den miljö som tekniken ska användas - detta är ett steg som många gånger saknas. Den här undersökningen baseras på vattenprover från 12 lokaler analyserade för eDNA och förekomsten av svartmunnad smörbult, parallellt med provfiske på 10 av dessa lokaler. För att eDNA ska kunna fungera som övervakningsmetod måste det vara ett konsekvent positivt svar på de lokaler där målarten har bekräftats med fiske.

Undersökningen visar att eDNA-tekniken påvisar spår av målarten på de platser där provfisket bekräftar förekomst av arten, men även på tre lokaler där fisket inte gav resultat. Från två av dessa lokaler har det tidigare rapporterats fynd av arten och utifrån detta, samt artens utbredning i närområdet, betraktas detta som sanna positiva observationer. Studien visar på vikten av att flera prover tas per lokal, och att väderförhållande och exakt plats för provtagning bör tas hänsyn till för att få ett så säkert resultat som möjligt och för att minska risken för falska negativa.

# Innehåll

Sammanfattning.....	1
Introduktion.....	3
Pilotstudie med eDNA och provfiske .....	5
Detekterbart DNA i laboratorie-försök.....	6
Material och metod.....	6
Resultat.....	6
Förekomst av svartmunnad smörbult undersökt med eDNA .....	7
Material och metod.....	7
Analys.....	11
Resultat.....	11
Förekomst av svartmunnad smörbult undersökt med provfiske.....	14
Material och metod.....	14
Resultat.....	16
Slutsatser och rekommendationer.....	18
Referenser.....	19
Bilaga 1: Målarartsanalys med dPCR (digital PCR).....	20
Bilaga 2: Detaljerat resultat av dPCR analysen.....	22

## Introduktion

---

Svartmunnad smörbult (*Neogobius melanostomus*) är en främmande invasiv art som enligt bedömningen i Strand et al. (2018) både har en mycket hög spridningspotential och stark påverkan på den biologiska mångfalden. Havs- och Vattenmyndigheten bedömer risken för arten att vara invasiv i Sverige till "mycket hög - riskklass 5". Det är en söt-/brackvatten-art, men kan leva och föröka sig i saltvatten (om än lite mindre effektivt) (Green, pers. comm). Arten kommer ursprungligen från Pontokaspiska området (Kaspiska havet, Svarta havet) och har förmodligen spridits med fartygens ballastvatten. Den upptäcktes första gången i Karlskrona skärgård 2008. Därefter har fynd rapporterats från Karlshamns skärgård, hamnarna i Göteborg och runt Gotland, från den inre delen av Bråviken samt utanför Muskö i Stockholms skärgård. Idag är den en vanlig art i Göteborgs hamn med omgivning.

Med tanke på artens potential att sprida sig är det viktigt att kunna inventera dess förekomst och spridning för eventuella åtgärder. Övervakning och inventering av fiskförekomster sker traditionellt genom olika typer av provfiske vilket är en tidskrävande och destruktiv metod som även fångar andra fiskarter. Inom miljöövervakningen ökar användningen av DNA-baserade metoder för att bestämma och upptäcka arter. Det kan gälla artbestämning utifrån DNA-sekvenser (DNA barcoding) eller att påvisa förekomsten av arter inom ett område utifrån de genetiska DNA-spår organismer lämnar efter sig i naturen på olika sätt och i olika omfattning. Det senare benämns miljö-DNA, eller vanligare eDNA (från engelskans environmental DNA). Fördelen med eDNA är att det är en icke-destruktiv undersökningsmetod eftersom inga djur/organismer behöver fångas (som i exemplet med provfiske), eller att man faktiskt behöver observera *in situ* den art som ska övervakas. Det finns många studier som visar att eDNA är ett kraftfullt och väl fungerande verktyg, speciellt har det använts framgångsrikt för undersökningar av fisksamhällen där det för vissa frågeställningar kan ersätta provfiske. Bohman (2018) ger en bra överblick över hur eDNA används och kan användas inom miljöövervakningen.

De flesta tidigare eDNA-studier av fisk har utförts i mer slutna vattenområden som sjöar, floder och åar. Den marina miljön är i vissa avseenden mer utmanande eftersom det är ett mer öppet system. Utan närmare kunskap om hur, och hur långt, DNA kan sprida sig är det inte självklart att resultat från den limniska miljön är direkt överförbara på övervakning i den marina miljön. Den mer öppna marina miljön kan också medföra att DNA:t sprids ut på ett sådant sätt (beroende på vindar och strömmar) att sannolikheten för att kunna fånga upp molekyler blir låg. Det innebär också att känsligare metoder för DNA-analysen är att föredra om det ska användas.

Ett viktigt steg i utvecklingen av eDNA-metoder inom miljöövervakningen är att tekniken verifieras, dels för olika arter, dels för olika situationer. I den här

studien jämför vi hur eDNA och en form av kvantitativ PCR (digital PCR) ställer sig mot traditionellt provfiske i förmågan att upptäcka målarten svartmunnad smörbult. En viktig del i sammanhanget är att utreda hur långt ifrån källan DNA kan upptäckas. Om det sprider sig på ett "upptäckbart" sätt långt ifrån en källa blir det i praktiken mindre användbart som övervakningsmetod. För det ändamålet togs i undersökningen prover på två referenslokaler som bedömdes ligga utanför den miljö (grunt vatten) där man kan förvänta sig att arten lever.

En annan fråga när det gäller övervakning med eDNA är risken för falska positiva prov. Det kan till exempel vara DNA som kommer med fågelspillning en närliggande fiskrestaurang, eller någon campare som slängt i fiskrens. Det är därför viktigt att veta hur länge DNA:t finns kvar i vattnet efter att källan försvunnit.



Figur 1. Sillviksbadet. (Foto: Johanna Bergkvist©).

## Pilotstudie med eDNA och provfiske

Detta uppdrag är ett pilotprojekt för att undersöka om svartmunnad smörbults genetiska spår i vattnet går att använda för att se artens förekomst inom ett begränsat område. För att kunna använda metoden på nya platser behöver denna enartsanalys verifieras, dels behöver man fastställa artens spridning av sitt eDNA, dels provfiska på samma platser där vattenprover tas. I pilotprojektet ingår tre moment:

1. Utreda hur länge DNA från målarten är detekterbart efter att källan försvunnit.
1. Ta vattenprover för eDNA-analys på samma lokaler som provfiske.
2. Provfiske med ryssjor och burar för att bekräfta förekomst av svartmunnad smörbult på samma lokaler som vattenprover tagits för eDNA.



Figur 2. Utrustning för eDNA analys (Foto: Per Sundberg®).

# Detekterbart DNA i laboratorie-försök

---

För att undvika falska positiva svar är det viktigt att veta hur länge det finns detekterbart DNA kvar i miljön efter att källan (fisken) försvunnit. Om det är lång "livslängd" på DNA:t blir det svårt att veta om det finns levande djur av målarten i till exempel en vik, eller om det är rester av gammalt DNA.

## Material och metod

För att testa detta genomfördes ett försök inom ramen för ett pågående eDNA forskningsprojekt vid Göteborgs universitet finansierat av Naturvårdsverket (kontrakt 802-0107-18). Svartmunnad smörbult förvarades i en tunna med vatten med en salthalt som ska motsvara artens naturliga miljö (kranvatten blandat med akvariesalt). Mängden fisk varierades (1, 3 och 5 fiskar), fyra experiment-tunnor per omgång. DNA mättes efter att fiskarna funnits i tunnorna 24 timmar, varefter de togs bort (=tid 0). Därefter togs prover efter 6, 12, 18, 24, 30, 42, 54, 78, 102 och 112 timmar. Resultaten från försöken slogs samman och eftersom fiskarna varierade i storlek var det rimligare att hantera dem utifrån vikt snarare än antal. Sammanlagt togs 120 prov.

## Resultat

Mängden detekterbart DNA minskade snabbt över tid med en skattad halveringstid på 12 timmar. Efter fyra dagar bedöms halten vara så låg att det är osannolikt att kunna påvisa DNA i en realistisk nivå (Axberg 2021). Om det finns anledning att kontrollera att det inte handlar om ett falskt positivt svar på en lokal, så bör provtagningen göras om efter en vecka.

Resultatet belyser vikten av att filtrera och fixera proverna i direkt anslutning till provtagningen. Nedbrytningshastigheten påverkas av många faktorer och kan förväntas vara snabbare i ett riktigt vattenprov med högre bakteriehalt än i laboratorie-experimentet ovan. Redan några timmar kan göra skillnad i hur mycket DNA som har brutits ner.



# Förekomst av svartmunnad smörbult undersökt med eDNA

För att förhindra kontamination från fiskeredskapen utfördes provtagningen för eDNA cirka en vecka innan fisket. Detta bedömdes inte påverka resultatet eftersom fiskpopulationerna kan antas vara rätt stabila (Behrens et al. 2021).

## Material och metod

Vattenprover togs från 12 lokaler i enlighet med uppdraget (Figur 3, Tabell 1); på tio av dessa lokaler skedde provfiske ungefär en vecka efter att eDNA-proverna togs. Prover för eDNA togs på ytterligare två lokaler som bedömdes utifrån djup och avstånd till lokaler med fisk skulle kunna fungera som referenspunkter för hur långt DNA kan spridas. Som referenspunkter valdes en lokal ost Vrångö, och en väst Långedrag (Figur 3).



Figur 3. Översikt över provtagningslokalerna. Blå punkter provtagning eDNA och provfiske, grå punkter enbart eDNA. (karta Lantmäteriet)

Tabell 1. Insamlingslokaler, namn och positioner och annan metadata. Antal prov per lokal n = 4, förutom referenspunkterna där n=3.

<b>Lokal</b>	<b>Position SWEREF</b>	<b>Datum 2021- 09</b>	<b>Salthalt ‰</b>	<b>Temperatur °C</b>	<b>Djup m</b>	<b>Vind m/s /riktning</b>
<b>1 Husvik Brännö</b>	6392609.24 307505.32	10	13	19,1	1	2/SV
<b>2 Färjeläget Vrångö</b>	6385388.75 308115.51	10	16	18,0	2,5	2/SO
<b>3 Stora Amundön</b>	6387838.62 315140.57	9	11	18,5	0-1	1/V
<b>4 Ganlets badplats</b>	6391822.97 313612.80	9	7	19,7	0-1	4/S
<b>5 Långedrag</b>	6396369.41 312094.29	7	5	14,8	0-1	4/SV
<b>6 Hällsvik</b>	6399963.15 305429.68	7	10	15,0	0-1	6/SV
<b>7 Store Udd badplats</b>	6406234.98 309306.22	8	7	17,9	1	5/SV
<b>8 Sillviksbadet</b>	6404664.64 305493.84	8	16	18,0	1,5	8/SV
<b>9 Hönö Klåva</b>	6398135.45 300297.16	13	14	19,1	1	1/O
<b>10 Tjolmenhamnen Öckerö</b>	6403044.83 300472.86	13	14	17,4	1	5/N
<b>Referenspunkt 1 väst Långedrag</b>	6395917.16 310091.64	10	17	18,0	7	2/O
<b>Referenspunkt 1 ost Vrångö</b>	6385855.18 309005.56	10	10	18,0	14	2/O
<b>Extra Långedrag<sup>1</sup></b>	6396400.79 312086.07	20	17	16,0	1	2/O

<sup>1</sup> Kompletterande prover från insidan av bryggan Långedrag.

På varje lokal togs flera delprover som slogs ihop i ett sterilt tvålitterskärl. När djupet tillät det togs vattenproverna med en Ruttner-vattenhämtare (Figur 4) nära botten (utom i fallet med referenspunkterna, där provet togs i mitten av vattenpelaren). På lokaler med grundare vatten användes en båtshake med en fastspänd enlitters spann (Figur 4).

Delproverna samlades i en steril tvålittersburk (Figur 4) från vilket sedan två prover togs och filtrerades. All insamling gjordes med engångsutrustning för att förhindra kontamination, båtshaken och Ruttner-hämtarna steriliserades med 10 % klorinlösning mellan provlokalerna.



Figur 4. På grundare vatten användes en teleskop-båtshake i vars ände det går att fästa en burk (bild från annan undersökning). För prov på djupare vatten användes en Ruttner-hämtare. Proverna sparades fram till filtrering och fixering i en steril tvålitters (engångs) spann. (Foto: Per Sundberg® (vänster bild), Lise-Lotte Sundberg® (höger)).

Vattenproverna filtrerades och fixerades i anslutning till insamlingen (högst fyra timmar efter provet tagits). Detta är viktigt eftersom flera studier visar att DNA:t ganska snabbt bryts ner efter det lämnat källan (se även avsnitt *Detekterbart DNA i laboratorie-försök*). Proverna filtrerades i sterila och inkapslade Sterivex® filter (0.45  $\mu\text{m}$  alternativt 0.22  $\mu\text{m}$  porstorlek) vilka sedan fixerades i 95 % etanol och förslöts med proppar. Varje filter placerades därefter i 50ml Falcon-rör för att förhindra korskontamination mellan filter. Filtren placerades vid hemkomst i  $-20^{\circ}\text{C}$  fryns fram till extraktion av DNA. På en av provplatserna filtrerades 1 liter DNA/RNA fritt vatten som negativ kontroll.

DNA extraherades från filtren med Nucleospin eDNA water kit (Macherey-Nagel) med den teknik och standard som utvecklats i laboratoriet. Koncentration av DNA i extrakten mättes med Qubit® fluorometer. Notera att detta mäter koncentrationen av all DNA i provet och inte specifikt DNA från mållarten.

För att påvisa förekomsten av DNA från mållarten svartmunnad smörbult användes en applikation av kvantitativ PCR: digital PCR (dPCR). För analysen används ett system utvecklat av QiaGen (Qiacuity One) (Figur 5). Metoden beskrivs mer utförligt i Bilaga 1.



Figur 5. QiAcuity One systemet och den typ av 24-plattor som använts (Foto: Alizz Axberg<sup>©</sup>).

Proverna preparerades inför analysen med QIAcuity One med Probe MM kit (QIAGEN). Varje prov, inklusive positiva och negativa prover, analyserades i duplikat för att öka tillförlitligheten. DNA extraherat från vävnad av svartmunnad smörbult användes som positiv kontroll i analysen, och DNA/RNA fritt vatten som negativ kontroll.

Extraherat DNA från varje lokal/prov applicerades på en 24-provplatta. 40  $\mu$ l reaktionsvolym innehållande 10  $\mu$ l Qiagen mix x4 för analys med prober, 2  $\mu$ l primer-prob assay 20x (Bio-Rad), 10  $\mu$ l DNA från prov och 18  $\mu$ l vatten. En assay<sup>1</sup> (primers + prob) användes som utvecklats i SeAnalytics laboratorium (Panova et al. 2021) baserat på 12S-genen och som är artspecifik för svartmunnad smörbult. Varje prov analyserades i duplikat för att öka sannolikheten att hitta målarten. Tabell 2 beskriver de olika stegen i PCR-analysen. "Annealing"-temperaturen 64°C är något lägre än i Panova et al. (2021) och testades i olika steg för att försäkra att den närliggande arten svart smörbult (*Gobius niger*) inte ger positiva svar i analysen.

Tabell 2. PCR/thermocycling enligt följande schema.

Cykler	Temperatur	Tid
1x	95° C	2 min
40 x	95° C	30 sec
	64° C	1 min

<sup>1</sup> Assay: i arbetet med att utveckla en assay för kvantitativ PCR (qPCR/ddPCR/dPCR) ingår att utveckla artspecifika primer-par och att med olika test och kontroller säkerställa att det går att hitta spår av målarten med det utvecklade protokollet.

## Analys

Förekomst av DNA från målarten (svartmunnad smörbult i det här fallet) indikerar att arten finns i omgivningen. Analysen baseras på digital PCR, en variant av kvantitativ PCR som amplifierar DNA från målarten (om närvarande), och det är denna process som kan övervakas och observeras. Tekniken bygger alltså inte på sekvensering och kräver heller ingen bioinformatisk analys som till exempel fallet med metabarcoding. Men, man får heller inte reda på vilka andra arter som finns i området, utan tekniken förutsätter att frågan är om målarten finns i området/på lokalen eller inte.

Om målarten saknas så blir det uppenbarligen inte heller någon amplifiering vilket ger ett negativt resultat. dPCR är en kvantitativ analysmetod så ju fler molekyler som påträffas, desto "starkare" signal/resultat. Tabell 3 anger i hur många av proverna per lokal där målarten kunde påvisas utan ta hänsyn till styrkan på signalen. I Bilaga 2 finns angivet antalet positiva partitioner och även om det inte är statistiskt analyserat går det att se ett visst samband mellan antalet partitioner och antalet individer i provfisket. Rådata har också genomgått manuell kontroll för att utesluta att till exempel dammkorn har registrerats som en positiv signal.

## Resultat

Analysen kunde påvisa DNA från målarten från alla lokaler utom från Tjolmenhamnen Öckerö (Tabell 3). Dessa prover (förutom 11 och 12) är tagna från strandkanten av praktiska skäl, och därför med en viss distans från provfiske-punkterna men resultaten visar att fiskbestånden är spridda, eller att DNA:t sprids i vattnet i tillräcklig mängd för att kunna fångas upp även på detta relativt korta avstånd. På alla lokaler förutom tre (Husvik, Amundön, Hönö Klåva) bekräftade provfisket förekomst av svartmunnad smörbult (Tabell 4 nedan). Från Brännö, på en lokal nära Husvik, är arten rapporterad 2019 och likaså från Amundön 2018 (<https://artfakta.slu>). Däremot finns inga rapporter från Hönö Klåva men med tanke på närheten till andra lokaler med bekräftad förekomst så måste detta betraktas som en säker observation.

För att få en uppfattning om hur olika omgivningsfaktorer kan påverka resultatet togs ett extraprover på lokalen "Långedrag" (Figur 6). Den i uppdraget angivna punkten ligger väster om en pir och är utsatt för vind och strömmar, medan insidan är mer skyddad, lugnare och med förmodad lägre vattenomsättning. Proverna från "Extra Långedrag" är alla positiva med många positiva partitioner (Tabell 3 och Bilaga 2). Förekomst av svartmunnad smörbult på den här lokalen bekräftades senare med fiske i samband med ett examensarbete på Göteborgs universitet (F. Bravell, pers. obs.).

Tabell 3. Lokaler och resultat av dPCR analysen som antalet positiva (spår av DNA från svartmunnad smörbult) per prov och lokal. Se Bilaga 2 för en mer detaljerad rapport.

Lokal	Antalet positiva prov/alla prov	Bekräftad förekomst vid provfiske (från Tabell 4)
1 Husvik Brännö	3/4	-
2 Färjeläget Vrångö	2/4	+
3 Stora Amundön	3/4	-
4 Ganlets badplats	2/4	+
5 Långedrag	3/4	+
6 Hällsvik	1/4	+
7 Store Udd badplats	4/4	+
8 Sillviksbadet	4/4	+
9 Hönö Klåva	2/4	-
10 Tjolmenhamnen Öckerö	0/4	-
11 Referenspunkt 1	1/3	inget provfiske
12 Referenspunkt 2	0/3	inget provfiske
Extra Långedrag	4/4	ja, med mete vid senare tillfälle

I uppdraget ingick också att ta prover från två referenspunkter, lokaler som kunde antas ligga en bit ifrån lämpliga habitat för målarten. Detta var tänkt att ge en uppfattning om hur långt DNA kunde spridas från en lokal med förekomst av fisken. Från referenslokal 1 (väst Långedrag) påvisades målarts-DNA i ett av tre prover, men inget kunde påvisas i proverna från den andra referenslokalen ost Vrångö. Den första lokalen ligger i ett grunt område med många små öar och skär nära Långedrag-lokalen med känd förekomst. Det är därför inte osannolikt att det förekommer bestånd av svartmunnad smörbult i närheten. Den andra lokalen är mera skild från land och på djupare vatten, och där fanns heller ingen indikation på målarten. Men, resultatet är inkonklusivt med avseende på frågan om hur långt ifrån källan målarts-DNA kan upptäckas och bör utredas mer.

Resultaten visar på betydelsen av att ta flera prov per lokal. Exakt hur DNA sprids från källan till omgivningen är inte känt i detalj, med det finns flera indikationer på att förekomsten är fläckvis. Det kan bero på att DNA fäster vid andra partiklar och alltså inte förekommer i så stor utsträcknings som fria, jämt spridda, molekyler i vattnet. Proverna från referenspunkten väst Långedrag är ett exempel på detta där ett av fyra prover har hög halt (Bilaga 2) av målarts-DNA, medan det saknas spår i övriga tre.

Resultaten visar att eDNA fungerar som en metod att påvisa förekomst av svartmunnad smörbult. Även om det går att se ett samband mellan antalet fångade fiskar och mängden positiva partitioner (Tabell 4 och Bilaga 2) så skulle det krävas ytterligare kontrollerade försök för att kunna uttala sig om populationsstorlek utifrån eDNA-analyserna.



Figur 6. Långedrag (Foto: Johanna Bergkvist©).

## Förekomst av svartmunnad smörbult undersökt med provfiske

För att bekräfta förekomst av svartmunnad smörbult på samma lokaler som vattenprover tagits för eDNA, har ett provfiske med ryssjor och burar utförts. Vilka redskap samt metodik som har använts beskrivs utförligt nedan.

### Material och metod

Provfisket utfördes huvudsakligen enligt riktlinjer presenterade i undersökningstypen "Provfiske med kustöversiktsnät, nätlänkar och ryssjor på kustnära grunt vatten. Version 1:1 2015-07-08" (Havs- och Vattenmyndigheten 2015) som är utvecklad av SLU Aqua. Fiske skedde på samtliga lokaler bortsett från vid referenspunkt 1 och 2 som endast undersöktes vid vattenprovtagningen i enlighet med uppdraget (Tabell 1). På varje lokal sattes ryssjor och betade burar inom djupintervallet 2–5 meter. En sammanlänkad ryssja består av en ledarm som leder in fångsten mot ett antal kammare av nät stabiliserade med ett antal stålbågar (Figur 7). Ingångarna till kamrarna är strutformade vilket hindrar fångsten som tagit sig in från att ta sig ut. I änden på ryssjan sitter fiskhuset i vilket fångsten slutligen samlas.

Utöver ryssjor användes även två olika typer av burar, räkburar och krabburar, vid provfisket (Figur 7).



Figur 7. Fiskeredskap använda vid provfisket. Räkburar, krabburar samt sammanlänkade ryssjor (Foto Johanna Bergkvist®).



Vid provfisket sattes två sammanlänkade ryssjor vinkelrätt mot strandlinjen medan en sammanlänkad ryssja tillsammans med fem burar placerades längre ut och spridda på lokalen (Figur 8). Provfisket genomfördes mellan den 13–16 september 2021. Redskapen placerades ut under eftermiddagen och vittjades dagen efter. Samtliga lokaler provfiskades under en natt. Placeringen av redskapen bestämdes på plats utifrån djup och förutsättningar på lokalen, och anpassades efter väderförhållandena. Vid varje lokal noterades exakt position och djup på redskapen med kartplotter, även salthalt och temperatur noterades vid iläggning.



Figur 8. Exempel på placering av fiskeredskap under provfiskemomentet. Från fisket vid Sillviksbadet, Sillvik. Bakgrundskartan består av Göteborgs Stads Ortofoton 2017.

## Resultat

Svartmunnad smörbult fångades vid sex lokaler (Figur 9, Tabell 4). I huvudsak fångades svartmunnad smörbult på de landbaserade lokalerna: Store Udd badplats, Sillviksbadet, Hällsvik, Långedrag och Ganlets badplats. Av de fyra ö-lokalerna var det endast vid färjeläget på Vrångö som svartmunnad smörbult fångades.

Majoriteten av den svartmunnad smörbulten (totalt 47 st.) fångades i ryssjor, medan burarna endast fångade tre svartmunnad smörbultar fördelade på två lokaler. Även för övriga arter var ryssjorna det effektivaste redskapet, vilket även gällde för strandkrabbor som ibland dominerade fångsten i enstaka redskap.



Figur 9. Resultat från provfisket. Lokaler som vid provfisket innehöll svartmunnad smörbult presenteras som gröna punkter, medan lokaler som inte gav någon fångst av svartmunnad smörbult presenteras som röda punkter.

Tabell 4. Resultatet från provfisket. Antal svartmunnad smörbult per lokal presenteras

Lokal	Fångst målart (antal)	Salthalt ytan <sup>1</sup>	Salthalt botten <sup>2</sup>	Temperatur ytan <sup>1</sup>	Temperatur botten <sup>2</sup>
1 Husvik Brännö	0	16	22	18,8	18,9
2 Färjeläget Vrångö	2	20	20	19,3	19,9
3 Stora Amundön	0	23	23	18,6	19
4 Ganlets badplats	5	21	22	20,6	21,4
5 Långedrag	6	18	20	17,3	17,3
6 Hällsvik	3	17	24	15,6	15,4
7 Store Udd badplats	18	22	23	15,7	15,4
8 Sillviksbadet	16	22	23	15,5	15,0
9 Hönö Klåva	0	21	21	18,5	18,5
10 Tjolmenhamnen Öckerö	0	22	23	15,5	15,0

<sup>1</sup> Cirka 0,5 meter.

<sup>2</sup> Cirka 4 meter.

## Slutsatser och rekommendationer

---

Huvudsyftet med uppdraget var att undersöka om eDNA baserad målartsanalys är en fungerande metod för övervakning av svartmunnad smörbult. För att kunna bedöma detta behöver tekniken verifieras med simultana belägg för förekomst/avsaknad av målarten, på det sätt som skett i den här studien. Undersökningen visar att eDNA-tekniken påvisar spår av målarten på de platser där provfisket bekräftar förekomst av arten, men även på tre lokaler där fisket inte gav resultat. Från två av dessa lokaler har det tidigare rapporterats fynd av svartmunnad smörbult och därför betraktas detta som sanna positiva observationer. Likaså resultatet från den tredje lokalen (Hönö Klåva) med tanke på läget och förekomst av arten i närheten även om det inte finns rapporterade fynd just från den lokalen.

Resultatet (Bilaga 2) från de två Långedrag-lokalerna visar på vikten av att välja en mer skyddad miljö, och även en dag med lugnare väder om möjligt vid planeringen av eventuella kommande inventeringar baserade på eDNA. Resultaten (Tabell 3, Bilaga 2) belyser vikten av att ta flera prover per lokal. I det här fallet tycks fyra ha fungerat bra, men merkostnaden för fem prov per lokal, vägs upp av ökad sannolikhet att upptäcka DNA-spår och därmed minska risken för falska negativa svar.

Undersökningen kunde inte klargöra hur långt ifrån källan DNA kan upptäckas och ytterligare kontrollerade försök där prover tas på olika avstånd ifrån känd källa skulle kunna göras. Om det skulle vara så att DNA kan föras långväga med vind och strömmar skulle ett positivt svar inte med säkerhet kunna tolkas som att den invasiva arten finns i närområdet. Men, proverna från Vrångö indikerar att målarts-DNA:t inte sprider sig så långt ifrån källan, och även andra tidigare studier (pers. obs) visar på samma resultat. Därför bör detta inte vara ett problem i ett övervakningsprogram baserat på eDNA.

De två olika metoderna i studien ger olika information, eDNA visar på förekomst men ger ingen information om till exempel åldersfördelning och lekmognad hos arten. Med provfisket går det också att få en uppfattning om hur etablerad en art är i området, samt förekomst av andra arter som kan vara av intresse. Det finns förmodligen en koppling mellan mängden detekterbart DNA och abundans (våra resultat pekar i den riktningen) men sambandet är inte entydigt och kräver fördjupade studier. Tekniken med eDNA har fördelen av att vara mindre destruktivt än provfiske och kräver inga speciella tillstånd.

## Referenser

---

- Axberg, A. (2021). Comparing genetic methods- Detecting and monitoring non-indigenous species. Mastersuppsats 60 hp Göteborgs universitet.
- Bohman, P (2018). *eDNA* i en droppe vatten. Vattenprovtagning av DNA från fisk, kräftor och musslor – en kunskapssammanställning. Aqua reports 2018:18.
- Behrens, J. W. et al. (17 författare) (2021). Seasonal depth distribution and thermal experience of the non-indigenous round goby *Neogobius melanostomus* in the Baltic Sea: implications to key trophic relations. Biological Invasions. <https://doi.org/10.1007/s10530-021-02662-w>
- Göteborgs Stad, Öppna Data. Ortofoto 2017. [https://goteborg.se/wps/portal/start/kommun-politik/kommunfakta/oppna-data/oppna-data-soksida/oppna-data-datamangd#esc\\_entry=1372&esc\\_context=6](https://goteborg.se/wps/portal/start/kommun-politik/kommunfakta/oppna-data/oppna-data-soksida/oppna-data-datamangd#esc_entry=1372&esc_context=6) (Hämtad 2022-01-12)
- Havs- och Vattenmyndigheten 2015. Provfiske med kustöversiktsnät, nätlänkar och ryssjor på kustnära grunt vatten. Version 1:1 2015-07-08.
- Panova, M., Axberg, A. Wocken, Y. 2021. Development of dPCR assay for DNA-based identification of Round goby (*Neogobius melanostomus*). SeAnalytics intern rapport 2021:05 11pp
- Strand, M., Aronsson, M., Svensson, M. 2018. Klassificering av främmande arters effekter på biologisk mångfald i Sverige - ArtDatabankens risklista. ArtDatabanken Rapporterar 21. ArtDatabanken SLU, Uppsala.



Hällsvik (Foto Johanna Bergkvist©).

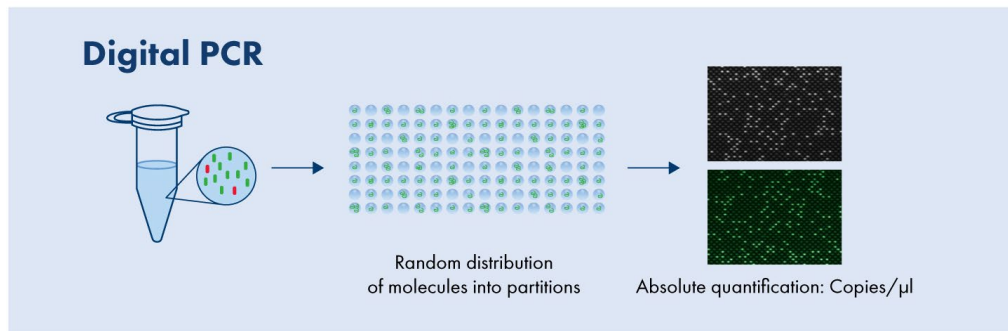
## Bilaga 1: Målartsanalys med dPCR (digital PCR)

---

Analys med PCR (Polymeras Chain Reaction) bygger på att en kort DNA-sekvens som är unik för arten som ska inventeras (målarten) mångfaldigas (amplifieras) i PCR-reaktionen. Det är den processen som kan detekteras på olika sätt, beroende på vilken teknik som används. Det första steget i en målartsanalys baserad på den här tekniken är att designa och testa ett primerpar som är unikt för arten så att det med säkerhet går att säga att det bara är DNA från den eftersökta arten som amplifieras i PCR-reaktionen. Det här steget innefattar också test med närliggande arter, och att hitta just den molekyllära markör (till exempel COI, 12S, 16S) som ger en unik sekvens för arten. I det här steget används vävnad (eller topsat DNA) från individer som har identifierats till korrekt art. Många eDNA analyser/protokoll avslutas med dessa steg, men tekniken bör också verifieras med "skarpa" test i fält-situationer för att kunna säkerställa att de fungerar som övervakningsmetod. Med detta menas att prover tas på lokaler med bekräftad förekomst av målarten. Ett ytterligare steg är att försöka få fram en statistisk power-funktion för hur många prover som måste tas för att minimera risken för falska negativa. Falska negativa är förstås ett speciellt stort problem när det kommer till övervakning av invasiva arter, där en missad förekomst kan ställa till stora problem. Falska positiva är inte ett lika stort problem eftersom flera undersökningar tyder på ganska kort livslängd för DNA i vattnet - ett oväntat resultat kan alltså kontrolleras genom ett nytt prov någon vecka senare för att se om arten fortfarande finns kvar, eller om det exempelvis kanske rörde sig om något DNA från fågelspillningar.

SeAnalytics använder för målarts-analyser QIAcuity (QiaGen), ett system för digital PCR (dPCR) som är en form av mikrofluid teknik där varje enskild PCR-reaktion delas upp i ett stort antal (runt 26 000) partitioner. Detta gör dels att det blir lätt att kvantifiera i hur många partitioner det sker en PCR-reaktion (blir alltså ett direkt mått på mängden målarts-DNA). Uppdelningen innebär också att annat DNA inte stör ampliferingen som annars kan ske, och detta gör att känsligheten ökar. dPCR har en högre känslighet än qPCR och kan detektera även väldigt låga koncentrationer av DNA-molekyler i ett prov.

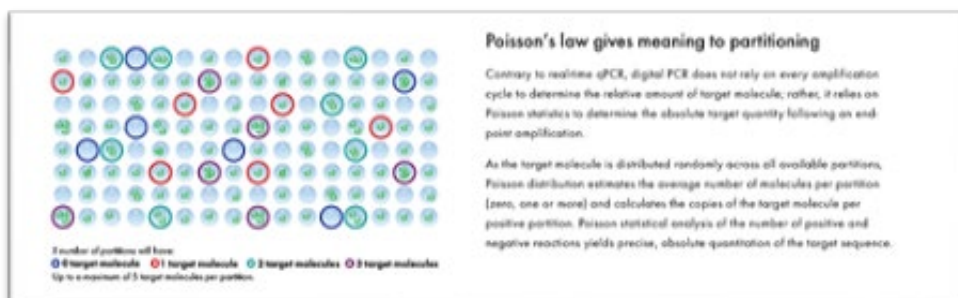
Nedan visas schematiskt och grafiskt de olika stegen i analysen.



(Källa: <https://www.qiagen.com/us/applications/digital-pcr/beginners>)

I första steget blandas det extraherade DNA med olika reagenser (gröna prickar DNA från målarten och rött bakgrunds-DNA). I det här steget läggs också till negativa (blanka) prov som test av kontamination, plus positiva prov med DNA från målarten. Nästa steg är att partitionera lösningen i flera tusen individuella reaktioner där en PCR-reaktion sker i varje partition. Partitioner med målarts-DNA är här markerade grönt, mängden positiva partitioner är kopplat till antalet ursprungs-molekyler. Positiva partitioner detekteras genom att ett fluorescerande ämne aktiveras i fungerande PCR och som kan avläsas i systemet.

I nästa steg görs en beräkning av medeltalet positiva partimotioner baserat på en Poisson-fördelning.



(Källa: <https://www.qiagen.com/us/applications/digital-pcr/beginners>)

Det går att beräkna mängden DNA utifrån denna analys och även konfidensintervall. Men, dessa värden är beroende av totalmängden DNA i provet, och det varierar mellan olika prover (även från samma lokal). Därför presenteras resultaten (som till exempel i Bilaga 2) som en kvalitativ bedömning utifrån frågan om "finns arten i sjön".

## Bilaga 2: Detaljerat resultat av dPCR analysen

---

dPCR analysen utfördes i sex omgångar med prover från insamlingen, tillsammans med ett negativt (rent vatten) prov plus ett positivt prov med DNA extraherat från vävnad av fisk. I första omgången fanns också ett blankt fältprov som test för kontamination. I det provet har DNA-fritt vatten filtrerats i fält med samma förutsättningar som övriga prover.

Den angivna halten DNA är totalhalt i provet och inte specifikt DNA från svartmunnad smörbult. Detta blir ett mått på att filtrering och DNA extraktion har fungerat.

Varje prov analyseras i duplikat och antalet redovisade partitioner är därför medeltal. Tolkningen av vad som ska betraktas som ett säkert positivt prov utgår ifrån antalet positiva partitioner i relation till den negativa blanken. Resultaten kontrolleras också manuellt för felläsningar som kan uppkomma av dammkorn på plattorna. Det har också lagts till en viss marginal, i relation till negativa kontrollen, för ett prov ska betraktas som säkert positivt.



	Prov	Filtrerad volym(l)	Porstorlek filter µm	Koncentration DNA ng/µl	#positiva partitioner	Förekomst målart (+)	Antal fisk i provfisket
--	------	--------------------	----------------------	-------------------------	-----------------------	----------------------	-------------------------

### Analys #1

positiv kontroll					1324,5		
fältblank		1	0.22	ej mätbart	0		
negativ kontroll				ej mätbart	0,5		
1 Husvik Brännö	1:1	1	0.45	29,4	4,5	+	0
	1:2	1	0.45	30,5	4,5	+	
	1:3	1	0.22	30,8	7	+	
	1:4	1	0.22	31,4	1	-	
2 Färjeläget Vrångö	2:1	1	0.22	27,5	4,5	+	2
	2:2	1	0.22	27,3	1	-	
	2:3	1	0.22	38,7	3	+	
	2:4	1	0.22	30,1	0	-	

### Analys #2

positiv kontroll					1197,5		
negativ kontroll					0,5		
3 Stora Amundön	3:1		0.22	38	4	+	0
	3:2		0.22	38,7	7	+	
	3:3	1	0.22	35,3	3,5	+	
	3:4	1	0.22	34,7	1,5	-	
4 Ganlets badplats	4:1	1	0.22	20	0	-	3
	4:2	1	0.22	17,3	0,5	-	
	4:3	1	0.22	23,7	22,5	+	
	4:4	1	0.22	26,3	12	+	
5 Långedrag	5:1	0,63	0.22	25,1	2	-	6
	5:2	0,78	0.45	29,1	4,5	+	

	Prov	Filtrerad volym(l)	Porstorlek filter µm	Koncentration DNA ng/µl	#positiva partitioner	Förekomst målart (+)	Antal fisk i provfisket
--	------	--------------------	----------------------	-------------------------	-----------------------	----------------------	-------------------------

### Analys #3

positiv kontroll					1132,5		
negativ kontroll					0		
5 Långedrag (forts.)	5:3	0,66	0.45	28,7	22	+	6
	5:4	0,66	0.45	31,6	9	+	
6 Hällsvik	6:1	1	0.45	33,3	0	-	3
	6:2	1	0.45	34	0	-	
	6:3	1	0.45	35,3	15,5	+	
	6:4	1	0.45	36,7	1	-	
7 Store Udd badplats	7:1	0,99	0.22	23,9	165	+	18
	7:2	0,96	0.22	24,3	6	+	
	7:3	0,96	0.22	25,9	137	+	
	7:4	0,90	0.22	25,7	138,5	+	

### Analys #4

positiv kontroll					1028		
negativ kontroll					0		
8 Sillviksbadet	8:1	1	0.22	31,5	23,5	+	16
	8:2	1	0.22	34,7	56	+	
	8:3	1	0.22	34	40	+	
	8:4	1	0.22	38	60	+	
9 Hönö Klåva	9:1	1	0.22	34,7	1	-	0
	9:2	1	0.22	35,3	5	+	
	9:3	1	0.22	37,3	21,5	+	
	9:4	1	0.22	33,3	2,5	-	
10 Tjolmenhamnen Öckerö	10:1	1	0.22	30,3	0,5	-	0
	10:2	1	0.22	34,7	0,5	-	

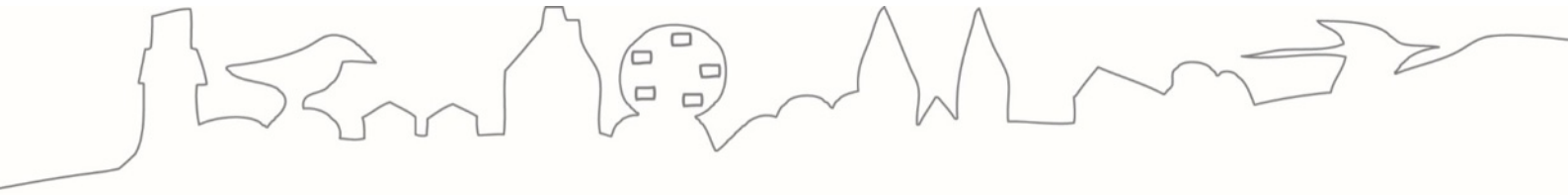
	Prov	Filtrerad volym(l)	Porstorlek filter µm	Koncentration DNA ng/µl	#positiva partitioner	Förekomst målart (+)	Antal fisk i provfisket
--	------	--------------------	----------------------	-------------------------	-----------------------	----------------------	-------------------------

### Analys #5

positiv kontroll					1029,5		
negativ kontroll					0		
10 Tjolmenhamnen Öckerö, (forts)	10:3	1	0.22	30,9	0	-	0
	10:4	1	0.22	31,6	0	-	
11 Referenspunkt 1	11:1	1	0.45	23,5	0,5	-	inget fiske
	11:2	1	0.45	25,7	1,5	-	
	11:3	1	0.45	15,9	18,5	+	
12 Referenspunkt 2	12:1	1	0.22	28,6	0,5	-	inget fiske
	12:2	1	0.22	30,1	0	-	
	12:3	1	0.22	27,9	0,5	-	
Extra Långedrag <sup>1</sup>	L:1	2	0.45	27,7	99	+	bekräftad förekomst
	L:2	1,9	0.45	28,3	111	+	

### Analys #6

positiv kontroll					909,5		
negativ kontroll					0		
Extra Långedrag <sup>1</sup> (forts.)	L:3	1	0.45	12,9	36	+	bekräftad förekomst
	L:4	1	0,45	16,5	74,5	+	



Länsstyrelsen  
Västra Götaland