

eDNA-inventering av strandnära fisksamhällen längs svenska norrlandskusten i maj 2018

AquaBiota Rapport 2018:08

Författare: Johan Näslund, Nicklas Wijkmark, Micaela Hellström & Johan Spens



STOCKHOLM, AUGUSTI 2018

Beställare:

Undersökningen är utförd av AquaBiota Solutions AB för Länsstyrelsen i Västernorrlands län och Länsstyrelsen i Västerbottens Län med hjälp av finansiering från Havs- och Vattenmyndigheten.

Författare:

Johan Näslund (johan.naslund@aquabiota.se), Nicklas Wijkmark (nicklas.wijkmark@aquabiota.se) Micaela Hellström (micaela.hellstrom@aquabiota.se) & Johan Spens (johan.spens@gmail.com)

Bilder:

Omslagsbild; Johan Näslund. En kanna vatten avslöjar vilka fiskar som finns i vattenmassan.

Kontaktinformation:

AquaBiota Solutions AB
Adress: Löjtnantsgatan 25, 115 50 Stockholm
Tel: +46 8 522 302 40
www.aquabiota.se

Kvalitetsgranskad av:

Martin Isaeus (Martin.Isaeus@aquabiota.se)

Distribution:

Fri

Internetversion:

Nedladdningsbar hos www.aquabiota.se

Citera som:

Näslund, J., Wijkmark, N. Hellström M & Spens J. 2018. eDNA-inventering av strandnära fisksamhällen längs svenska norrlandskusten i maj 2018. AquaBiota Rapport 2018:08. 26 sid. ISBN: 978-91-85975-77-8

Ämnesord:

AquaBiota Rapport 2018:08
Projektnummer: 17024
ISBN: 978-91-85975-77-8

© AquaBiota Solutions 2018



INNEHÅLL

Innehåll.....	3
Sammanfattning.....	4
1. Inledning	5
2. Material och metoder.....	8
2.1 Fältarbete.....	8
2.2 Laboratoriearbete.....	9
Resultat och diskussion	11
3.1 Flerartsanalys av fiskesamhället	11
3.2 eDNA-kvalitet samt kvalitetskontroll	20
Tack	21
Referenser	21
Bilaga 1. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar.....	23
Bilaga 2. Kvalitetssäkring av eDNA	24
Bilaga 3: Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser	25

SAMMANFATTNING

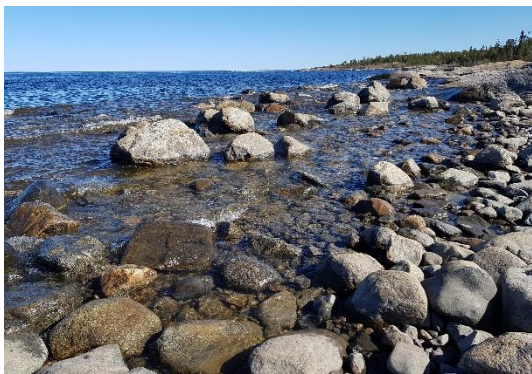
Akvatiskt miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) har under det senaste decenniet visat sig vara ett lovande verktyg för inventering av vattenorganismer inom miljöövervakning och andra miljöundersökningar. Undersökningsmetoden baserar sig på det faktum att alla levande organismer, både växter och djur, kontinuerligt avger genetiska avtryck i miljön i form av slem, avföring, svett och döda celler. Dessa genetiska spår kallas eDNA. Akvatiskt eDNA är spåren som organismer avger i vattenmiljön. eDNA kan utvinnas ur små mängder (0,5 till 3 liter) vatten och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område utan att man varken ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat ger analyserna en bild av artförekomst i nutid.

I maj 2018 utförde AquaBiota Solutions AB på uppdrag av Länsstyrelsen i Västernorrlands län och Länsstyrelsen i Västerbottens län inventeringar av strandnära fisksamhällen längs med Östersjökusten. Arter inventerades med eDNA genom så kallade flerartsanalyser (metabarkodning). Förutom allmän artbeskrivning visades extra stort intresse för kustlekande harr vid några kända lekområden samt möjlig men okänd förekomst av den invasiva arten svartmunnad smörbult i närheten av större hamnområden. Totalt detekterades 27 fiskarter, som speglade den strandnära icke-pelagiska fiskfaunan. Harr detekterades på en lokal. Svartmunnad smörbult detekterades inte i något av proverna. Detta var väntat eftersom svartmunnad smörbult inte tidigare påträffats så långt norrut i Sverige, även om den på den finska sidan av Östersjön hittats på motsvarande breddgrader. I Ångermanälven detekterades även färna (*Squalius cephalus*) som är väldigt sällsynt förekommande så långt norrut i Sverige och hittades senast i Västernorrland 1929.

1. INLEDNING

Undersökningsmetoden miljö-DNA eller eDNA (environmental DNA) baserar sig på det faktum att alla levande organismer, -både växter och djur, -kontinuerligt avger genetiska fotavtryck i miljön i form av slem, avföring, respiration, svett och döda celler (Pedersen m.fl. 2015). Definitionen på eDNA anges som; "det DNA som kan studeras från dessa spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet" (Taberlet m.fl. 2012). I akvatiska miljöer kan detta material utvinnas ur små mängder vatten och genom molekylära analyser påvisa vilka arter som befinner sig inom ett område, utan att man varken ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat (ca. 2 dagar till 2 veckor) ger analyserna en bild av artförekomst i nutid. eDNA har visat sig ha en stor potential som verktyg för inventering av vattenorganismer (Bohmann m.fl. 2014, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017) och har en stor fördel vid inventering av skyddsvärda arter i och med att det är en icke-destruktiv metod till skillnad från exempelvis provfiskeri.

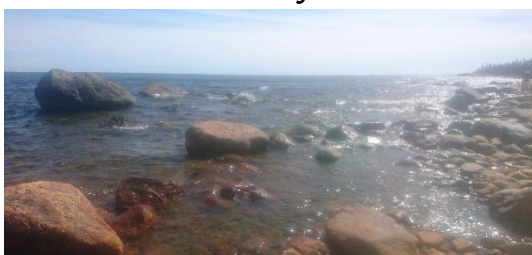
I maj 2018 utförde AquaBiota Solutions AB på uppdrag av Länsstyrelsen i Västernorrlands län och Länsstyrelsen i Västerbottens Län inventeringar av fisksamhället längs med Östersjökusten. Syftet var att inventera grunda strandnära fisksamhällen med ny eDNA-metodik och därmed få information om relativ förekomst av arter som inte lämpar sig för inventering med traditionell metodik. Studien hade även två arter av särskilt intresse: harr och svartmunnad smörbult och provtagning utfördes därför vid platser där det finns historiska uppgifter om förekomst/fiske av harr samt i områden med intensiv fartygstrafik. Ytterligare ett syfte med studien var att validera att eDNA-metodiken fungerar i grunda kustnära habitat i Östersjön. För att möjliggöra jämförelser med tidigare provfiskeri är det nödvändigt att utföra liknande eDNA-undersökningar vid tidigare provfiskade stationer på djupare vatten. Två lokaler var dessutom av särskilt intresse med avseende på mångfalden av fiskar och ett pågående projekt om gädda och abborre. Arter inventerades i denna studie genom så kallade flerartsanalyser (metabarkodning). Provtagningen i studien var avgränsad till provtagning från stranden.



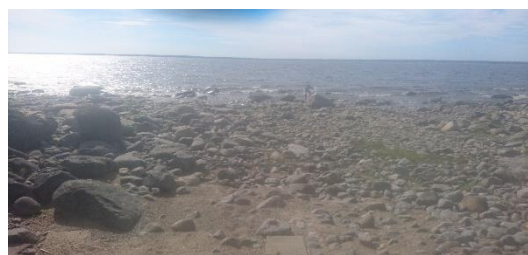
Lokal 1. Bjurö



Lokal 2. Rickleå



Lokal 3. Ratan



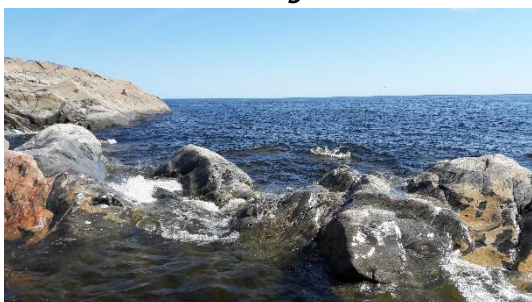
Lokal 4. Rovöjern



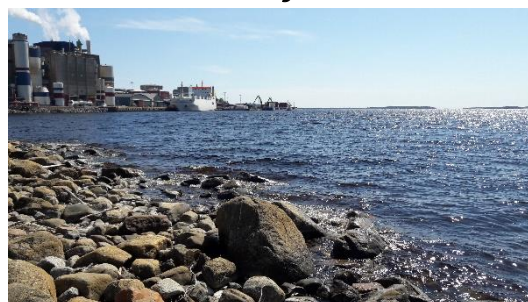
Lokal 5. Blågrundet



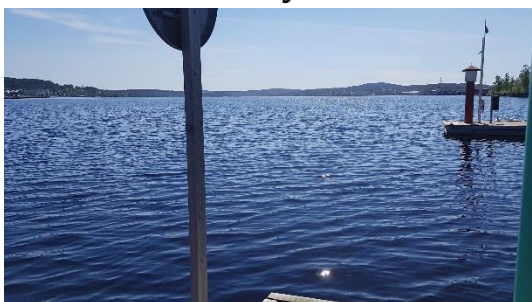
Lokal 6. Järnäs



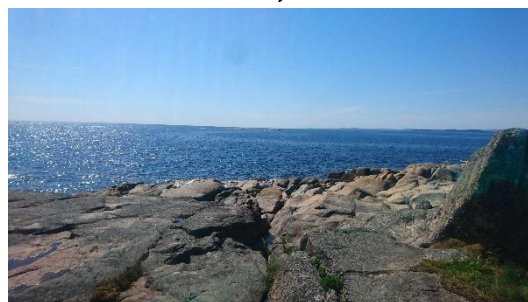
Lokal 7. SÖ Stjälnöhamn



Lokal 8. Husum, hamnområde



Lokal 9. Örnsköldsvik, hamnområde



Lokal 10. Skagsudde



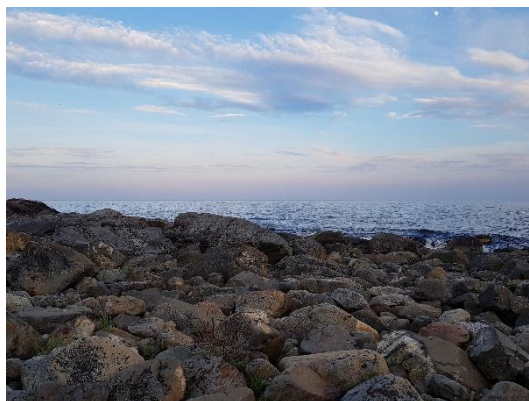
Lokal 11. Ångermanälven, Svanö



Lokal 12. Sörleviken



Lokal 13. Noraåns mynning/Norafjärden



Lokal 14. Hemsö



Lokal 15. Härnösand, hamnområde



Lokal 16. Härnöns utsida



Lokal 17. Lerviksudden



Lokal 18. Sundsvall, hamnområde

2. MATERIAL OCH METODER

2.1 Fältarbete

Fältarbetet utfördes 23-26 maj 2018. Provtagningspunkter anges i Figur 1 och i Tabell 1. Provpunkt 1–6 ligger i Västerbottens län och 7–18 i Västernorrlands län. Lufttemperaturen mätte ca 18–25 °C. Vattentemperaturen mätte 9–17,1 °C i proverna (vatten insamlat från 0–0,5m djup). Lokalerna vid hamnområden samt Ångermanälven valdes ut som potentiella lokaler för svartmunnad smörbult (steniga områden med relativt intensiv fartygstrafik; Kornis m.fl. 2012).

Innan provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria engångsförpackningar. För alla lokaler togs två separata replikat med 6 liter vatten i form av 10 stycken underprover 50 ml i vardera riktningen från provpunkten. Negativa fältkontroller utgjordes av rent vatten som hanterades med samma utrustning och filtrerades på plats för att utesluta kontaminering av DNA mellan prover eller från provtagare. Insamling och fixering följde Spens m.fl. (2017).

Tabell 1. Provpunkter. Latitud och longitud anges som decimalgrader i WGS84, tidpunkt vid provtagningen och vattentemperatur.

Provpunkt	Latitud	Longitud	Tid	H ₂ O °C
1. Bjurö	64,465	21,595	15:30	9
2. Rickleå	64,089	20,954	17:30	9,4
3. Ratan	63,974	20,894	13:30	10
4. Rovögern	63,741	20,529	15:30	11,2
5. Blågrundet	63,604	20,008	18:10	11
6. Järnäs	63,433	19,671	20:20	11
7. SÖ Stjälnohamn	63,332	19,252	11:45	10,1
8. Husum, hamnområde	63,327	19,150	13:00	15
9. Örnsköldsvik, hamnområde	63,286	18,710	11:00	15,1
10. Skagsudde	63,187	19,017	12:20	11
11. Ångermanälven, Svanö	62,890	17,875	22:30	17,1
12. Sörleviken	62,876	18,333	16:30	14
13. Noraåns mynning/Norafjärden	62,860	18,050	18:00	16,1
14. Hemsö	62,704	18,142	20:15	11
15. Härnösand, hamnområde	62,642	17,951	10:30	12,2
16. Härnös utsida	62,575	17,998	11:45	11,1
17. Lerviksudden	62,490	17,840	13:30	11
18. Sundsvall, hamnområde	62,360	17,375	16:10	14



Figur 1. Översiktskarta med provtagningslokalerna (röda punkter). Skala 1:2500000, projektion WGS84 / Pseudo-Mercator. Bakgrundskarta © OpenTopoMap (CC-BY-SA)

2.2 Laboratoriearbete

2.2.1 Extraktion, PCR och sekvensering

Flödesschemat i Bilaga 2 beskriver eDNA-processen från insamling till analys. eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Extraktionerna utfördes av molekylärbioologiska tekniker som är tränade i att extrahera eDNA. Proverna analyserades med flerartsanalyser för förekomst av fisk. Varje PCR prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs under bioinformatiken. Två modifierade markörer som amplifierar 12S rDNA regionen användes. Principerna för metabarkodning förklaras mer utförligt i bilaga 1. Vidare användes en positiv DNA-kontroll med känd artsammansättning som standard för jämförelse, samt negativa kontroller (bilaga 2). De

två replikaten från varje provtagningslokal slogs ihop genom att ta medelantalet läsningar för de två replikaten.

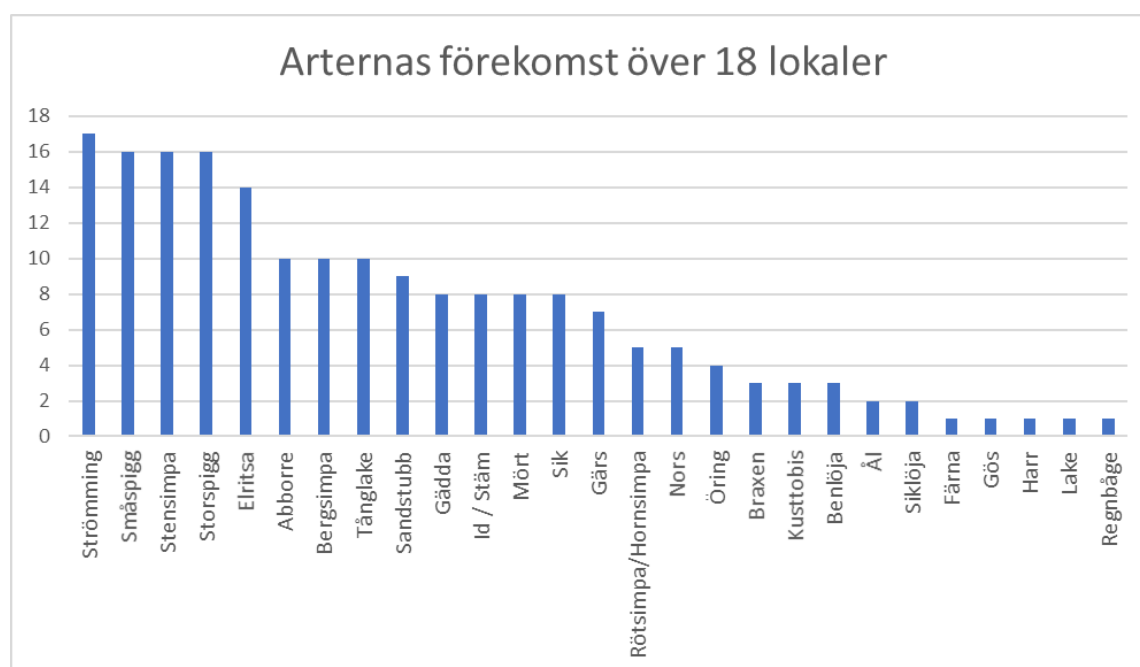
2.2.2. Bioinformatik och verifiering

Varje enskild art har en unik streckkod (se bilaga 1) eller sekvens. Varje unik sekvens fick en molekylär identitet. De olika sekvenserna kördes mot en internationell databas (tillgänglig för allmänheten, som grundar sig på GenBank och upprätthålls av National Center for Biotechnology Information, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)) där sekvenser på mer än 370 000 kända arter finns tillgängliga (Benson m.fl. 2017, bilaga 1) med 0,6 miljarder sekvenser och 2,6 biljoner baspar enligt NCBI:s hemsida. De olika sekvenserna matchades mot databasen och gav på så vis en lista över förekommande arter av fiskar. Sekvenserna lagrade hos NCBI är endast delvis kurerade (verifierade av taxonomer) och kan ibland vara felaktiga. Efter kvalitetsfiltrering av data kördes därför alla sekvenser även mot en kurerad databas över alla Europas fiskar som upprätthålls av NatureMetrics Ltd. Artidentifiering baserar sig på fullständig match mot en referens. I vissa fall kan arter ha en likadan sekvens och då nämns båda arterna i resultattabellerna. Databaserna uppdateras löpande och arter som inte har referenssekvenser inkluderas när de blir tillgängliga. Tack vare nya framsteg inom metabarkodning är det möjligt att med rätt markörer få träffar på artnivå istället för enbart familje- eller genusnivå. Antalet läsningar per art gav en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekom i ett prov.

RESULTAT OCH DISKUSSION

3.1 Flerartsanalys av fiskesamhället

Totalt hittades 27 fiskarter i studien, medelantalet arter per lokal var 10,5 arter ($\pm 2,0$ arter, 95 % konfidensintervall). Arterna som påträffades anges i Tabell 2 samt Figur 2 och 3. Den artrikaste lokalen var vid Bjuröklubb nära Skellefteå med 18 arter och den artfattigaste var vid Stjälnöhamn nära Örnsköldsvik där endast strömming detekterades. De mest dominerande arterna i studien var, i fallande rangordning, strömming (35%), elritsa (15%), stensimpa (14%), storspigg (13%), abborre (7%) och bergsimpä (4%). Harr (*Thymallus thymallus*) som var av särskilt intresse detekterades endast vid lokalen Rickleå (1% av den relativa biomassan vid lokalen). Den vanligast förekommande arten var strömming (17 av 18 lokaler) följt av stensimpa, storspigg och småspigg (16 av 18 lokaler) och elritsa (14 av 18 lokaler) (Figur 2).



Figur 2. Antal lokaler där de enskilda fiskarterna påträffades.

Då eDNA är relativt kortlivat (1–2 veckor) ger resultaten en bild av fiskesamhället för en kort period innan provtagningstillfället. Den provtagna ytan varierar beroende på flera miljöfaktorer och beror dessutom på val av tröskelvärden för detektion. Några större studier för marina miljöer nämner möjligt detektionsavstånd mellan 100–4000 meter och vidare verifiering för olika miljöer och miljöförhållanden kommer att behövas i framtiden (Kelly m.fl 2018). Detta medför att målarter av särskilt intresse som utnyttjar områden under en begränsad period av året, för exempelvis lek, är det av vikt att genomföra provtagningen när förhållandena är lämpliga och vid rätt vattentemperatur. Att strömming var dominerande på många av lokalerna indikerar att vårlekande strömming kommit in till strandnära, exponerade områden vid kusten. Vid lokalen där enbart strömming detekterades är det möjligt att en stor mängd könsceller i vattnet maskerade detektionen av andra arter som sannolikt förekommer vid provtagningslokalen.

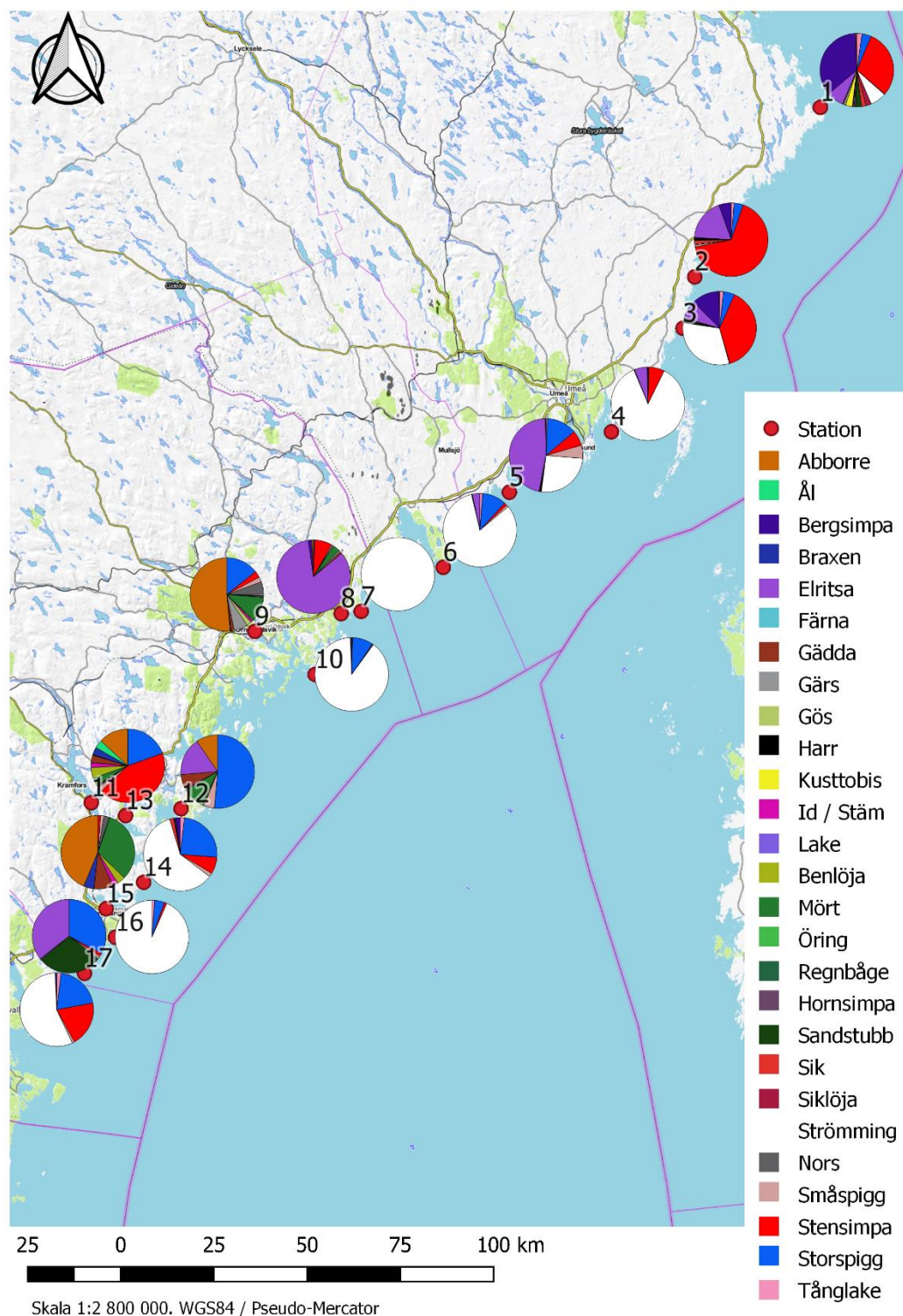
Metodiken visade sig kunna detektera harr i Östersjöns kustområde och är därmed en lämplig metodik för att identifiera både områden och vid vilken tidpunkt på våren (vattentemperatur) som lokala kustlekande populationer ansamlas för lek. Denna studie utnyttjade provtagning vid ett tillfälle men det skulle vara nödvändigt med provtagning under flera tidpunkter på våren för att få en mer detaljerad uppföljning. Under provtagningen var vattenståndet väldigt lågt för de flesta provtagningspunkter i Östersjön (ca -0,5 m).

Tabell 2A. Antalet eDNA-läsningar av målarterna fiskar inom varje lokal som visar hur många gånger en sekvens blivit läst. Antalet läsningar är relaterat till den relativa biomassan av repsektive art. *Träff på kusttobis/havstobis ** träff på id/stäm *** träff på rötsimpa **** träff på släktet Zoarces (se text för mer information).

Art	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Abborre (<i>Perca fluviatilis</i>)	882	126	428		436			1559	49326	137	26295	7533	24775					
Äl (<i>Anguilla anguilla</i>)											7209							129
Bergsimpa (<i>Cottus poecilopus</i>)	51885	13449	20577	1309	569			3078		614				2330			832	2360
Braxen (<i>Abramis brama</i>)									404		6618		2566					
Elritsa (<i>Phoxinus phoxinus</i>)	10897	46241	13527	19049	155413	7744		171517		344	229	13159		469	28894		111	7659
Färna (<i>Squalius cephalus</i>)											309							
Gädda (<i>Esox lucius</i>)	631		441		321			1986	1241		6589	5022	4782					
Gärs (<i>Gymnocephalus cernua</i>)	1458	220	861		408			1597	5768		158							
Gös (<i>Sander lucioperca</i>)									2038									
Harr (<i>Thymallus thymallus</i>)		2437																
Kusttobis (<i>Ammodytes tobianus</i>)*	4274		501			125												
Id / Stäm (<i>Leuciscus</i> sp.):**	447			103	833				957		4184	472	1364					166
Lake (<i>Lota lota</i>)	632																	
Benlöja (<i>Alburnus alburnus</i>)									363		9515		2021					
Mört (<i>Rutilus rutilus</i>)		148	426		465			6399	10591		6908	7608	18030					
Öring (<i>Salmo trutta</i>)								101					242	362				129
Regnbåge (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)														284				
Hornsimpa (<i>Myoxocephalus quadricornis</i>)/Rötsimpa (<i>M. scorpius</i>) ***	982	368	172						460						460			
Sandstubb (<i>Pomatoschistus minutus</i>)	3826	170	890	857	388	259						572			23016			841
Sik (<i>Coregonus maraena</i> -komplex)	2819	4021	265		904	340					624			2135				123
Siklöja (<i>Coregonus albula</i>)	3535								166									
Strömming (<i>Clupea harengus</i>)	10301	1023	53415	295060	85654	189910	146071	739	445	173688	434	192		71815	392	66040	82663	414
Nors (<i>Osmerus eperlanus</i>)	114							203	5510		1212		1319					
Småspigg (<i>Pungitius pungitius</i>)	316	2021	466	125	19115	2111		1014	2140	484	4119	3674	839	2030	770		1536	945
Stensimpa (<i>Cottus gobio</i>)	43632	165324	65377	23274	22312	2940		15777	2766	485	86769		658	8851	1004	748	29270	2023
Storspigg (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	5988	9937	8287	805	44078	24471		912	13619	17822	38954	40455		29343	26732	3095	29588	6059
Tånglake (<i>Zoarces viviparus</i>)****	3227	3068	2872	495	2008	2696				641				2144		828	2764	

Tabell 2B. Relativ biomassa (%) av målarterna fiskar inom varje lokal. Fet stil anger den dominerande arten vid respektive lokal. *Träff på kusttobis/havstobis ** träff på id/stäm *** träff på rötsimpa **** träff på släktet Zoarces (se text för mer information).

Art	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Abborre (<i>Perca fluviatilis</i>)	0.6	0.1	0.3		0.1			0.8	51.5	0.1	13.1	9.6	43.8					
Äl (<i>Anguilla anguilla</i>)											3.6							0.6
Bergsimpa (<i>Cottus poecilopus</i>)	35.6	5.4	12.2	0.4	0.2			1.5		0.3				1.9			0.6	11.3
Braxen (<i>Abramis brama</i>)									0.4		3.3		4.5					
Elritsa (<i>Phoxinus phoxinus</i>)	7.5	18.6	8.0	5.6	46.7	3.4		83.7		0.2	0.1	16.7		0.4	35.6		0.1	36.7
Färna (<i>Squalius cephalus</i>)											0.2							
Gädda (<i>Esox lucius</i>)	0.4		0.3		0.1			1.0	1.3		3.3	6.4	8.4					
Gärs (<i>Gymnocephalus cernua</i>)	1.0	0.1	0.5		0.1			0.8	6.0		0.1							
Gös (<i>Sander lucioperca</i>)									2.1									
Harr (<i>Thymallus thymallus</i>)		1.0																
Kusttobis (<i>Ammodytes tobianus</i>)*	2.9		0.3			0.1												
Id / Stäm (<i>Leuciscus</i> sp.)**	0.3			0.0	0.3				1.0		2.1	0.6	2.4					0.8
Lake (<i>Lota lota</i>)	0.4																	
Benlöja (<i>Alburnus alburnus</i>)									0.4		4.8		3.6					
Mört (<i>Rutilus rutilus</i>)		0.1	0.3		0.1			3.1	11.1		3.5	9.7	31.9					
Öring (<i>Salmo trutta</i>)								0.0					0.4	0.3				0.6
Regnbåge (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)														0.2				
Hornsimpa (<i>Myoxocephalus quadricornis</i>)/Rötsimpa (<i>M. scorpius</i>) ***	0.7	0.1	0.1						0.5						0.6			
Sandstubb (<i>Pomatoschistus minutus</i>)	2.6	0.1	0.5	0.3	0.1	0.1						0.7			28.3			4.0
Sik (<i>Coregonus maraena</i> -komplex)	1.9	1.6	0.2		0.3	0.1					0.3			1.8				0.6
Siklöja (<i>Coregonus albula</i>)	2.4								0.2									
Strömming (<i>Clupea harengus</i>)	7.1	0.4	31.7	86.5	25.7	82.4	100	0.4	0.5	89.4	0.2	0.2		60.0	0.5	93.4	56.3	2.0
Nors (<i>Osmerus eperlanus</i>)	0.1							0.1	5.8		0.6		2.3					
Småspigg (<i>Pungitius pungitius</i>)	0.2	0.8	0.3	0.0	5.7	0.9		0.5	2.2	0.2	2.1	4.7	1.5	1.7	0.9		1.0	4.5
Stensimpa (<i>Cottus gobio</i>)	29.9	66.5	38.8	6.8	6.7	1.3		7.7	2.9	0.2	43.4		1.2	7.4	1.2	1.1	19.9	9.7
Storspigg (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	4.1	4.0	4.9	0.2	13.2	10.6		0.4	14.2	9.2	19.5	51.4		24.5	32.9	4.4	20.2	29.1
Tånglake (<i>Zoarces viviparus</i>)****	2.2	1.2	1.7	0.1	0.6	1.2				0.3				1.8		1.2	1.9	
Summa	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100



Figur 3. Översiktskarta med provtagningslokalerna (röda punkter) och pajdiagram med fördelningen av fiskarter per lokal (% biomassa). De mest dominerande arterna i studien över alla lokaler var, i fallande rangordning, strömming (35 %), elritsa (15%), stensimpa (14%), storspigg (13%), abborre (7%) och bergsimpa (4%). Se tabell 2 för exakta värden för antal träffar och % relativ biomassa. Bakgrundskarta © OpenTopoMap (CC-BY-SA).

Genom uteslutningsmetoden kunde en del fiskar artbestämmas även om de inte direkt gick att identifieras till artnivå med den genetiska markör och det genetiska referensbibliotek som använts. Kusttobis (*Ammodytes tobianus*) identifierades som kusttobis/havstobis (*Ammodytes tobianus* /*A. marinus*) men bedömdes vara kusttobis eftersom havstobis inte förekommer i provtagningsområdet. Id/stäm är så närbesläktade att de inte kunde skiljas åt genetiskt med den markör som använts. Id är också en art som hybridiserar med flera karpfiskar i olika släkten och är väldigt svår att identifiera på artnivå morfologiskt. Tånglake identifierades genetiskt till genusnivå (*Zoarces*) men tånglake (*Zoarces viviparus*) är den enda arten i släktet som förekommer i Östersjön. Hornsimpa (*Trigloporus [tidigare Myoxocephalus] quadricornis*) kunde inte skiljas från rötsimpa (*Myoxocephalus scorpius*) med den använda markören men bedöms troligtvis vara hornsimpa då rötsimpa är ovanligt förekommande i norra Östersjön. För att kunna identifiera alla taxa direkt till artnivå kan fler markörer användas, vilket dock har nackdelen att tiden (och kostnaden) för provanalys ökar. Det genetiska referensbiblioteket som finns tillgängligt förbättras kontinuerligt, främst via olika taxonomiska forskningsprojekt och det är viktigt att detta arbete fortsätter på global nivå. Problematiken med att närbesläktade arter inte alltid kan skiljas åt förekommer även vid traditionella inventeringar av fisk (exempelvis skiljer man inte heller alltid på kusttobis/havstobis i den nationella miljöövervakningen) och är ofta särskilt problematisk när det gäller fisklarver och juveniler.

Två replikat utnyttjades vid eDNA-provtagningen vid varje lokal och dessa visade relativt god samstämmighet med varandra. I de enskilda replikaten detekterades i medel 9,4 arter ($\pm 1,3$ arter, 95 % konfidensintervall) och i de sammanslagna replikaten i medel 10,5 arter ($\pm 2,0$ arter, 95 % konfidensintervall). De ytterligare arter som detekterades i de sammanslagna replikaten hade alla en låg relativ biomassa (någon-några %) vilket visar att det är fördelaktigt med flera replikat om sällsynta arter ska detekteras. Detta måste vägas mot den ökade kostnaden för provtagning och provbearbetning. Att fler arter detekterades i de sammanslagna replikaten och de enskilda proven var statistiskt säkerställt (ensidigt parat t-test, $p < 0,01$).

Svartmunnad smörbult (*Neogobius melanostomus*) detekterades inte i någon av proverna från hamnområdena längs med kusten. Tidpunkten på våren och vattentemperaturen var tillräcklig för att eventuella individer i området bör ha vandrat upp till grundare områden för lek- och födosök (Kornis mfl 2012; Kullander mfl., 2012). Resultaten var väntade eftersom svartmunnad smörbult inte påträffats så långt norrut i Sverige tidigare, även om den på den finska sidan av Östersjön hittats på motsvarande breddgrader.

I studien identifierades flera rödlistade arter. Ål är listad som akut hotad på den svenska och den globala rödlistan (CR). Lake är listad som nära hotad (NT) på svenska rödlistan. Sik är listad som hotad (VU) på den globala rödlistan (Freyhof, 2011). Dessutom identifierades flera arter som är listade i habitatdirektivets bilagor. Stensimpa är listad i habitatdirektivets bilaga 2, arter vars livsmiljö ska skyddas. Siklöja och harr är listade i habitatdirektivets bilaga 5, arter som kan behöva särskilda förvaltningsåtgärder om det finns risk att de minskar p.g.a. insamling eller annan exploatering (exempelvis fiske).

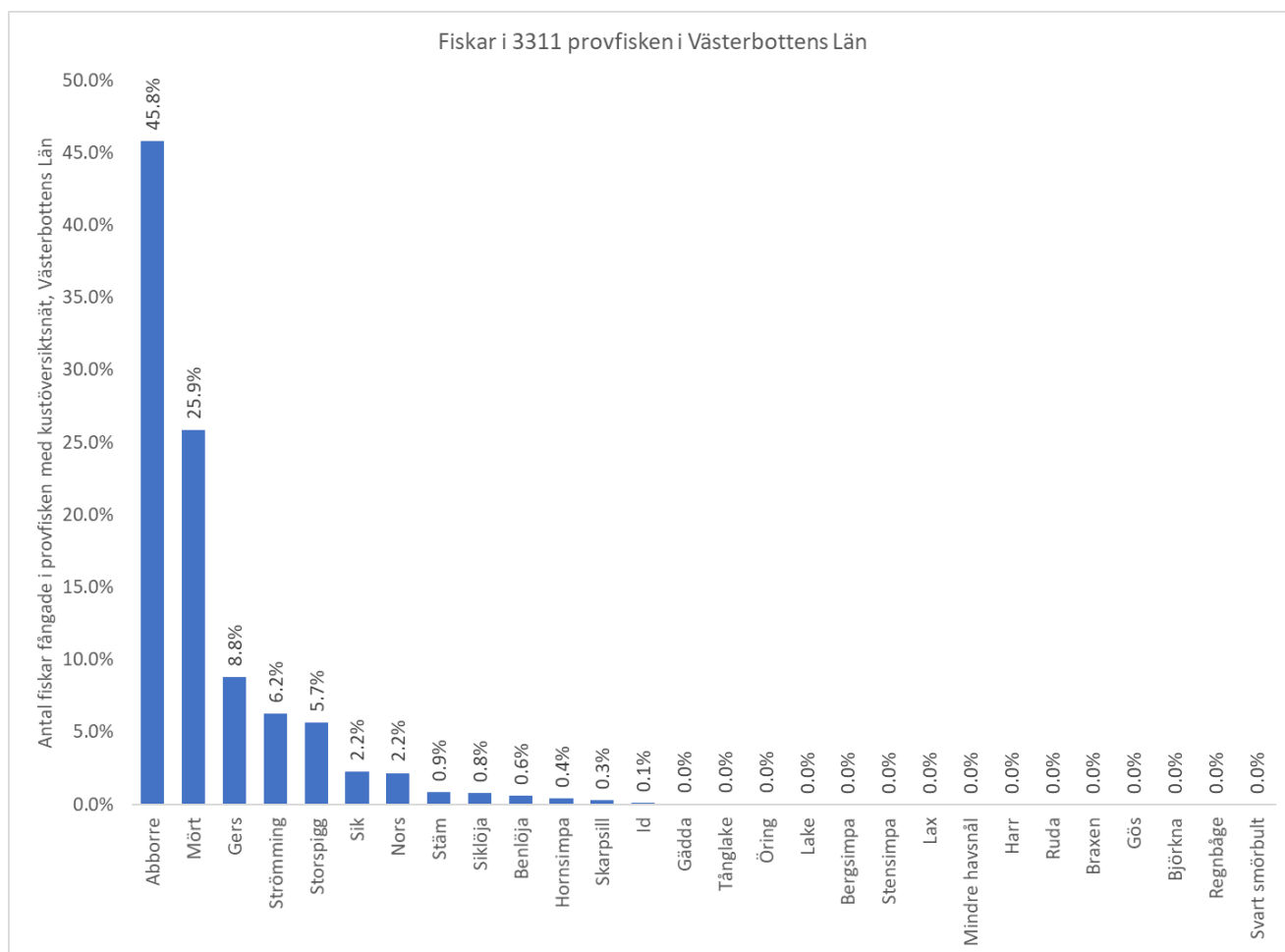
Regnbåge är en art som inte är inhemsk i Sverige och kommer ursprungligen från området runt Stilla havet, men är en art som är vanlig inom vattenbruk. Att regnbåge detekterades vid Hemsöns utsida kan bero på genetiskt material som transporterats med strömmar från den odling som finns ca 5 km från provtagningslokalen, men det kan också röra sig om detektion av en individ som rymt från någon odling. Fyndet av färna i Ångermanälven var något överraskande då arten är väldigt sällsynt förekommande i Norra Sverige men miljön är i övrigt lämplig för arten. Färna förväxlas dock ibland med id och historiska fynd finns registrerade i Ångermanälven 1929 (Länsstyrelsen, 2017). Fisksamhällena som identifierades i studien är typiska för respektive provtagningslokal. Att enbart strömming identifierades vid lokal 7, SÖ Stjälnöhamn beror sannolikt på att arten hade pågående lek i nära anslutning till provtagningsstillfallet. De sex nordligaste lokalerna (1-6) har liknande fiskesamhällen med starka inslag av kallvattensarter (exempelvis bergsimpa, lake och harr) och de sötvattenspåverkade lokalerna 8,9,11-13 har liknande samhällen med starka inslag av varmvattensarter (exempelvis gädda, abborre).

Erfarenheter av eDNA-provtagning och metabarkodning i havsmiljön är i dagsläget begränsade men ny forskning i områden med tidvatten (Kelly mfl, 2018) har visat att strandnära samhällen inventerade med eDNA är liknande mellan tidvattencykler men att det relativa bidraget från icke-strandnära arter till samhället förändras när fysikalisk-kemiska vattenparametrar förändras (dvs när olika typer av vattenmassor kommer in med olika tidvattencykler). En eventuell påverkan av stark pålandsvind vid de provtagna lokalerna skulle kunna ge liknande mönster som tidvatteneffekter men eftersom de strandnära vattenrörelserna är betydligt mindre i Östersjön än i områden med kraftigt tidvatten bör dessa effekter vara svagare och de fiskarter som huvudsakligen detekteras är strandnära arter. Inventeringar med eDNA längs 4 km långa transekter ut från kusten har även visat att inventerade samhällen skiljer sig inom transekterna och att skillnader mellan samhällen ökar med ökat geografiskt avstånd (O'Donnell mfl 2017). En viktig fråga för pågående och framtida studier är hur den rumsliga och temporala spridningen av akvatiskt eDNA fungerar i olika miljöer och hur inventeringsdata matchar traditionella provtagningsmetoder (Shelton mfl, 2016). Det vi kan säga idag är att majoriteten av eDNA-läsningarna för prover tagna i strandnära miljöer representerar den provtagna miljön och kan ha mindre inslag av arter som lever längre ut från stranden genom att DNA transporteras med vattenrörelser.

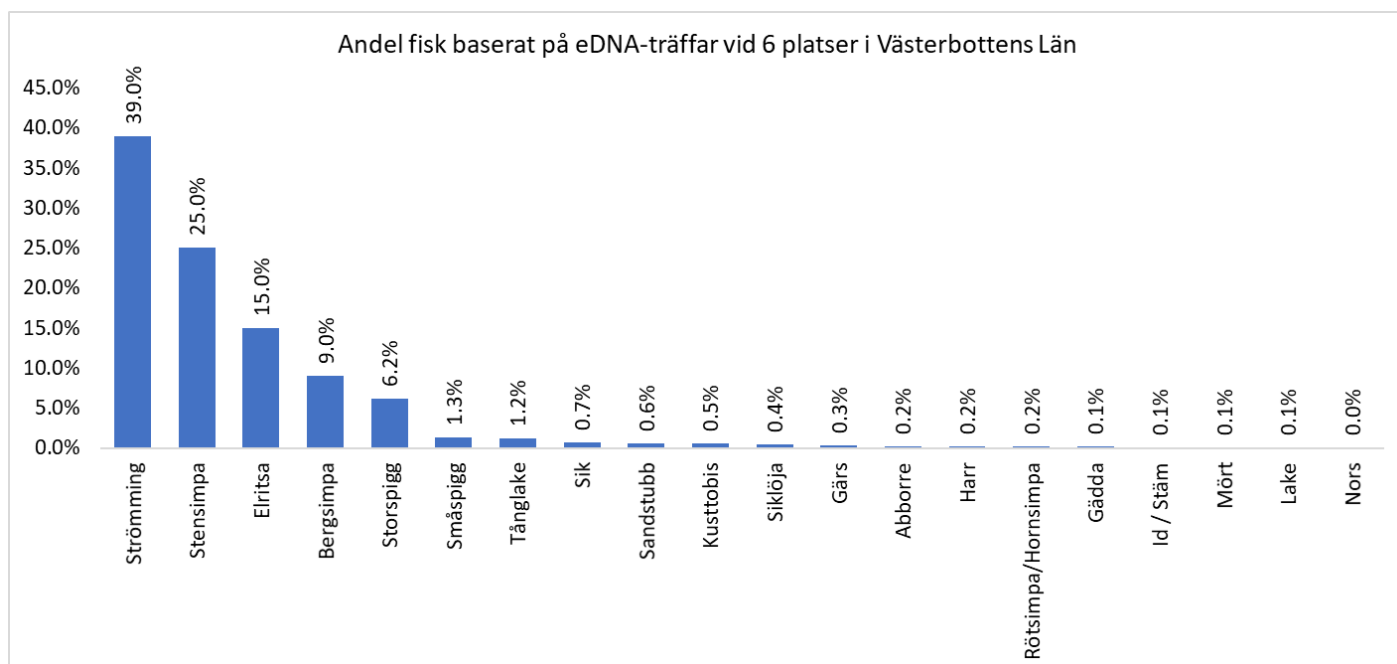
Fisksamhällena inventerade i denna studie skiljer sig rejält från de som normalt detekteras i traditionella provfisken längs med norrlandskusten. Detta är inte förvånande och beror på många faktorer. Till exempel så inriktar sig eDNA provtagningen på en strandnära miljö som sällan provfiskas, nästan alla provfisken i området görs med nätfiske under augusti, vilket gör att både säsong samt provtagningsplats skiljer sig åt (nätfiske måste utföras på djupare lokaler). Det är dessutom väl känt att rörliga och pelagiska arter är överrepresenterade vid nätprovfisken till skillnad från bottenlevande arter. Vid fiskinventeringar med eDNA i sjöar och vattendrag har det visat sig att bottenlevande arter ofta är vanligare än man tidigare trott just på grund av detta metodfel.

För att jämföra förekomst av arter inventerade i strandnära miljöer med eDNA mot tidigare provfiskedata användes tillgängligt provfiskedata i Västerbottens Län (268643 fiskar insamlade vid 3311 provfisken mellan 1989 och 2018. Data från SLU Aquas databas,

dataägare Naturvårdsverket, Länsstyrelsen samt Havs- och vattenmyndigheten). Vid alla sammanställda provfisken i Västerbotten har totalt 28 arter hittats med i medel 4,6 arter per provfiske (standardavvikelse 1,5), att jämföra med eDNA-inventeringens 27 arter. Se Figur 4a och 4b för den relativa fördelningen av fiskarter som hittats. Det är viktigt att notera att provfiskena utförts på helt andra platser samt vid en annan säsong än eDNA-inventeringen, vilket gör en direkt jämförelse omöjlig men några generella slutsatser kan ändå dras. Arter som öring detekterades vid 4 lokaler men förekommer sannolikt vid samtliga lokaler. Dessa prover är dock så extremt strandnära så att förekomst inte är säkert detekterbar för förekommande arter som t ex gös, lax och öring. I framtiden rekommenderar vi att provtagning även sker längre ut i havsbandet för att få mer kompletta data. Tre arter inventerade med eDNA har inte hittats vid något nätprovfiske: elritsa, småspigg och sandstubb. Dessa lever strandnära i augusti och har därför troligen inte hittats vid nätprovfisken. Pelagiska eller väldigt aktiva arter (abborre, mört, gers, strömming) utgör nästan 90 % av alla fiskar som inventerats med nätfiske och bottenlevande fiskar utgör mindre än 1%. Detta kontrasterar mot resultaten från eDNA-inventeringen vilken indikerar att bottenlevande fiskar som stensimpa, bergsimpa och tånglake är betydligt vanligare än så. För att kunna jämföra resultaten från traditionella provfisken i havsmiljön med eDNA-inventeringar måste provtagningarna utföras under samma säsong/tid och på samma lokaler, liknande det som gjorts i sjöar och rinnande vattendrag, vilket skulle vara en lämplig uppföljningsstudie till detta projekt.



Figur 4a. Fiskar fångade vid 3311 provfisken i Västerbottens Län mellan 1989–2018 och deras relativa förekomst.



Figur 4b. Fiskarter inventerade med eDNA vid sex strandnära stationer i Västerbottens Län och deras relativa förekomst baserat på andel eDNA-träffar.

3.2 eDNA-kvalitet samt kvalitetskontroll

Kvalitetskontrollerna samt mängden filtrerat vatten anges i tabell 3 och följer direktiven i bilaga 3. DNA var rent och visade hög kvalitet. Alla negativa kontroller var negativa. De positiva kontrollerna var positiva. Mängden mänsklig kontamination i proverna var extremt låg och låg på 0-0,1 %. Värdena brukar i normalfall ofta ligga upp till 20–30 %. Orsaken att mänskligt DNA i fältnegativ 1 visade 100% är att inget annat DNA fanns i provet. Ko i proverna är en funktion av ko-serum i reagenserna, även här var värdena mycket låga. Då en väldigt hög andel av läsningarna anger målarter är datat tillförlitligt. Ett acceptabelt värde ligger på 40 % beroende på markörer. Två av de negativa fältkontrollerna innehöll väldigt små mängder förväntade kontamineringar (huvudsakligen människa) och två gav inga sekvenser alls.

Tabell 3. Kvalitetskontroll av eDNA och kontroller. Volym anger medelvolum filtrerat vatten i de två replikaten. eDNA koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR. Band på gel av målarter efter PCR visar att provanalyserna har fungerat, PCR negativ innefattar 12 replikat. Andel (%) icke målartsträffar anger hur stor andel av det totala antalet träffar som träffat icke-målarter per prov. Människa (%) anger hur stor andel av träffarna som är på människa i provet.

	Volym filterat vatten (ml)	eDNA konc. (ng/ul)	Inhibering	Anti-inhibition	Band på gel	PCR replikat per markör	Icke-målartsträffar %	Människa (Homo Sapiens) %
1	2640	8.3	Nej	Nej	Ja	12	0,1	0
2	2700	7.6	Nej	Nej	Ja	12	0	0
3	3840	8.3	Nej	Nej	Ja	12	0	0
4	4000	11.2	Nej	Nej	Ja	12	0	0
5	4000	8.0	Nej	Nej	Ja	12	0	0
6	4000	9.0	Nej	Nej	Ja	12	0	0
7	3000	>15	Nej	Nej	Ja	12	0	0
8	3000	10.5	Nej	Nej	Ja	12	0	0
9	3000	11.9	Nej	Nej	Ja	12	0	0
10	3000	11.0	Nej	Nej	Ja	12	0	0
11	3000	>15	Nej	Nej	Ja	12	0	0
12	3000	10.4	Nej	Nej	Ja	12	0	0
13	3000	11.2	Nej	Nej	Ja	12	0	0
14	3000	>15	Nej	Nej	Ja	12	0	0
15	3100	>15	Nej	Nej	Ja	12	0	0
16	3000	9.2	Nej	Nej	Ja	12	0	0
17	3000	>15	Nej	Nej	Ja	12	0	0
18	3000	>20	Nej	Nej	Ja	12	0	0
Fältneg1	500	<0.02	Nej	Nej	Nej	12	100	100
Fältneg2	500	<0.02	Nej	Nej	Nej	12	0	0
Fältneg3	500	0	Nej	Nej	Nej	12	0	0
Fältneg4	500	<0.02	Nej	Nej	Nej	12	100	0
Labneg1	-	<0.02	Nej	Nej	Nej	12	100	45,7
Labneg2	-	<0.02	Nej	Nej	Nej	12	100	0

TACK

Tack till engagerade uppdragsgivare som gav möjlighet till att utföra studien, Jan Åberg för engagemang och indirekt stöd via det parallellt utförda projektet i Robertsfors kommun samt Pähr Hellström för hjälp med fältarbete.

REFERENSER

- Bohmann, K., A. Evans, M. T. P. Gilbert, G. R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, D. W. Yu, och M. de Bruyn. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 29:358 – 367.
- Deiner, K., H. M. Bik, E. Mächler, M. Seymour, A. Lacoursière-Roussel, F. Altermatt, S. Creer, I. Bista, D. M. Lodge, N. de Vere, M. E. Pfrender, och L. Bernatchez. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26:5872-5895.
- Freyhof, J. 2011. *Coregonus maraena*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T135672A4176316. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T135672A4176316.en>.
- Hellström, M & Spens, J. 2017. eDNA - Fiskförekomst i 10 kustmynnande vattendrag, Norrbottens län AquaBiota Rapport 2017:10. 30 sid. ISBN: 978-91-85975-67-9
- Kelly, RP, Port, J.A., Yamahara, K.M. och L.B. Crowder. 2014. Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PloS One* 9 (1): e86175
- Kelly RP, Gallego R, Jacobs-Palmer E. (2018) The effect of tides on nearshore environmental DNA. *PeerJ* 6:e4521 <https://doi.org/10.7717/peerj.4521>
- Kornis, M.S. Twenty years of invasion: a review of round goby *Neogobius melanostomus* biology, spread and ecological implications. *J Fish Biol.* 2012 Feb;80(2):235-85.
- Kullander, O, Nyman, Jilg & Delling, 2012. Nationalnyckeln till Sveriges flora och fauna. Ryggsträngsdjur: Strålfeniga fiskar. Chordata: Actinopterygii.
- 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.
- Länsstyrelsen (2017). Fiskfaunan i Västernorrlands sötvatten - Arter, förändringar och status. Länsstyrelsen Rapport nr 2017:16.
- 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.
- O'Donnell JL, Kelly RP, Shelton AO, Samhoury JF, Lowell NC, Williams GD. (2017) Spatial distribution of environmental DNA in a nearshore marine habitat. *PeerJ* 5:e3044 <https://doi.org/10.7717/peerj.3044>
- 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
- Shelton, A. O., O'Donnell, J. L., Samhoury, J. F., Lowell, N., Williams, G. D., & Kelly, R. P. (2016). A framework for inferring biological communities from environmental DNA. *Ecological Applications*, 26(6), 1645–1659. doi:10.1890/15-1733.1
- Spens, J., A. R. Evans, D. Halfmaerten, S. W. Knudsen, M. E. Sengupta, S. S. T. Mak, E. E. Sigsgaard, och M. Hellström. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793

Bilaga 1. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar

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

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

Enartsstudier qPCR eller ddPCR (ej utfört i denna studie)

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

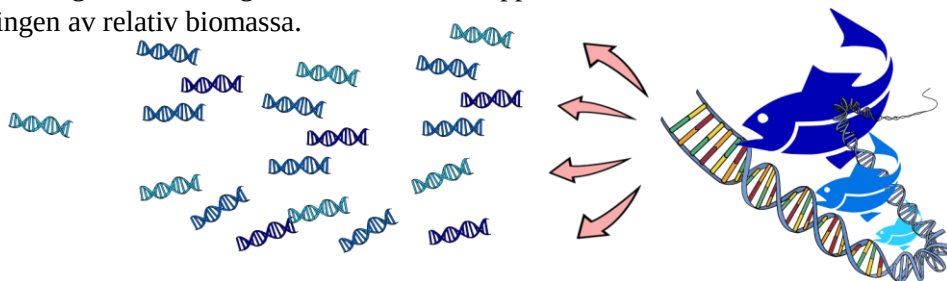
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundanser mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Som exempel kan nämnas att 1000 DNA kopior av gädda inte motsvarar 1000 kopior av abborre och analyserna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

Flerartsstudier –Metastrekkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

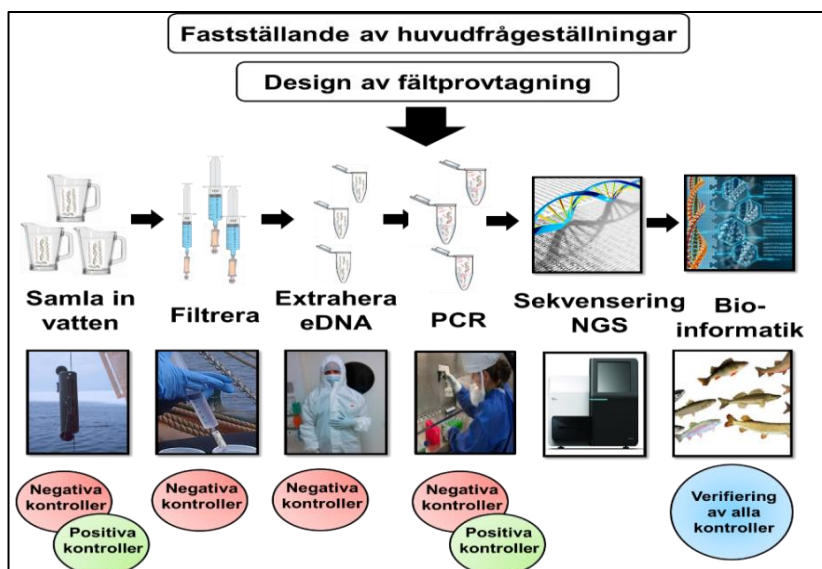
Frågeställningen för flerartsstudier är; **Vilka arter finns här och vilka av dessa är vanliga eller sällsynta?** Med andra ord behöver man inte på förhand veta vad man letar efter.

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

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



Bilaga 2. Kvalitetssäkring av eDNA



Därför är kontrollprover nödvändiga vid eDNA-provtagning

En undersökning med hjälp av eDNA som saknar positiva och negativa kontroller kan inte ge tillförlitliga resultat. Detta gäller egentligen för alla DNA-undersökningar och innefattar alla utövare. **Om en utförare avviker från denna praxis är resultaten inte tillförlitliga och därmed oanvändbara.**

Utöver generella huvudprinciper för DNA-undersökningar (Griffiths m.fl. 2016) finns speciella regelverk för kriminaltekniska (Hedman m.fl., 2017) och medicinska (SFMG, 2011) undersökningar. Strikta riktlinjer för ett standardiserat utövande av eDNA-undersökningar tas just nu fram inom EU med utgångspunkt från Goldberg m.fl. (2016). Dessa regler kommer att kräva negativa och positiva kontroller som ett grundläggande krav.

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

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

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

Positiv kontroll; En positiv kontroll innebär att ett prov som innehåller ett känt DNA testas för att verifiera att den använda metodiken fungerar som den skall. Om DNA-sigener inte hittas i en positiv kontroll innebär det att metodiken måste justeras och analysen eller undersökningen måste göras om.

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

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

Bilaga 3: Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser

1. Mängden insamlat/filtrerat vatten dokumenteras för att kunna avgöra hur mycket prov som samlats in totalt. *Alla eDNA-mätningar ställs i relation till hur mycket vatten som samlats in.*
2. Total eDNA koncentration för samtliga prov (inkl. negativa) anges. *Koncentrationen varierar avsevärt naturligt men ger ändå en första indikation om hur eDNA extraktionen lyckats.*
3. Inhibitionskontroll dokumenteras och redovisas. Inhibition betyder risk för att arter som finns i proverna inte detekteras därför att DNA inhiberas av humus etc. Detta går att åtgärda så länge inhibitionstest utförs. *Resultatet av antiinhibering före och efter utförandet redovisas så att resultatens tillförlitlighet kan bedömas.*
4. Band på gel efter målinriktad PCR dokumenteras (närvaro/frånvaro) inklusive negativa kontroller. *Detta visar att PCR har fungerat och kontroll av vilka prover som har spår av målarter, eller riskerar vara kontaminerade, kan utföras.*
5. Negativa kontroller indelade i a) fält-negativa (filter-negativa) b) extraktions-negativa samt c) PCR-negativa utförs och utfallet redovisas. *Detta möjliggör en kontroll av vilka prover som riskerar vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.*
6. Prov från ett artificiellt sammansatt samhälle ("mock community") används som positiv kontroll vid PCR och sekvensering. Falska positiva prover redovisas. *De positiva proverna försäkrar att PCR och bioinformatiken fungerar som avsett.*
7. Det totala antalet sekvenseringsläsningar, samt andel (%) av målarterna i läsningarna redovisas. *Detta ger en bild av hur väl sekvenseringen av målarterna lyckats.*
8. Andel sekvenser (%) av människa, ko, och gris (vildsvin) och bakterier som förekommer som bakgrundssekvenser redovisas. *Detta möjliggör en kontroll av att tillräckligt många läsningar täcker målarterna.*
9. Minst 12 PCR replikat per art/artgrupp och eDNA prov utförs. Maximalt 4 av dessa sammanslås i sekvenseringen. *Färre replikat minskar analys säkerheten avsevärt.*
10. Antal prover för en specifik MiSeq-körning (sekvensering) överstiger inte 100 stycken exklusive sekvenseringskontroller. *Detta säkerställer att antalet läsningar per prov inte ska bli alltför lågt för att kunna detektera ovanligare arter.*



Referenser: Goldberg, Caren S., m.fl.. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7.11: 1299-1307.

- Griffiths Anthony et al. 2016. An Introduction to Genetic Analysis. 11th edition. WH Freeman. New York. ISBN-13: 978-1464109485.
- Hedman, Johannes m.fl.. 2017. Pre-PCR processing-projektet, P4 Stärkt 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



www.aquabiota.se

