



# eDNA-undersökning av groddjur

Fyreberget, Skaftö – Lysekils kommun



MIX Report 2024:07

MIX Research Sweden AB



MIX Research  
Sweden

# eDNA-undersökning av groddjur Fyreberget, Skaftö – Lysekils kommun

<b>Publicerad av:</b>	MIX Research Sweden AB
<b>Datum</b>	2024-08-15
<b>Författare</b>	Patrick Hernvall, Micaela Hellström, Viktor Birgersson, Gert-Jan Jeunen, Sara Sol Windahl
<b>Omslagsfoto</b>	Patrick Hernvall
<b>Foton och illustrationer</b>	MIX Research Sweden & Jonas Gunnarsson
<b>Fältarbete</b>	Viktor Birgersson, Patrick Hernvall
<b>Kontaktuppgifter</b>	MIX Research Sweden AB Address: Uppsala Science Park, Dag Hammarskjölds väg 34A, 75237 Uppsala E-mail: <a href="mailto:info@mixresearch.se">info@mixresearch.se</a> Phone: 070-782 03 10
<b>Citera som:</b>	Hernvall, P., Helström, M., Birgersson, V., Jeunen, G.J., Windahl Sol, S. 2024. eDNA-undersökning av groddjur. Fyreberget, Skaftö – Lysekils kommun. MIX Research SE Report 2024:07

## 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 till exempel 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 och har visat sig vara användbart för miljöövervakning. eDNA är vidare relativt kortlivat i vattenmassan och ger därför en bild av arters förekomst i nutid.

MIX Research Sweden har på uppdrag av närboende till Fyreberget i Lysekils kommun genomfört en eDNA-undersökning av groddjur på Vägeröds hållmarker. Undersökningen genomfördes i början av maj 2024 i totalt tre dammar. Större- och mindre vattensalamander detekteras i samtliga.

Större vattensalamander omfattas av § 4 i Artskyddsförordningen och Habitatdirektivets bilaga 4 och mindre vattensalamander av § 6 i Artskyddsförordningen. Detta innebär att individer av dessa arter är skyddade samt även att den större vattensalamanderns livsmiljöer är skyddande.

Resultaten från denna undersökning styrker de tidigare omfattande inventeringar som gjorts i området där både större- och mindre vattensalamander påträffats och att föreslagen exploatering av området kan ha en direkt negativ inverkan på arterna och deras livsmiljöer.

# INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning.....	3
1. Introduktion.....	5
2. Metoder.....	6
2.1    Fältarbete.....	6
2.2    Laboratoriearbete.....	7
2.3    Analyser DNA.....	7
3. Resultat.....	7
Referenser.....	9
Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser?.....	10
Bilaga 2. Laboratoriearbete.....	11
Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA-kontroller.....	12
Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas.....	13

## 1. INTRODUKTION

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 (Taberlet m.fl. 2012). Pedersen m.fl. 2015 definierar eDNA som "det DNA som kan studeras från efterlämnade spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet". 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 vilka arter som är närvarande. Detta verktyg är välutvecklat i vattenmiljöer och har visat sig vara användbart inom miljöövervakningen (Harper m.fl. 2018, Lawson-Handley 2015, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017, Bruce m. fl. 2021, Hellström m. fl. 2023). eDNA är vidare relativt kortlivat i vattenmassan (maximalt cirka två veckor beroende på yttre faktorer) och ger därför en bild av arters förekomst i nutid (Brys m.fl. 2021).

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, åtgärder eller tillståndsprövningar etc. Traditionella artinventeringar kan vara både tids- och resurskrävande vilket gör storskaliga undersökningar av arters utbredning och förekomster dyra och svåra att genomföra. Destruktiva inventeringsmetoder påverkar dessutom sällsynta eller hotade arter negativt. Eftersom eDNA-metoden är en icke-dödande metod är den idealisk för kartläggning av biologisk mångfald. Informationen kan användas för att lokalisera områden som kräver traditionella metoder för vidare undersökningar av arter gällande ålder, storleksfördelning och reproduktionsframgång. En korrekt analys och tolkning av eDNA-resultat kräver kontinuerlig uppdatering av traditionell och genetisk taxonomi, molekylära metoder och arters ekologi.

MIX Research Sweden har på uppdrag av närboende till Fyreberget i Lysekils kommun genomfört en eDNA-undersökning av groddjur på Vägeröds hällmarker. Bakgrunden till detta är de fortskridande planer som finns på att exploatera området för bebyggelse.



## 2. METODER

### 2.1 Fältarbete

Fältarbetet utfördes den 10 maj 2024 (Tabell 1, Figur 1 & 2). Innan eDNA-provtagningen genomfördes steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila och DNA-fria produkter. För varje lokal samlades ca fem liter vatten in i form av delprover som slogs ihop till ett samlingsprov för ett representativt resultat (Spens m.fl. 2017, Harper m.fl. 2018, Kačergytė m.fl. 2021, Bruce m.fl. 2021). Provtagningen följde svenska och europeiska standarder för insamling av vatten för eDNA (SIS 2023). Omkring 1 – 1,5 liter vatten från varje station filtrerades direkt på lokalen genom 5 µm GF/0,8 µm PES-inkapslade filterenheter och fixerades direkt på plats innan de transporterades till MIX Research Swedens laboratorier för vidare analyser. Provtagningsutrustning steriliserades mellan lokalerna.

Tabell 1. Information om de undersökta lokalerna.

Lokalnamn	Datum	V ml	T °C H2O	Djup (m)	Koordinat SWEREF 99 TM	
					Nord	Öst
Ormedammen S	2024-05-10	1 000	13	0 – 0,5	6461691	292733
Ormedammen N	2024-05-10	1 500	10,8	0 - 1	6461759	292799
Djupedammen	2024-05-10	1 380	13,8	0 – 1,5	6461777	292799



Figur 1. Översikt av provtagningslokalernas placering i undersökningsområdet.



Figur 2. Bilder över respektive provtagningslokal.

## 2.2 Laboratoriearbete

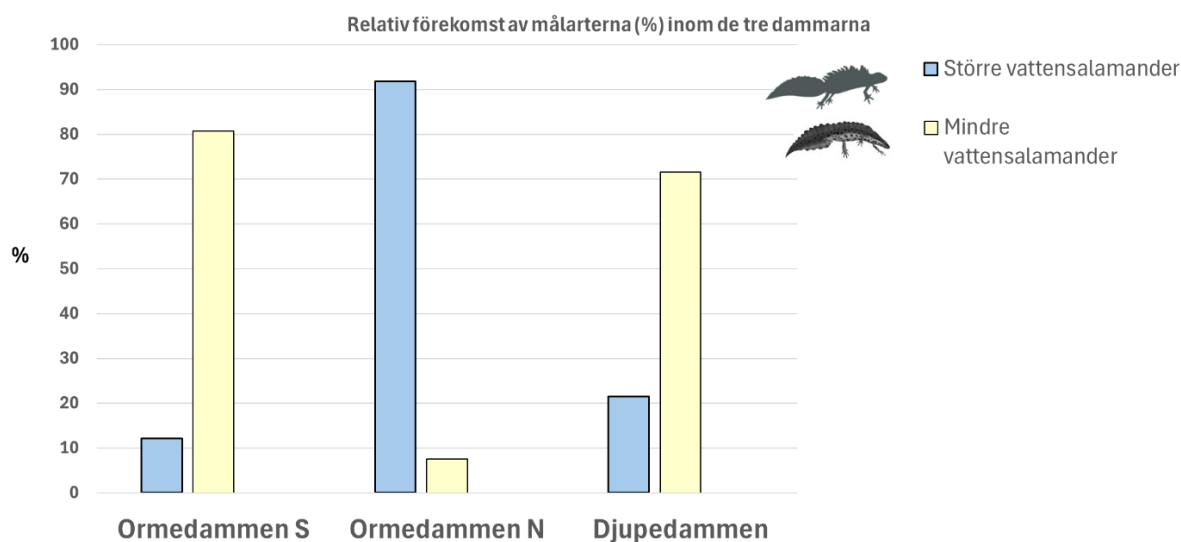
Insamlat eDNA extraherades enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i MIX Research Swedens laboratorier specifikt byggda för analyser av eDNA. Samtliga prover analyserades med flerartsanalys för förekomst av groddjur (Kelly m.fl. 2015). Varje PCR-prov utfördes i 4 replikat som sammanslogs till ett prov under sekvenseringen och erhållna sekvenser matchades i första hand mot den internationella databasen NCBI för att identifiera arternas förekomst. Principerna för extraktioner och flerartsanalyser förklaras utförligare i Bilaga 1 – 4.

## 2.3 Analyser DNA

På en kort region av 12S-genen har groddjur unika arts specifika variationer som kan liknas vid streckkoder som identifierar olika varor i butiker, där varje enskild art alltså innehar en unik DNA-streckkod. Varje gång en sekvens detekteras i sekvenseringsmaskinen, registreras den vilket resulterar i ett specifikt antal detektioner per art. Antal detektioner ger en indikation på arternas relativa biomassa. En art med hög förekomst ger därmed upphov till fler detektioner än en art med låg förekomst. Detta ger en indikation på arternas relativa biomassa. I studier där eDNA-provtagning genomförts några dagar efter att en bestämd biomassa av fisk har planterats ut i en tidigare tom damm påvisades en stark korrelation mellan fiskbiomassa och antalet eDNA-detektioner av respektive art (Li m.fl. 2019). Bioinformatiken beskrivs i Bilaga 2. Kvalitetskontroller anges i Bilaga 3–4.

# 3. RESULTAT

Större- och mindre vattensalamander detekterades i samtliga tre dammar. Sett till sekvensantal var mindre vattensalamander klart dominerande för undersökningen i stort och utgjorde omkring 84 % av den relativa biomassan baserat på de detekterade målarterna. Specifikt för respektive damm gick detta mönster att följa för Ormedammen Syd och Djupedammen medan det omvända förhållandet rådde i Ormedammen N där större vattensalamander hade högre sekvensantal.



Figur 3. Figuren visar den relativa förekomsten (%) av detekterade målarter i respektive damm.

## 4. DISKUSSION

Resultaten i denna rapport visar att eDNA är ett starkt verktyg vid artinventeringar. Fördelen är att provtagning kan ske i svårtillgängliga områden, och eftersom vatteninsamling kräver mindre tid i fält jämfört med traditionella inventeringar, kan undersökningar ske över stor geografisk skala. På detta sätt kan metoden generera stora dataset på ett sätt som tidigare inte varit möjligt. eDNA är ett användbart verktyg i miljöövervakningen och är till nytta för att inventera arter före och efter åtgärder, som vid exempelvis exploatering av tidigare orörda områden.

Resultaten från denna studie stärker bilden av att området hyser goda livsmiljöer och har ett väletablerat bestånd av både större- och mindre vattensalamander. Särskilt större vattensalamander kräver specifika förhållanden för att överleva och reproducera sig, som klart och rent vatten, goda förhållanden på land där den övervintrar, och välbevarade våtmarker för äggläggning. Därför kan förekomsten av denna indikatorart signalera en hälsosam och balanserad miljö. Flera tidigare inventeringar har genomförts på platsen varav den senaste är från våren 2022. Även då påträffades både större- och mindre vattensalamander (Börjesson 2022). I studien av Börjesson (2022) ingick också en översiktlig bedömning av konsekvenser kopplat till en eventuell exploatering av området. I denna landar författaren i att påverkan kan bli stor även om dammarna inte drabbas direkt. Detta genom en indirekt påverkan genom att exempelvis vattenflöden skärs av och påverkar vattenståndet eller att dammarna grumlans eller får en förändrad vattenkemi. Författaren lyfter också att vid en eventuell exploatering skall hänsyn inte bara tas till dammarna utan också till de övervintringsområden på land som tidigare pekats ut i området (se Karlsson m.fl. 2014). Dessa slutsatser är något MIX Reserach Sweden också kan ställa sig bakom och en exploatering som görs utan hänsyn till dessa arter vore direkt olämpligt.



## REFERENSER

- Bruce, K. Bourlat, S. Blackmann, R., **Hellström, M.**, m. fl. & Deiner, K. (2021). A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment". PenSoft Publishers Bulgaria 2021. ISBN 978-619-248-052-3 (paperback), ISBN 978-619-248-053-0 (e-book) DOI: 10.3897/ab.e68634 i press.
- Brys, R., Haegeman, A., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Staelens, A., Auwerx, J., & Ruttink, T. (2021). Monitoring of spatiotemporal occupancy patterns of fish and amphibian species in a lentic aquatic system using environmental DNA. *Molecular ecology*, 30(13), 3097-3110.
- Börjesson, E. 2022. Groddjursinventering, fördjupad artinventering vid Vägeröds hållmarker (Fyreberget), Skaftö Lysekils kommun. Rapport till närboende kring Vägeröds hållmarker, 19 sidor.
- CEN (2023). Water quality - Sampling, capture and preservation of environmental DNA from water. EN 17805:2023 European Standard.
- Deiner, K., H. M. Bik, E. Mächler, M. Seymour, A. Lacoursière-Roussel, F. Altermatt, S. Creer, I. Bista, D. M. Lodge, N. de Vere, M. E. Pfrender, & L. Bernatchez. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26:5872-5895.
- Harper, L. R., Buxton, A. S., Rees, H. C., Bruce, K., Brys, R., Halfmaerten, D., ... & Priestley, V. (2018). Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia*, 1-17.
- Hellström M**, Andersson-Li M, **Birgersson V**, Brys R, Halfmarten D, **Hervall P**, Hänfling B, Näslund J, Sjöstedt J, Spens J, Tang C, Tjärnström M, Öhman M, Bruce K (2023). LifeDNAquatic: Riktlinjer för optimal hantering och analys av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöövervakning. Naturvårdsverket Rapport 7106 mars 2023. ([LifeDNAquatic: Riktlinjer för optimal hantering och analys av akvatiskt eDNA som verktyg inom svensk miljöövervakning \(naturvardsverket.se\)](#))
- Lawson-Handley, L., (2015). How will the "molecular revolution" contribute to biological recording? *Biological Journal of the Linnean Society* 115: 750–766.
- Leese, F., Altermatt, F., Hellström M. + 103 authors & Stenke, D. (2016). DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Research Ideas and Outcomes (Rio)*, 2, e11321.
- Karlsson, L., Franc, N., Ahlén, J. & Svedholm, J. 2014. Inventering av groddjur samt trädgårds och nattskärpa Vägeröd 1:69. Lysekils kommun. Rapport till Serneke.
- Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., & Crowder, L. B. (2014). Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS One*, 9, e86175.
- Li, J., Lawson Handley, L. J., Harper, L. R., Brys, R., Watson, H. V., Di Muri, C., & Hänfling, B. (2019). Limited dispersion and quick degradation of environmental DNA in fishponds inferred by metabarcoding. *Environmental DNA* 1 (3): 238–250.
- Olds, B. P., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Li, Y., Evans, N. T., Turner, C. R., ... Shirey, P. D. (2016). Estimating species richness using environmental DNA. *Ecology and Evolution*, 6, 4214–4226.
- Pedersen, M. W., S. Overballe-Petersen, L. Ermini, C. D. Sarkissian, J. Haile, M. Hellstrom, J. Spens, m. fl. (2015). Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 370:20130383
- Spens, J., A. R. Evans, ... **Hellström, M.** (2017). Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793.

## Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser?

### Enartsstudier - qPCR eller ddPCR

Inventering av förekomst av en enstaka art med eDNA görs med så kallad qPCR eller ddPCR. 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 av den specifika arten.

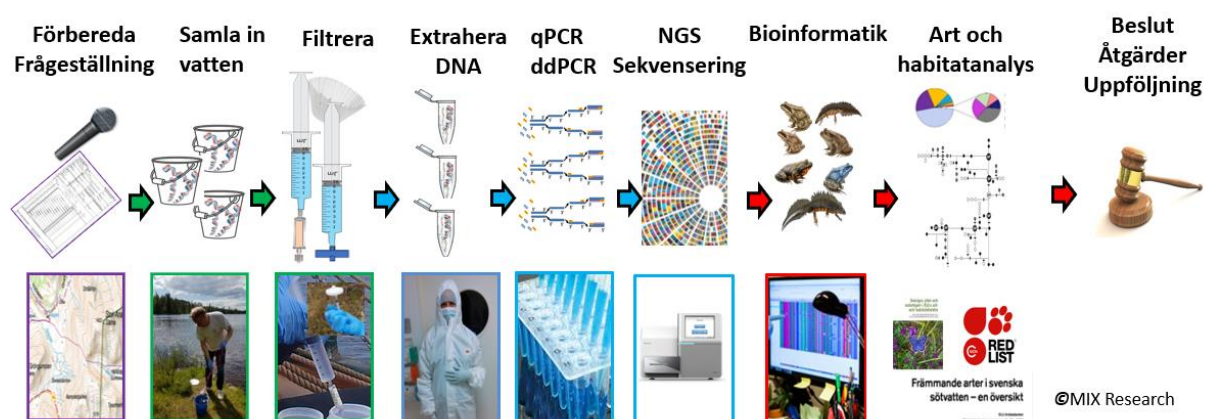
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundansen mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Analystiden för enartsanalyser är kortare än analystiden för flerartsanalyser.

### Flerartsstudier - Metastreckkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)


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 B1-1).

Jämförelser mellan data som erhålls genom enarts- och flerartsanalyser visas i figur B1-2.



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

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

Figur B1-2. Typ av data som erhålls genom enartsanalyser och flerartsanalyser. Enartsanalyserna anger om en art är närvarande eller inte, medan flerartsanalyser resulterar i en artlista samt arternas dominans i förhållande till varandra inom ett prov.

## Bilaga 2. Laboratoriearbete

### **Extraktion**

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

### **Flerartsanalyser**

Flerartsanalyser för vertebrater analyserades med en markör i 12S regionen som detekterar ett större urval av ryggradsdjur (Kelly m.fl. 2015). Varje PCR-prov utfördes i 4 replikat som sammanslogs igen till ett prov under sekvenseringen. Som positiv laboratoriekontroll används ett prov med känd artsammansättning av tropiska arter som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyseras för att säkerställa kvaliteten och tillförlitlighet av resultat.

### **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 2,9 miljarder sekvenser och 19,6 triljoner baspar enligt GenBank och NCBI hemsida (Sayers m.fl. 2023). De olika sekvenserna matchades i första hand mot NCBI-databasen och fick på så sätt fram arternas identitet. Vidare används en 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**

- Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., & Crowder, L. B. (2014). Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS One*, 9, e86175.
- NCBI websida <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Sherry, T.S., Yankie, L. & Karsch-Mizrachi I. GenBank 2023 update, *Nucleic Acids Research*, Volume 51, Issue D1, 6 January 2023, Pages D141–D144, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1012>
- Spens, J., A. R. Evans, ... M. Hellström. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645.

## Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA-kontroller

### **Positiva och negativa kontrollprov**

För tillförlitliga resultat vid eDNA-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 mållartsgrupperna 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 beredskapskapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad provberedning. -Nationellt Forensiskt Centrum, NFC 2017-05-07. NFC Rapport Avdelningskansliet 2017:04.

SFMG, Svensk Förening för Medicinsk Genetik. 2011. Riktlinjer för kvalitetssäkring i klinisk genetisk verksamhet. [http://sfmg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg\\_riktlinjer-for-kvalitetssakring\\_rev101228.pdf](http://sfmg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf)

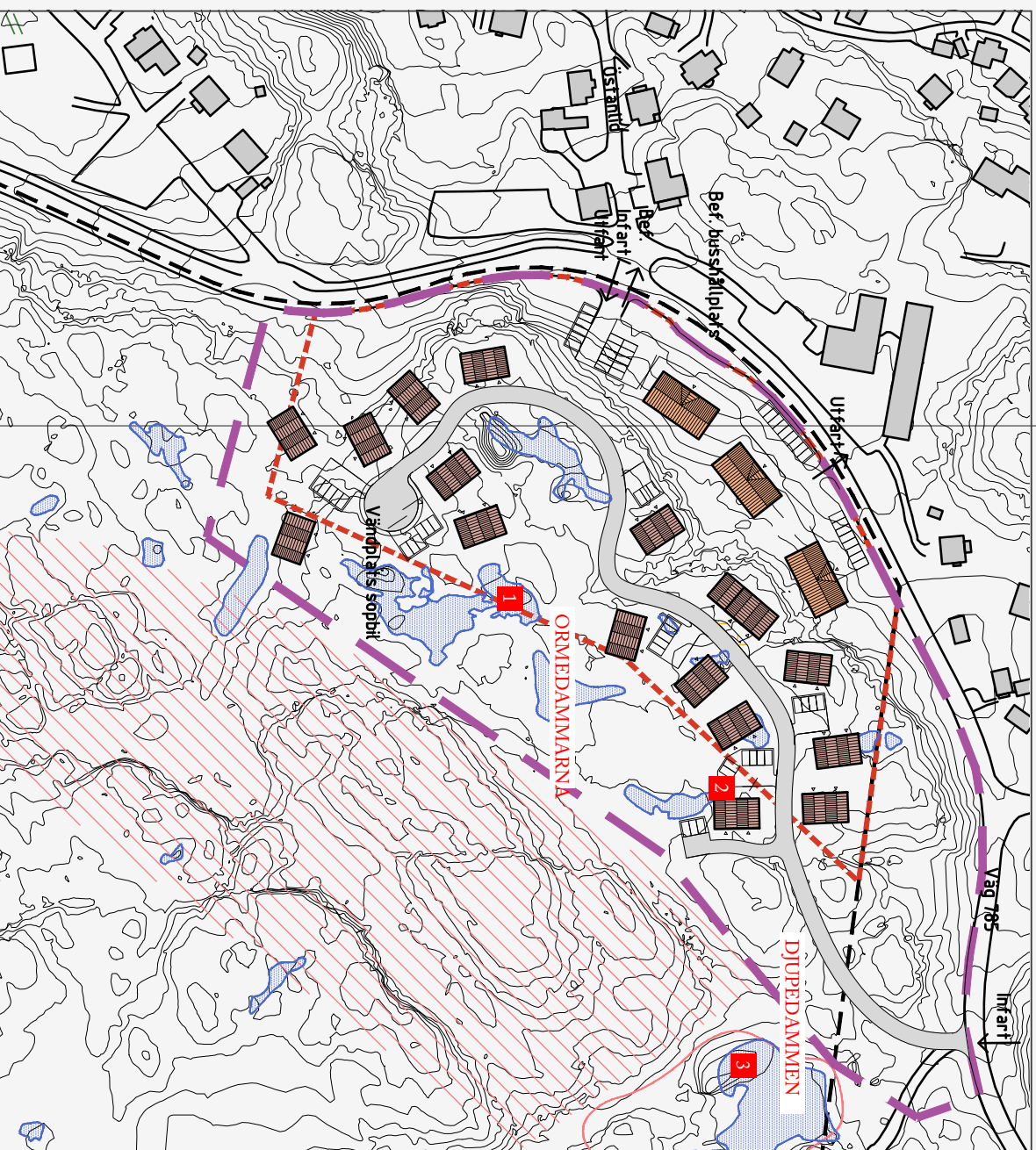
## Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas

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 filtrerats.
2. Inhibitionskontroll dokumenteras. 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.
3. 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.
4. 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 att vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.
5. 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 försäkras att PCR och bioinformatiken fungerar som avsett.
6. 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.
7. 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.
8. Minst 4st. PCR-replikater per art/artgrupp och eDNA-prov utförs. Dessa sammanslås i sekvenseringen. Färre replikater minskar analys säkerheten avsevärt.
9. 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.



## STRUKTUR

## DETALJPLAN VÄGERD 1:69



## DNA Analyser i vatten frn:

1. Ormedamm syd
2. Ormedamm norr
3. Djupeddammen

Detaljplaneområde: ca 37800 kvm

1. Mindre flerbostadshus/parhus: 16st  
BTA (2vån), totalt: ca 5000 kvm

2. Flerbostadshus: 3st  
BTA (3vån + suterräng och vindl), totalt: ca 3700 kvm

Totalt: ca 8700kvm BTA  
ca 65-85 lgh

— DETALJPLANEGRÄNS,

Forslaget tar hänsyn till utpekade naturvärden samt säkerställandet av infartsväg i norr och anpassning av vindplats och placering av väg och byggnader i relation till topografin.

--- UNGEFÄRLIG GRÄNS I POLITISKT BESLUT  
OM DETALJPLAN

— FASTIGHETSGRÄNS - Vägeröd 1:69

/// NATURVÄRDE, hallmark

— NATURVÄRDE, vattensamling

— Vattensamling



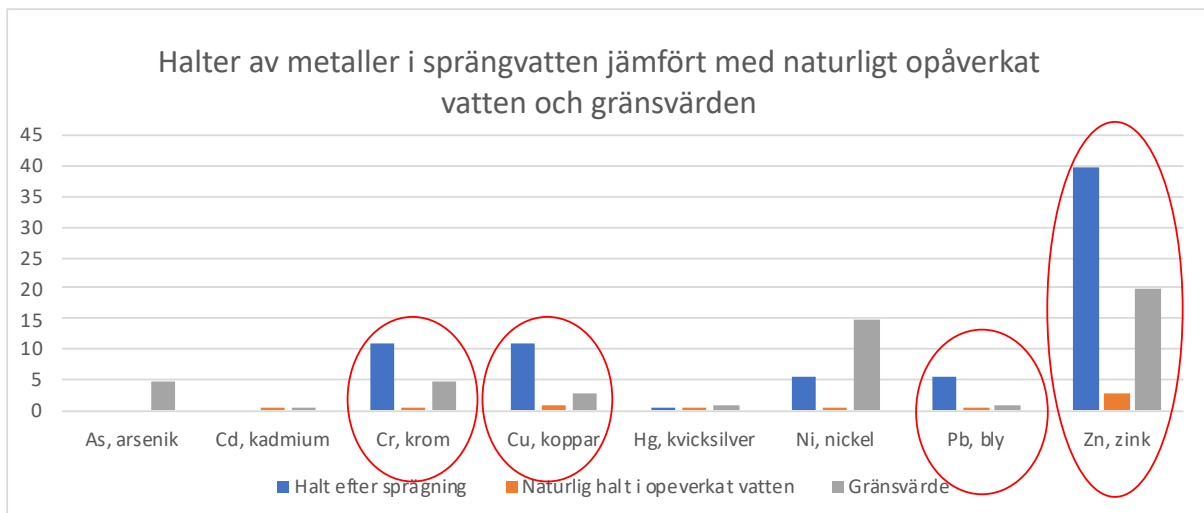
Skala 1:1500, A3

## Bilaga 6 : Metallhalter i vatten

### Metallhalter i vatten efter sprängning jämfört med naturligt opåverkat vatten och jämfört med gränsvärden

För att undersöka hur halter av metaller i dammarna på Fyreberget skulle påverkas vid en eventuell exploatering och sprängning av paragnejsberg vid byggande av nya hus och vägar, togs vattenprover för metallanalyser på ALS Scandinavia, Sveriges ledande ackrediterade laboratorium för miljökemiska analyser. Vattenprover samlades in i rena plastvattenflaskor av närboende (Nils Holmgren och Jonas Gunnarsson), dels från Ormedammen på Fyreberget ("opåverkat vatten"), dels från Grönskult, ett nyexploaterat område i närheten. Grönskult ligger ca 2 km från Fyreberget och har samma bergart (paragnejs) som har nyligen sprängts för anläggning av ett industriområde på Skaftö. Efter sprängning blir vattnet kraftigt brunfärgat, vilket beror på att halter av järn och andra metaller som finns i berget frisätts till lakvattnet. Påverkan av sprängningarna på vattenmiljön i Grönskult är därmed lik den som skulle kunna ske i Fyrebergets dammar, vid en eventuell exploatering där.

Vattenproverna har analyserats för totalhalter av metaller i vatten enligt ALS ackrediterade metod W-SFMS-06 (analys av metaller i förorenat vatten med ICP-SFMS enligt SS-EN ISO 17294-2:2023 och US EPA Metod 200.8:1994, efter uppslutning av ofiltrerat vattenprov med salpetersyra, enligt W-PV-AC). Analyserna inkluderar totalt 19 grundämnen. I figuren nedan visas halter för de tungmetaller som kan orsaka toxiska effekter på vattenlevande organismer. I figuren jämförs halter i det opåverkade vattnet, med halter i sprängvattnet, samt med gränsvärden. Gränsvärdena är halter som har tagits fram av SLU som bedömningsgrunder för metaller i svenska sjöar och vattendrag (Alm, 1999), dvs halter som, om de överskrider, kan orsaka toxiska effekter på känsliga vattenlevande växter och djur.



Från resultaten i figuren ovan, är det tydligt att halterna för flera tungmetaller (Krom, Koppar, Bly och Zink) kraftigt ökar i sprängvattnet och överskrider gränsvärdena. Det visar att sprängningar på Fyreberget skulle kunna ha en negativ påverkan på de skyddade groddjursarterna i området.

Text och sammanställning framtagen av Jonas Gunnarsson, närboende och Professor i marinbiologi och miljötoxikologi vid Stockholms Universitet.

Alm, G., Tröjbom, M., Borg, H., Göthberg, A., Johansson, K., Lindeström, L. och Lithner, G., 1999. Metaller. Bedömningsgrunder för sjöar och vattendrag. Bakgrundsrapport 1. – Naturvårdsverket rapport 4920.