

ALLECO RAPPORT NUMMER 27/2021

Fiskinventering med eDNA från vattenprover.
Dataunderlag för ombyggnad av BV30, Järsövägen och
utbyte av bro nr. 23, 24, 25 och 32

Micaela Hellström & Jouni Leinikki



Alleco

MARINN BIOLOGI OCH LIMNOLOGI KONSULT

Båtbyggargvägen 4

FI-00210 Helsingfors Finland

Tel +358 (0) 45679 0300

Fiskinventering med eDNA från vattenprover. Dataunderlag för ombyggnad av BV30, Järsövägen och utbyte av bro nr. 23, 24, 25 och 32

Utgiven av:	Alleco AB, Finland & MIX Research Uppsala
Datum:	2021-11-29
Uppdragsgivare:	Ålands landskapsregering
Författare:	Micaela Hellström, Jouni Leinikki
Granskare:	Johan Spens, Liselott Rasmussen, Jouni Leinikki
Omslagsbild	MIX Research: Lokal JV_03 samt filtrering i fält.
Foton:	MIX Research; Liselott Rasmussen, Micaela Hellström.
Fältarbete	Liselott Rasmussen, Micaela Hellström
Uppdraget utfördes av:	Alleco Ab. Båtbyggargvägen 4, FI-00210, Helsingfors Finland +358 (0) 45679 0300 & MIX Research Uppsala Science Park, Dag Hammarskjöldsvägen 34, Generalen, 75237 Uppsala +46 70 782 03 10
Rapporten citeras som:	Hellström M. Leinikki J. 2021. Fiskinventering med eDNA från vattenprover. Dataunderlag för ombyggnad av BV30, Järsövägen och utbyte av bro nr. 23, 24, 25 och 32. Alleco Ab Rapport no.27/2021. Hellström M. Leinikki J. 2021. Fiskinventering med eDNA från vattenprover. Dataunderlag för ombyggnad av BV30, Järsövägen och utbyte av bro nr. 23, 24, 25 och 32 – steg 1. MIX Research Rapport 2021:10

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 t.ex. 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 halv liter vatten och med hög precision ange vilka arter som är närvarande i t.ex. en sjö, damm eller flod. Detta verktyg är användbart för miljöövervakningen. eDNA är kortlivat i vatten och ger därför en bild av arters förekomst i nutid. Metoden är metod då det gäller att inventera stora mängder arter på kort tid, vilket ofta kan ge en mer precis bild av artsammansättningen på en lokal jämfört med andra metoder. Metoden är icke-dödande och icke-destruktiv eftersom provtagaren varken behöver röra eller se målarterna.

Den 20–22 augusti 2021 utförde MIX Research, i samarbete med Alleco AB, eDNA fältarbete för att inventera förekomst av fisk på nio lokaler längs med Järsövägen på Åland. Syftet med undersökningen var att generera dataunderlag för en miljökonsekvensbeskrivning med avseende på fisk. Miljökonsekvensbeskrivningen verkar som underlag för beslut om planerad ombyggnad av BV30, Järsövägen och utbyte av bro nr. 23, 24, 25 och 32.

Sammanlagt 29 fiskarter detekterades av vilka 12 hade sötvattens, 12 marint, 3 vandrande, en invasiv och en inplanterad art. Arterna ål och sik är hotade. Elva av de 29 arterna registrerades i varje prov, av vilka abborre var den mest dominerande. Den invasiva svartmunnade smörbulten detekterades på alla lokaler. Arternas förekomst kunde verifieras i område baserat på och information på Ålands Landskapsregerings hemsida och lokalkännedom från boende i området. Kvoten mörtfiskar/abborrfiskar (indikation på övergödning) och sötvattens/marina arter varierade mellan de olika lokalerna.



Detaljbild från lokal JV_10

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning.....	5
1 Inledning.....	9
2 Metoder.....	10
2.1 Fältarbete	10
2.2 Laboratoriearbete	12
2.2.1 eDNA flerartsanalyser	12
2.3 Analyser av fiskesamhällen	12
3 Resultat och Diskussion.....	13
3.1 Sekvenseringsresultat.....	13
3.2 Fiskarternas förekomst i området	13
3.2.1 Diversitet (artmångfald).....	13
3.2.2 Fiskarnas förekomst inom lokalerna samt kvot sötvatten/marina arter.	13
3.2.3 Fiskarnas dominans och relativa biomassa inom lokalerna kvot abborrfisk/karpfisk ..	14
4 Slutord	16
5 Tack.....	16
6 Referenser	16
Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser?	18
Bilaga 2. Laboratoriearbete flerartsanalyser.....	19
Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA - kontroller	21
Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas	21
Bilaga 5: Resultat av kvalitetskontroller för flerartsanalyser	23
Bilaga 6: Fördelning av Artläsningar inom lokalerna.....	24



Havtorn. Detaljbild från lokal JV_09.



Övervuxen blåstång på stenar. Detaljbild från lokal JV_3.

1 INLEDNING

Miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) är samlingsnamnet på de genetiska avtryck som alla levande organismer lämnar efter sig i sin omgivning i form av t.ex. fotspår, svett, slem och fingeravtryck (Pedersen m. fl. 2015). Taberlet m.fl. (2012) definierar eDNA som ”det DNA som kan studeras från efterlämnade spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet”. Eftersom genetiska analyser har utvecklats mycket under det senaste decenniet 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 halv liter vatten och ange vilka arter som är närvarande. Detta verktyg är välutvecklat i vattenmiljöer och har visat sig vara användbart för miljöövervakningen (Harper m. fl. 2015, 2018, Leese m. fl. 2016, Olds m. fl. 2016, Bruce m. fl. 2021). eDNA har visat sig vara kortlivat i vattenmassan och ger därför en bild av arters förekomst i nutid (Li m. fl. 2019, Brys m. fl. 2021). Metoden är icke-dödande och icke-destruktiv.

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

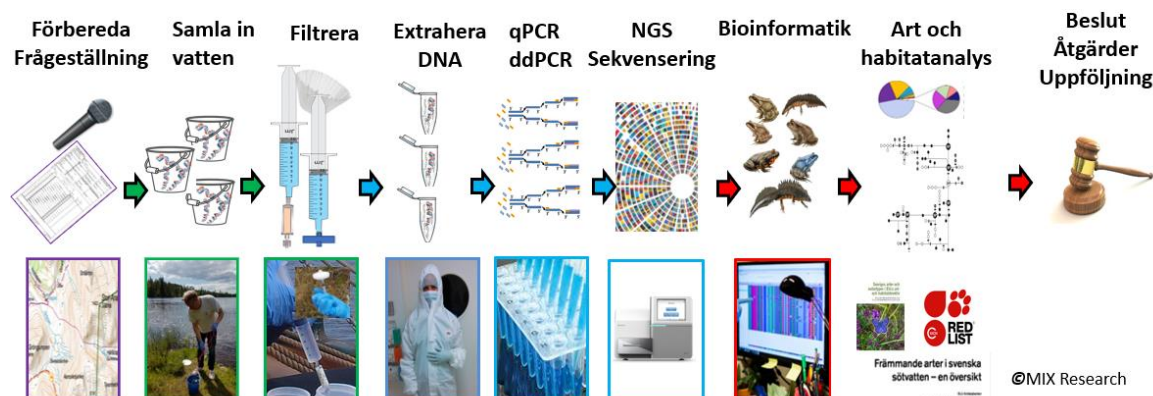
Vidare pågår ett forskningsprojekt som har visat att signalerna släcks ut på korta avstånd på mindre än en km eller då t. ex. rinnande vatten övergår in i en damm eller sjö eller när ett biflöde rinner in i ett huvudflöde (Hellström m. fl. opublicerat data, Cantera m. fl. 2021)

Information om arters förekomst, levnadsvillkor och biologi är grundläggande som underlag för myndigheter då beslut skall fattas om artskydd eller åtgärder och tillståndsprövningar angående infrastruktur. Traditionella artinventeringar kan vara både tids- och resurskrävande vilket ofta gör storskaliga undersökningar av arters utbredning och förekomster ogenomförbara. En korrekt analys och tolkning av eDNA resultat kräver kontinuerlig uppdatering av traditionell och genetisk taxonomi, molekylära metoder samt ekologiska kunskaper och information på hur fysiska och kemiska faktorer påverkar arters utbredning.

Den 20–22 augusti 2021 utförde MIX Research, i samarbete med Alleco AB, eDNA fältarbete för att inventera förekomst av fisk på nio lokaler längs med Järsövägen på Åland. Syftet med undersökningen var att generera dataunderlag för en miljökonsekvensbeskrivning för beslut om planerad ombyggnad av BV30, Järsövägen och utbyte av bro nr. 23, 24, 25 och 32.

2 METODER

Flödesschema för fält- och laboratoriearbete visas i figur 1 och beskrivs i detalj i bilagorna 1 - 4.



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

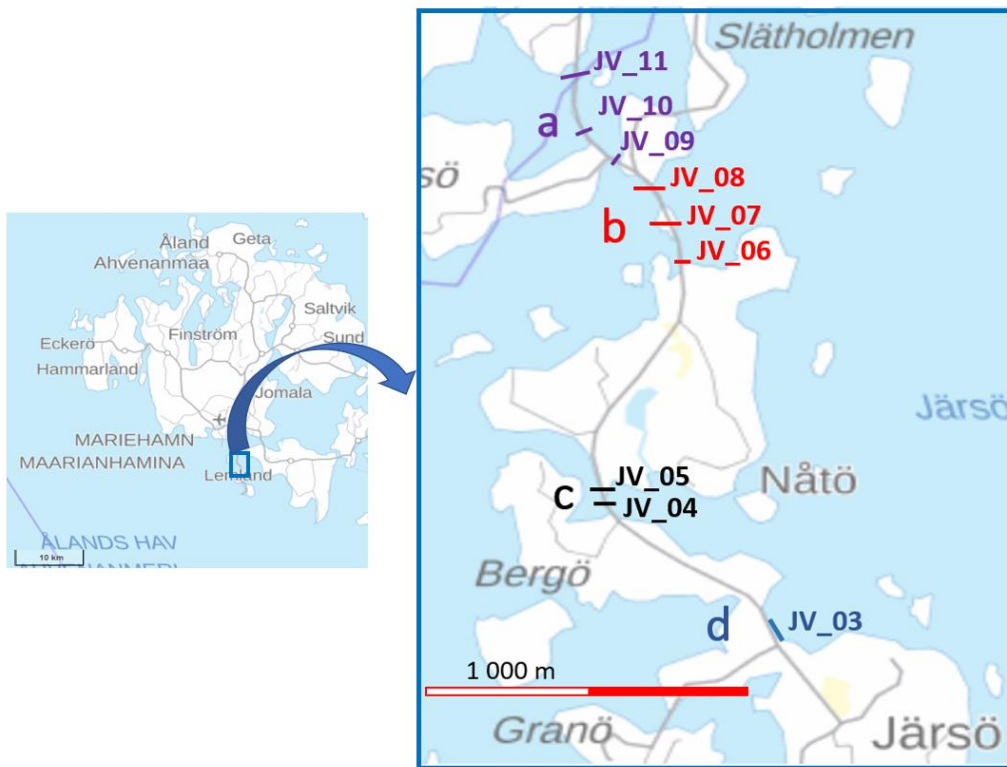
2.1 FÄLTARBETE

Fältarbetet utfördes den 20–22 augusti 2021 i på nio lokaler längs med Järsövägen på Åland, Finland (figur 2,3, tabell 1).

Innan eDNA-provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria kit (NatureMetrics Ltd UK). På varje provlokal togs minst 10 underprover jämnt fördelade över minst 50 meter i vardera riktningen från provpunkten. För varje lokal samlades 5 liter vatten in i form av delprover som slogs ihop till ett samlingsprov för säkrare resultat (Harper m.fl. 2018, Kačergytė m. fl. 2021, Bruce m.fl. 2021). Vid de lokaler där vägen helt blockerade vattnet togs underprover från båda sidor av vägen. Vid varje bro togs prover under bron. Vattnet filtrerades för hand/peristaltisk pump genom NatureMetrics 5 µm GF/0,8 µm PES inkapslade filterenheter. Alla lokaler fotograferades (omslagsbild, figur 3). Medelvolymen filtrerat vatten var 4,4 liter/filter (tabell 1). Provpunkterna registrerades med GPS och vattentemperaturen mättes. Fixering med 96% etanol (molekylär grad 200 proof) följde protokoll enligt Spens m.fl. (2017). Efter avslutat fältarbete skickades de fixerade proven till laboratorier enbart avsedda för eDNA analyser, för genetisk testning.

Provnamn	Date	Time	filtering	Lat WGS84	Long WGS84	V H ₂ O ml	T°C H ₂ O	T°C air	Djup
JV_03	20/08/2021	19:56	21:30	60.026819	19.988768	4700	17	15	0.5
JV_04	20/08/2021	20:29	20:50	60.033689	19.968716	3900	18	15	0.5
JV_05	20/08/2021	20:40	21:05	60.035804	19.966896	3500	17	15	0.5
JV_06	21/08/2021	17:29	19:30	60.051580	19.973392	4800	17	15	0.5
JV_07	21/08/2021	17:37	19:50	60.049962	19.974015	5200	17	15	0.5
JV_08	21/08/2021	18:03	20:39	60.053730	19.970556	4500	17	15	0.5
JV_09	22/08/2021	08:55	10:15	60.055861	19.964926	4400	17	15	0.5
JV_10	22/08/2021	09:16	11:00	60.057060	19.961951	4700	17	15	0.5
JV_11	22/08/2021	08:42	09:53	60.060390	19.959432	3800	17	15	0.5

Tabell 1. Provpunkter. Provnamn, datum, tidpunkt vid eDNA provtagningen, tidpunkt vid filtrering, koordinater (WGS 84), total volym filtrerat vatten angivet i ml vatten och lufttemperatur och provtagningsdjup.



Figur 2. Karta över provtagningsområdet samt utsatta provpunkter. Kartunderlag med tillstånd från lantmästerverket i Finland (<https://www.maanmittauslaitos.fi/sv/kartor-och-geodata>). Provlokaler indelas i områden a-d (färgkodade) för att vara jämförbara med Saari (2021).



Figur 3. Bilder från provtagningslokalerna vid Järsövägen (JV_03-JV_11)

Denna undersökning är en del av en serie av flera inventeringar i området och provpunkter samt kartor anpassades till tidigare inventeringar av makrofyter och kransalger (Saari 2021 Laine 2021)

2.2 LABORATORIEARBETE

Flödesschema för fält- och laboratoriearbete sammanfattas i figur 1 och beskrivs i detalj under sektion 3.1 samt i bilagorna 1 – 4. Bakgrund för enarts- och flerartsanalyser beskrivs i bilaga 1. Markörer och laboratoriearbete samt dataanalys för flerartsanalyser använda i denna undersökning - Se bilaga 3 och 4 för kontroller och skallkrav. Kvalitetskontroller anges i bilaga 5. Eftersom flera olika artgrupper undersöktes gjordes separata analyser från ett och samma eDNA-prov för att undersöka artförekomster (Figur B2_1 bilaga 2).

2.2.1 eDNA flerartsanalyser

Bioinformatiken beskrivs i bilaga B.2.3 (anger relativ biomassa från mest till minst dominerande art). Antalet läsningar i ett prov ger en uppfattning om den relativa förekomsten av arten vid en punkt. Kvalitetskontroller samt skallkraven beskrivs i bilaga 3 och 4.

2.3 ANALYSER AV FISKESAMHÄLLEN

På samhällsnivå (alla arter) undersöktes inom de olika lokalerna och delområden:

- 1) Diversitet eller artmångfald d.v.s. total antal arter
- 2) Antalet sötvattensarter/marina arter antal vandrande och främmande arter
- 3) Biomassa (andelen av antal eDNA läsningar per undersökningslokal) och art
- 4) Kvoten av relativ biomassa abborrfiskar/mörtfiskar som ett mått på övergödning

3 RESULTAT OCH DISKUSSION

3.1 SEKVENSERINGSRESULTAT

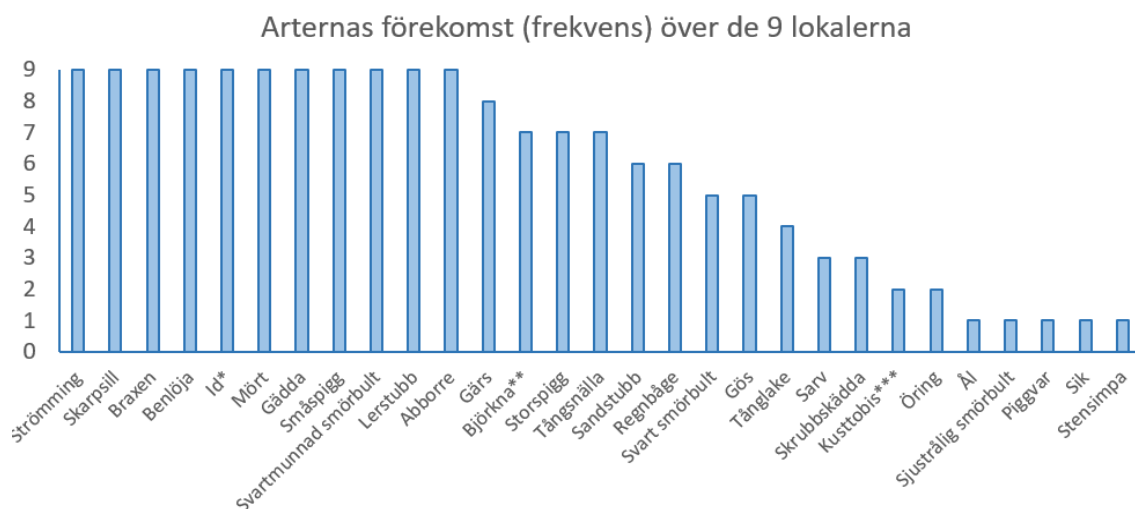
eDNA proverna visade hög kvalitet och kontrollerna fungerade som förväntat (bilaga 3). Resultaten och redovisas i bilaga 5. Antal läsningar per art och lokal redovisas i bilaga 6.

I denna undersökning identifierades 29 unika fisksekvenser. Tjugosex av dessa kunde genast identifieras på artnivå medan tre arter visade artkomplex och kunde vara en av två arter. Dessa var id/stäm, björkna/vimma och kusttobis/havstobis som annoterades som id, björkna respektive kusttobis. Denna indelning baserades på bakgrundsinformation om arters närvaro i området.

3.2 FISKARTERNAS FÖREKOMST I OMRÅDET

3.2.1 Diversitet (artmångfald).

Av de 29 arterna som detekterades var abborre vanligast och 11 arter förekom på alla lokaler. Ål som är en hotad art enligt IUCN ((EN) hittades på en lokal och den nära hotade siken som är sårbar (VU) registrerades vid en lokal (figur 5). Den invasiva arten svartmunnad smörbult var närvarande på alla nio lokaler, och visar att arten har etablerat sig på Åland. Figur 5 visar på hur många lokaler de olika arterna förekom på av totalt nio lokaler.



Figur 5. Arternas frekvens över alla provtagningslokaler (n=9). Figuren visar att 11 arter förekom på alla lokaler medan 5 arter enbart detekterades på en lokal. * anger artkomplex.

3.2.2 Fiskarnas förekomst inom lokalerna samt kvot sötvatten/marina arter.

De 29 fiskarternas förekomst inom de olika lokalerna och deras ursprung visas i tabell 2. Under arterna anges deras ursprung av marina (12 arter) sötvatten (12 arter), vandringsarter (3 arter), inplanterade arter (1 art) och invasiva arter (1 art). Tabell 3 visar kvoten inom varje lokal samt inom områden a-d. Strömning och skarpsill (vassbuk) utgjorde 5,6% respektive 1,1% av biomassan.

Tabell 2. Arternas förekomst inom de olika lokalerna. Närvaro anges med X. Varje rad representerar en undersökningslokal. Antal fiskarter per lokal anges under # arter. Fiskarnas ursprung indelade i marina (M), sötvatten (F från engelskans freshwater), vandringsarter (V) och introducerade arter (IN). Samt inplanterade arter (P). Arter i rött är hotade. Förekomst av fiskar över lokalerna anges under frekvens och i figur 5.

# arter	Ål	Strömming	Skarpsill	Braxen	Benlöja	Id*	Mört	Sarv	Björkna**	Gädda	Småsigg	Storsigg	Kustobis**	Svart smörbult	Sjustrålig smörbult	Svartmunnad smörbult	Lerstubb	Sandstubb	Gärs	Abborre	Gös	Tånglake	Skrubbskädda	Piggvar	Regnbåge	Öring	Sik	Stensimpa	Tångsnälla
	V (EN)	M	M	F	F	F	F	F	F	F	M	M	M	M	IN	M	M	F	F	F	M	M	M	P	V	V (VU)	F	M	
JV_03	20	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
JV_04	19		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
JV_05	18		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
JV_06	22		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
JV_07	22		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
JV_08	15		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
JV_09	17		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
JV_10	18		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
JV_11	18		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Frekvens		1	9	9	9	9	9	3	7	9	9	7	2	5	1	9	9	6	8	9	5	4	3	1	6	2	1	1	7

Tabell 3 Kvoten av fiskarnas ursprung baserat på antal sötvattensarter (F) i förhållandet till marina arter (M). F/M anger kvoten. Kvoten anges för varje lokal JV_03 - JV_11 (F/M) och varje område (a-d) (sum F/M). se karta figur 2.

	a			b			c		d
	JV_11	JV_10	JV_09	JV_08	JV_07	JV_06	JV_05	JV_04	JV_03
F	11	10	10	9	10	10	9	10	8
M	6	7	5	4	9	9	7	7	9
F/M	1.83	1.43	2.00	2.25	1.11	1.11	1.29	1.43	0.89
sum F/M		1.38			1.09		1.1		0.89

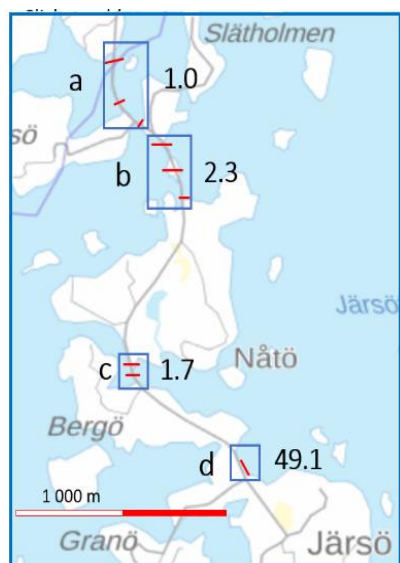
3.2.3 Fiskarnas dominans och relativa biomassa inom lokalerna kvot abborrfisk/karpfisk

Den relativa mängden av fisk inom varje lokal (% av fiskarna som förekommer inom lokalen) visar att abborre tar upp nästan hälften av biomassan på de flesta lokaler (figur 6) medan gärs och gös är mindre vanliga. Relativ biomassa innebär att varje art har en unik DNA sekvens, varje gång sekvensen för en art blir läst registreras läsningen. En art som det finns mycket av ger upphov till fler läsningar än en art som det finns litet av. Arternas dominans inom lokalerna visas i figur 6. Jämförelser i experiment där fiskar av flera olika arter vägts och sedan släppt ut i en fisktom damm, för att efter några dagar ta eDNA prov för att jämföra proportionerna av biomassa visade en stark korrelation mellan fiskvikt och antal eDNA läsningar inom dammen (Li m.fl. 2019, DiMuri (2020)).



Figur 6. Bubbeldiagram som visar dominansförhållanden och relativ biomassa av arter INOM de 9 olika provlokalerna (rader). Varje rad summeras upp till 100% och ger en uppfattning av arter med högre och lägre biomassa. Totala antalet läsningar godkända efter bioinformatikfiltreringen finns i bilaga 6.

Abborren var den dominerande abborrfisken och stod för 45 % av det totala antalet läsningar över lokalerna följt av gärs (2,0%) och gös (0,5%) bland abborrfiskarna. Karpfiskarna stod för 26% av läsningarna av vilka braxen stod för nästan hälften. För mycket karpfiskar som äter bottenfauna och kräftdjur orsakar dessa äter påväxtalger på undervattensväxter. Kvoten mellan biomassa av abborrfiskar i förhållande till biomassa av karpfiskar indikerar övergödningens status i ekosystemet. En hög kvot indikerar god status en låg kvot indikerar övergödning och förhöjda närsalter i miljön. Abborrfiskar i denna undersökning representerades av abborre, gärs och gös medan karpfiskarna bestod av braxen, benlöja, björkna, id, mört och sarv. Abborren är den vanligaste rovfisken i kustekosystemet och utgör därför en nyckelart. Mycket abborre indikerar en bra status för systemet.



Figur 7. Kvot abborrfiskar/karpfiskar som mätt på möjlig övergödning. Ett högt värde visar goda förhållanden. Kvoten anges i område a-c indelat enligt Saari 2021.

Område d (prov JV_03) visade en hög abborrfisk/karpfisk kvot, som markant skiljde sig från de andra områdena. Område d uppvisade 20 arter av vilka ål, sik och stensimpa var unika för denna lokal. Även förhållandet sötvattensarter/marina arter visade att de marina arterna dominerade i samma lokal.

4 SLUTORD

Resultaten i denna rapport visar att området runt Järsövägen är fiskrikt och visade ett stort antal arter. Resultaten indikerade även att området på västra sidan om Granö/Järsö visade minst övergödnings indikatorarter och även betydligt mera marina arter.

Denna undersökning visade även att eDNA detekterar fler arter än konventionella metoder eftersom blyga, sällsynta och svårfångade arter upptäcks då de avger genetiska spår i vattnet.

För undersökningar av biologisk mångfald och dominans av arter är eDNA ett mycket effektivt verktyg för naturinventeringar. En stor fördel är även att eDNA inte skadar eller skrämmer målarterna. År 2018 på svenska sidan av östersjön dödades ca 6,1 miljoner fiskar vid provfisken. Däremot är provfisken en viktig metod för uppföljning av ålder, reproduktion och storleksklasser och en kombination av metoderna har potential att ge en god insikt i artmångfalden i olika områden på kort tid.

5 TACK

Ett stort tack Liselott Rasmussen för förberedande av och deltagande i fältarbete. Ett stort tack till lokalbefolkningen som berättade om fiske på Åland och som visade stort intresse för fältarbetet. MoRe Research utförde eDNA extraktioner enligt författarens protokoll. NatureMetrics Ltd utförde NGS laborationer.

6 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 published Dec 2nd 2021
- 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.
- Cantera, I., Decotte, J. B., Dejean, T., Murienne, J., Vigouroux, R., Valentini, A., & Brosse, S. (2021). Characterizing the spatial signal of environmental DNA in river systems using a community ecology approach. *bioRxiv*, 2020-10.
- 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.
- Di Muri C, Lawson Handley L, Bean CW, Li J, Peirson G, Sellers GS, Walsh K, Watson HV, Winfield IJ, Hänfling B (2020) Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. *Metabarcoding and Metagenomics* 4: e56959.
- Harper, L. R., Buxton, A. S., Rees, H. C., Bruce, K., Brys, R., Halfmaerten, D., ... & Priestley, V. 2018. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia*, 1-17.
- Kačergytė, I., Petersson, E., Arlt, D., *Hellström, M.*, Knape, J., Spens, J., Žmihorski, M. & Pärt, T. (2021). Environmental DNA metabarcoding elucidates patterns of fish colonisation and co-occurrences with amphibians in temperate wetlands created for biodiversity. *Freshwater Biol.* 66, 1915–1929.
- Laine, A. 2021. Naturinventering under vatten för ombyggnad av BV30, Järsövägen och utbyte av bro nr 23, 24, 25 och 32 – steg 2 Alleco Ab rapport nr 22/2019 Alleco Ab 11.11.2021.
- Lawson-Handley, L., 2015. How will the "molecular revolution" contribute to biological recording? *Biological Journal of the Linnean Society* 115: 750–766.

- Leese, F., Altermatt, F., *Hellström M.* + 103 authors & Stenke, D (2016). DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Research Ideas and Outcomes (Rio)*, 2, e11321.
- Li, J., Lawson Handley, L. J., Harper, L. R., Brys, R., Watson, H. V., Di Muri, C., & Hänfling, B. (2019). Limited dispersion and quick degradation of environmental DNA in fish ponds inferred by metabarcoding. *Environmental DNA* 1 (3): 238–250.
- 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.
- 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.
- Olsson J, Bergström L. 2017. Bättre samordning gagnar kustfisken. 2017. Havsutsikt 2/2017. Uppdaterad 2020.
- 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
- Saari, P. 2021. Naturinventering under vatten för ombyggnad av BV30, Järsövägen och utbyte av bro nr 23, 24, 25 och 32 – steg 1 Alleco Ab rapport nr 06/2019 Alleco Ab 29.07.2021.
- Spens, J., A. R. Evans, ... *M. Hellström*. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793
- Östersjön.fi https://www.ostersjon.fi/sv-FI/Naturen_och_dess_forandring/Arter/Fiskar/Fiskbestanden_pa_Aland

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. Provsvaren anger närvaro/frånvaro av den specifika arten

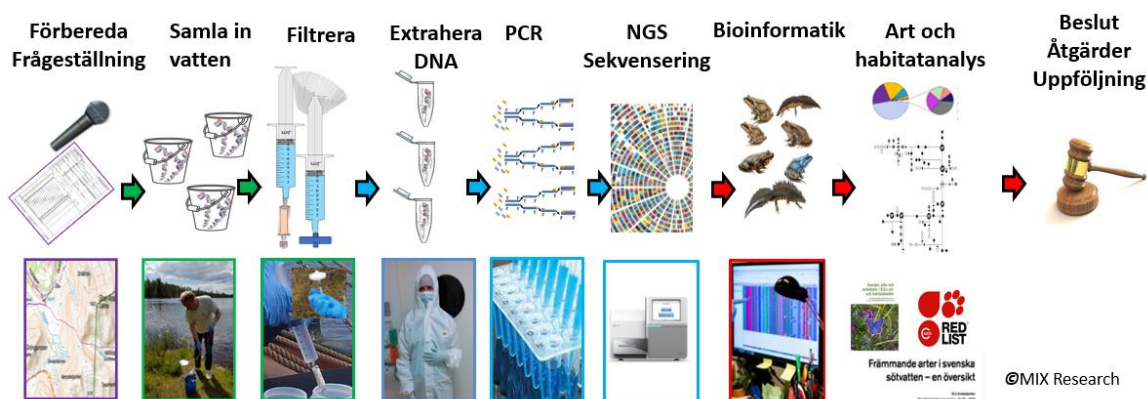
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundansen mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Analystiden för enartsanalyser är kortare än analystiden för flerartsanalyser.

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
		Artlista Dominans
	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 fås genom enartsanalyser och flerartsanalyser. Enartsanalysen anger närvaro/frånvaro av en art. Flerartsanalyser ger en artlista samt arternas relativa dominans i förhållande till varandra inom ett prov.



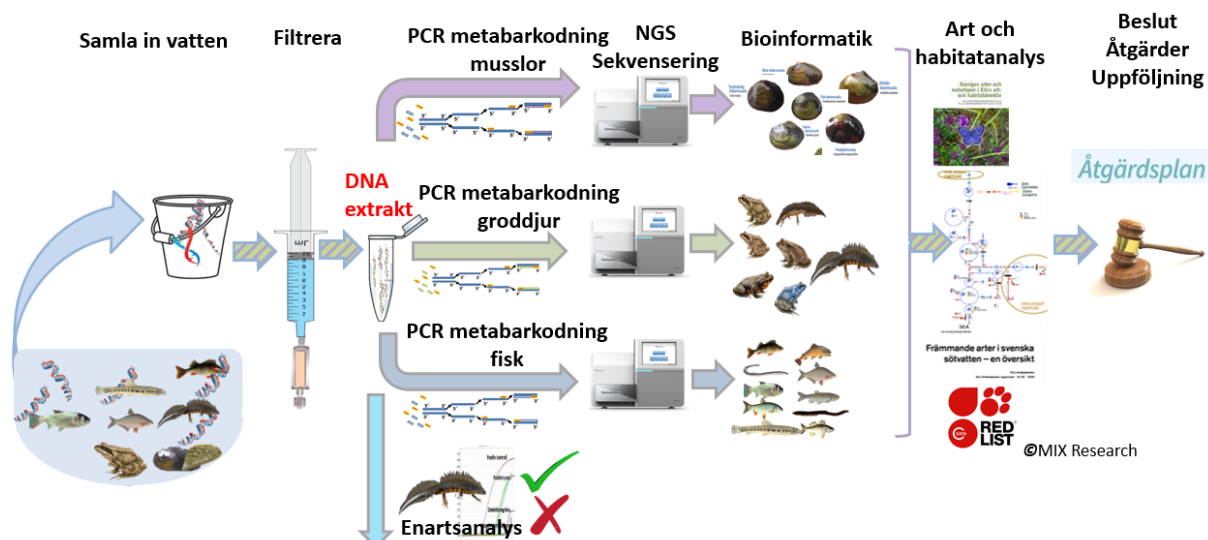
BILAGA 2. LABORATORIEARBETE FLERARTSANALYSER

B.2.1 EXTRAKTION

eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll för slutna filter i etanol från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Ett tillägg i protokollet var att pelleten från alkoholextraktionen, samt det slutna filtret lyserades separat och lysaten sammanslogs efter inkubation i 56°C till ett prov. Detta gjordes för att ta tillvara så mycket DNA som möjligt.

B.2.2. PCR

För alla analyser gäller att; Varje PCR-prov utförs i 12 replikat som sammanslås under bioinformatiken. Som positiv laboratoriekontroll används ett prov med känd artsammansättning av tropiska fiskar som standard för jämförelse. Negativa kontroller (Bilaga 3) analyseras för att säkerhetsställa kvaliteten och tillförlitlighet av resultat. Från ett och samma eDNA prov kan flera analyser på olika taxa analyseras parallellt (figur B2_1). Observera att de olika artgrupperna inte kan sekvenseras samtidigt eftersom PCR produkterna varierar i längd mellan markörer. Sekvenseringsprotokoll och bioinformatik anges i Kačergytė m. fl. 2021.



Figur B2-1. Ett och samma eDNA prov kan analyseras parallellt för flera olika taxa med separata analyser.

B.2.2.1 Fisk

Flerartsanalyserna för fisk genomfördes med en markör som läser en hypervariabel 325 bp region på 12S rRNA genen och protokoll enligt Miya, m.fl. (2015). Ett undantag i protokollet var att det andra basparet på framåt primern byttes ut för att matcha europeiska fiskar och vidare anpassades 5' delen av primern med ett överhäng för att matcha Illumina Nextera Index markörer (För full beskrivning se Kačergytė m. fl. 2021, överhäng förklaras på NGI websidan (National Genomics Infrastructure, Illumina 16S)).

B.2.3. 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 450 000 kända arter finns tillgängliga med 1 miljard sekvenser och 6,25 triljoner baspar enligt GenBank och NCBI:s hemsida (Sayers, m. fl. 2020). De olika sekvenserna matchas mot databasen och får på så sätt 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 - i stället för enbart familje- eller genusnivå. Antalet läsningar per art ger en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov. Bioinformatiken för samtliga taxa finns även beskrivet i Kačergytė m. fl. 2021 där flödesschemat är anpassat för markörerna.

Referenser

- Kačergytė, I., Petersson, E., Arlt, D., Hellström, M., Knape, J., Spens, J., Žmihorski, M. & Pärt, T. (2021). Environmental DNA metabarcoding elucidates patterns of fish colonisation and co-occurrences with amphibians in temperate wetlands created for biodiversity. *Freshwater Biol.* 66, 1915–1929.
- 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.
- Miya, M., Gotoh, R.O. & Sado, T. (2020). MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fish Sci* 86, 939–970.
- (2021) NCBI websida <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Riaz T, Shehzad W, Viari A, Pompanon F, Taberlet P, et al. (2011). ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 39: e145.
- Sayers, E.W., ..., Karsch-Mizrachi, I. (2020). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 48: D84-D86.
- 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.
- (2021) National Genomics Infrastructure, Illumina 16S. <https://ngisweden.scilifelab.se/methods/illumina-16s-sequencing/>



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 ex. Nuclease Free Water från Fishing 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 målartsgrupperna 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://sfgm.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfgm_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. 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 att 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 att vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.
6. Positiva kontroller (används inte alltid): a) Fält-positiva där ett område känt för artförekomst provtas för kontroll att arten detekteras i fält. b) PCR-positiva för enartsanalyser (gäller qPCR och ddPCR) där DNA från målarten testas. c) Positiv flerartskontroll, där prov från ett artificiellt sammansatt samhälle ("mock community") används som positiv kontroll vid PCR och sekvensering. Falska positiva prover redovisas. De positiva proverna försäkrar att PCR och bioinformatiken fungerar som avsett.
7. 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.
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 12st. PCR-replikater per art/artgrupp och eDNA-prov utförs. Dessa sammanslås i sekvenseringen. Färre replikater 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.



BILAGA 5: RESULTAT AV KVALITETSKONTROLLER FÖR FLERARTSANALYSER

Värden för kontrollerna anges i tabell B5-1. eDNA koncentrationerna i proverna var hög och varierade mellan 21,6 och 66,2 ng/μl med ett medeltal på 44 ng/μl, vilket visar på höga eDNA koncentrationer. De negativa kontrollerna för insamling samt DNA extraktion visade bakgrundskoncentrationer som var så låga att de kunde ignoreras. De positiva kontrollerna var positiva. Kontaminations-DNA tillhörande människa, gris, ko, kyckling och får som är vanliga i reagenser och vattnet runtomkring oss, togs automatiskt bort från analyserna.

Miya 12S markören för fisk resulterade i 774 419 läsningar av vilka 75 % d.v.s. 732 596 godkändes genom kvalitetsfiltren för godkända målarartsidentiteter. Sekvenseringsdata analyserades enligt Kačergytė m. fl. 2021. Sekvenserna identifierades huvudsakligen mot NCBI referensdatabaser där speciellt verifierade arter av taxonomer togs i beaktande, några arter dubbelkontrollerades mot interna databaser.

Tabell B5-1. *Kvalitetsgranskning av eDNA och kontroller. eDNA-koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR. PCR-negativ innefattar 12 replikat. eDNA koncentration ng/μl. inhibering samt anti-inhibering anger om DNA är påverkat av humus och behöver genomgå antiinhibering. Inget av proverna visade inhibition. Markören som användes var Miya 12S för fisk. Kont% anger % av sekvenser från hund och människa som togs bort som naturlig kontaminering. Kontamineringsgraden var mycket låg.*

Provnamn	eDNA (ng/ μl)	inhibering	#PCR Miya	% kontaminering mål-arter	# mållart läsningar	% naturlig kontaminering
JV_03	43,4	Nej	12	0	40 985	0.00
JV_04	37,8	Nej	12	0	36 956	0.14
JV_05	21,6	Nej	12	0	38 420	0.00
JV_06	48,6	Nej	12	0	63 802	0.28
JV_07	36,4	Nej	12	0	51 005	0.05
JV_08	27,8	Nej	12	0	40 458	0
JV_09	68	Nej	12	0	62 783	0
JV_10	66,2	Nej	9	0	69 524	0
JV_11	52,6	Nej	12	0	61 839	0
Fält Neg	0,382	Nej	10	10	Yes	90
Neg Extraktion	< 0,01	Nej	6	12	Yes	90



BILAGA 6: FÖREDELNING AV ARTLÄSNINGAR INOM LOKALERNA

Tabell B_6.2. Antalet eDNA läsningar per art inom de olika provlokalerna. Siffrorna anger hur många gånger en sekvens blivit läst på artnivå och anger relativ biomassa. Flera läsningar anger högre biomassa. Totala antalet arter per lokal anges i varje kolumn.

Art latin	Art svenska	JV_03	JV_04	JV_05	JV_06	JV_07	JV_08	JV_09	JV_10	JV_11	Frekvens
<i>Anguilla anguilla</i>	Ål	120	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Clupea harengus</i>	Strömming	582	962	296	7199	14145	645	3898	977	1054	9
<i>Sprattus sprattus</i>	Skarpsill	888	2635	188	886	369	211	417	201	55	9
<i>Abramis brama</i>	Braxen	377	1020	862	16020	4297	1977	10508	19543	8250	9
<i>Alburnus alburnus</i>	Benlöja	307	2030	10952	1115	7322	281	2901	8254	1761	9
<i>Leuciscus idus/leuciscus</i>	Id*	143	1873	925	1083	327	266	1313	1919	1074	9
<i>Rutilus rutilus</i>	Mört	145	5482	2960	2095	627	3683	2924	3946	8604	9
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Sarv	0	0	0	40	88	0	0	0	57	3
<i>Blicca bjoerkna/Vimba vimba</i>	Björkna**	0	43	101	62	0	71	73	56	314	7
<i>Esox lucius</i>	Gädda	2779	721	248	1439	499	129	713	43	773	9
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Småspigg	307	2457	1694	2752	9010	559	15512	656	5660	9
<i>Pungitius pungitius</i>	Storpiigg	57	0	251	228	1805	0	214	75	532	7
<i>Ammodytes sp.</i>	Kusttobis***	0	0	0	0	429	0	0	44	0	2
<i>Gobius niger</i>	Svart smörbult	193	91	51	0	148	0	0	0	53	5
<i>Gobiusculus flavescens</i>	Sjustrålig smörbult	158	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Neogobius melanostomus</i>	Svartmunnad smörbult	6793	3269	1110	828	2844	1480	486	610	2002	9
<i>Pomatoschistus microps</i>	Lerstubb	1605	724	5144	1587	12189	199	457	1496	7176	9
<i>Pomatoschistus minutus</i>	Sandstubb	365	63	65	43	0	62	0	95	0	6
<i>Gymnocephalus cernua</i>	Gärs	3784	560	480	244	1978	0	799	222	2736	8
<i>Perca fluviatilis</i>	Abborre	43920	28627	14955	25590	12380	51481	10040	32838	19824	9
<i>Sander lucioperca</i>	Gös	0	205	0	0	0	44	396	1906	127	5
<i>Zarces viviparus</i>	Tånglake	45	30	0	590	60	0	0	0	0	4
<i>Platichthys flesus</i>	Skrubbskädda	0	36	0	63	101	0	0	0	0	3
<i>Scophthalmus maximus</i>	Piggvar	0	0	0	188	0	0	0	0	0	1
<i>Oncochinchus mykiss</i>	Regnbåge	0	177	52	564	286	523	42	0	0	6
<i>Salmo trutta</i>	Öring	0	0	0	82	66	0	0	0	0	2
<i>Coregonus marzena</i>	Sik	206	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Cottus gobio</i>	Stensimpa	0	0	0	0	87	0	0	0	0	1
<i>Symnathus typhle</i>	Tångsnälla	1020	0	124	85	267	0	124	152	98	7
Totalt antal arter		20	19	18	22	22	15	17	18	18	29

