

Inventering av fisk- däggdjurs- och stormusselfaunan med eDNA analyser i Lillpiteälven 2022

Micaela Hellström, Patrick Hernvall, Viktor Birgersson & Johan Spens



Inventering av fisk- däggdjurs- och stormusselfaunan med eDNA analyser i Lillpiteälven 2022

Utgiven av:	MIX Research Sweden AB
Datum:	2023-03-05
Uppdragsgivare:	Lillpiteälvgruppen
Författare:	Micaela Hellström, Patrick Hernvall, Viktor Birgersson & Johan Spens
Kartor:	Patrick Hernvall, Viktor Birgersson
Granskare:	Författarna samt uppdragsgivarna
Omslagsbild	Provtagning på lokal 2 (Johan Spens)
Fältarbete	Micaela Hellström, Anders Hägglund, Johan Spens
Uppdraget utfördes av:	MIX Research Sweden AB Adress: Uppsala Science Park, Dag Hammarskjölds väg 34A, 75237 Uppsala E-post: info@mixresearch.se Telefon: 070-782 03 10
Rapporten citeras som:	Hellström, M., Hernvall, P., Birgersson, V. Spens J. 2023. Inventering av fisk- däggdjurs- och stormusselfaunan med eDNA analyser i Lillpiteälven 2022. MIX Research 2023:05



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 miljöövervakningen. eDNA är vidare relativt kortlivat i vattenmassan och ger därför en bild av arters förekomst i nutid.

Den 4–5 oktober 2022 utförde MIX Research Sweden AB, på uppdrag av Lillpiteälvgruppen, en eDNA-undersökning med flerartsanalys av fisk och musslor.

Sammanlagt inventerades 13 lokaler i Lillpiteälven och dess mynningsområde. Studiens syfte var att undersöka fisk- och musselsamhället med fokus på lax och flodpärlmussla samt undersöka vandringshinderns påverkan på arternas utbredning. Tre prover analyserades även för ryggradsdjur. Vidare detekterades 11 däggdjursarter, en groddjursart samt 5 fågelarter.

Sammanfattningsvis visar resultatet att eDNA som metod har fördelar vid inventering av diversitet då metoden i regel detekterar fler arter än traditionella metoder som nätprovfiske, och i synnerhet sällsynta samt svårfångade arter. Undersökningen visar att Lillpiteälven är en artrik älv, men att utbredningen av arter begränsas av de vandringshinder som finns i älven. Detta påverkar speciellt lax, öring, id och flodpärlmussla.

Om vandringsvägarna öppnas förväntas havsöringar och flodnejonöga vandra upp i älven. För att lax skall vandra upp behövs nyintroduktion av yngel. Vidare är det viktigt att valet av värd för flodpärlmusslorna i älven undersöks, eftersom flodpärlmusslan i vissa älvar föredrar lax som värd och i andra älvar öring.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning.....	3
Innehållsförteckning.....	5
1 Inledning.....	6
2 Metoder.....	7
2.1 Fältarbete	7
2.2 Laboratoriearbete	9
2.3 Analyser DNA.....	9
3 Resultat.....	9
3.1 Sekvenseringsresultat.....	9
3.2 Fiskarternas förekomst på lokalerna.....	11
3.3 Stormusslornas förekomst på lokalerna	12
4 Diskussion.....	12
5 Slutsatser	17
6 Tack.....	18
7 Källhänvisningar	19
Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser?	20
Bilaga 2. Laboratoriearbete flerartsanalyser.....	21
Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA - kontroller	23
Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas	23
Bilaga 5: Resultat av kvalitetskontroller för flerartsanalyser	25
Bilaga 6: Rådata för detekterade arter, antal verifierade läsningar.....	26

1 INLEDNING

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 (Pedersen m.fl. 2015). Taberlet m. fl. (2012) definierar eDNA som ”det DNA som kan studeras från efterlämnade spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet”. Då genetiska analyser har utvecklats mycket under de senaste decennierna är det fullt möjligt att genom vatten- eller jordprov fånga upp dessa avtryck och med precisa metoder identifiera de arter som finns i en given miljö. eDNA kan utvinnas från en liten mängd vatten och med hög precision ange vilka arter som är närvarande. Detta verktyg är välutvecklat i vattenmiljöer och har visat sig vara användbart inom miljöövervakningen (Harper m. fl. 2015, 2018, Lawson Handley 2015, Leese m. fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017, Bruce m. fl. 2021). eDNA är vidare relativt kortlivat i vattenmassan (maximalt cirka två veckor beroende på yttre faktorer) och ger därför en bild av arters förekomst i nutid (Brys m. fl. 2021).

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.

Observationer av artförekomster och förändringar i artsammansättningar är viktiga som dataunderlag för att på ett hållbart sätt planera sportfisket samt för att vidta åtgärder för att gynna växt och djurliv i älven.

Lillpiteälvgruppen som bildades 2018 verkar för att bibehålla älven levande och för att skydda älvens dess biflöden, sjöar och tillhörande källflöden. MIX Research Sweden AB har på uppdrag av Lillpiteälvgruppen undersökt 13 lokaler i Lillpiteälven för förekomst av fisk (med fokus på indikatorarter) och stormusslor i kombination med information om vandringshinder.

Alla 13 lokaler undersöktes för fisk- och musselförekomst och tre lokaler analyserades även för förekomst av ryggradsdjur (som även inkluderar fiskar). Undersökningen finansierades med LOVA bidrag från länsstyrelsen i Piteå och ingår som delprojekt i ett större uppdrag för att för att utröna undersöka älvens status före utrivningen av de två sista vandringshindren.

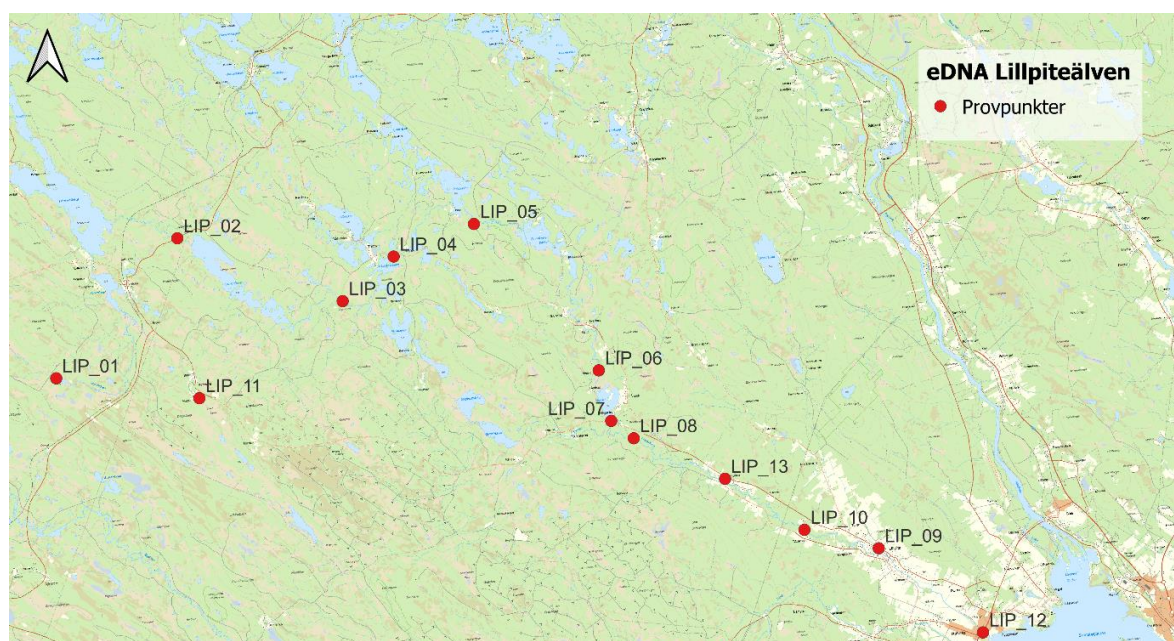
2 METODER

2.1 FÄLTARBETE

Fältarbetet utfördes den 04–05 oktober 2022 (Tabell 1, Figur 1 & 2). Innan eDNA-provtagningen genomfördes steriliserades all provtagningsutrustning. Filter köptes in som sterila och DNA-fria produkter. För varje lokal samlades fem liter vatten in i form av delprover som slogs ihop till ett samlingsprov för ett representativt resultat (Harper m.fl. 2018, Kačergytė m.fl. 2021, Bruce m.fl. 2021). Provtagarna bar sterila handskar och munskydd för att förhindra att proverna kontamineras.

Tabell 1. Provpunkter. Lokal, namn, typ av artanalyse (F=fisk, M= stormusslor, V= ryggradsdjur), insamlingsdatum, volym filtrerat vatten, vattentemperatur, provtagningsdjup, koordinater (RT99 TM).

Lokalnamn	Provnamn	Typ av analys	Datum	V ml	T °C H ₂ O	Djup (m)	Koordinat SWEREF 99 TM	
		F/M/V					Nord	Öst
Staveträsk- Koleränget	LIP_01	F/M/V	2022-10-04	1500	10	0–2	7271488	750670
Bänketräsk-Lyckoträsk	LIP_02	F/M	2022-10-04	1000	10	0–2	7277272	755979
Lyckoträsk- Häbberbäck	LIP_03	F/M	2022-10-04	1500	8	0–2	7274670	762940
Häbberträsk-Pello	LIP_04	F/M/V	2022-10-04	1000	8	0–2	7276558	765196
Pello-Klockarträsk	LIP_05	F/M	2022-10-04	1000	8	0–2	7277972	768699
Klockarträsk-Åträsk	LIP_06	F/M	2022-10-04	1200	8	0–2	7271755	773747
Keupån	LIP_07	F/M	2022-10-04	900	8	0–2	7269459	774154
Nedanför Keupån	LIP_08	F/M/V	2022-10-04	1500	10	0–2	7269004	774788
Norrbodabäcken	LIP_09	F/M	2022-10-05	900	9	0–2	7264266	785490
Råbäcken Lillpите	LIP_10	F/M	2022-10-05	900	10	0–2	7265058	782437
Ersträskbäcken	LIP_11	F/M	2022-10-04	1500	10	0–2	7273188	754775
Lillpите Svensbyn (närmast havet nedstr. alla vandringshinder)	LIP_12	F/M	2022-10-04	1130	9	0–2	7260513	790109
Mötespunkt Yttersta	LIP_13	F/M	2022-10-05	1300	9	0–2	7267190	779060



Figur 1. Karta över provtagning lokalernas placering längs älven

Provpunkterna registrerades med GPS och vattentemperaturen mättes. Ca 1–1,5 liter vatten filtrerades med hjälp av en peristaltisk fältpump genom 5 µm GF/0,8 µm PES inkapslade filterenheter (NatureMetrics, UK). Filtren tömdes på vatten och fixerades med etanol (96 % molekylär grad 200 proof) enligt protokoll från Spens m. fl. (2017) innan de transporterades till MIX Research Sweden's laboratorier enbart avsedda för eDNA analyser för genetisk testning. Fältpump steriliserades mellan lokalerna.



Figur 2. Provtagningslokalerna. Lokal 2 visas på omslagssidan och lokal 13 i figur 3. Notera att provtagningslokal 10 är belägen ovanför kraftverket i Lillpite. Provtagningslokal 12 är enda lokalen nedströms bägge kraftverkens vandringshinder.



Figur 3. Hjälp med temperaturmätning (a), möte med länsstyrelser, markägare och Lillpiteälvsgruppen vid lokal 13 (b) vid Yttersta.

2.2 LABORATORIEARBETE

Förekomst av fiskar och musslor undersöktes på alla 13 lokaler med flerartsanalyser. Principerna för flerartsanalyser förklaras utförligare i Bilaga 1 – 4.

Vidare undersöktes lokalerna 1, 4, och 8 för förekomst av däggdjur (markören detekterar även groddjur samt inte helt fullständigt, fiskarter och fåglar).

2.3 ANALYSER DNA

På en kort region av 12S-genen hos fisk och 16S genen hos musslor har arterna unika artspecifika 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. En art med hög förekomst ger därmed upphov till fler detektioner än en art med låg förekomst (Bilaga 2). Antal detektioner 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 (anger relativ biomassa från mest till minst dominerande art). Kvalitetskontroller anges i Bilaga 3 och 4.

3 RESULTAT

3.1 SEKVENSERINGSRESULTAT

Totalt detekterades 20 unika fisksekvenser i denna undersökning. Fiskmarkörerna detekterade 18 fiskarter och två artkomplex. Fiskmarkörerna visade tillfälligt läckage för Lokal 5 och lokalen togs därför bort från fiskanalyserna.

Stormusslor detekterades på 8 lokaler, av vilka fyra lokaler visade närvaro av flodpärlmussla. Flat dammussla och vanlig dammussla förekom också (se sektion 3.2). Vidare detekterades 11 däggdjursarter och 5 fågelarter samt vanlig groda. Arternas översiktliga förekomst inom lokalerna från högsta punkten till utloppet av havet presenteras i tabell 2 samt rådata i bilaga 6.

Artkomplex i detta sammanhang innebär att två arter maskeras som en eftersom de har identiska gensekvenser inom den del av DNA-regionen som analyseras (i detta fall en liten del av 12S genen). I denna studie kunde inte artkomplexen stäm (*Leuciscus leuciscus*) /id (*Leuciscus idus*) särskiljas med hjälp av markörerna.

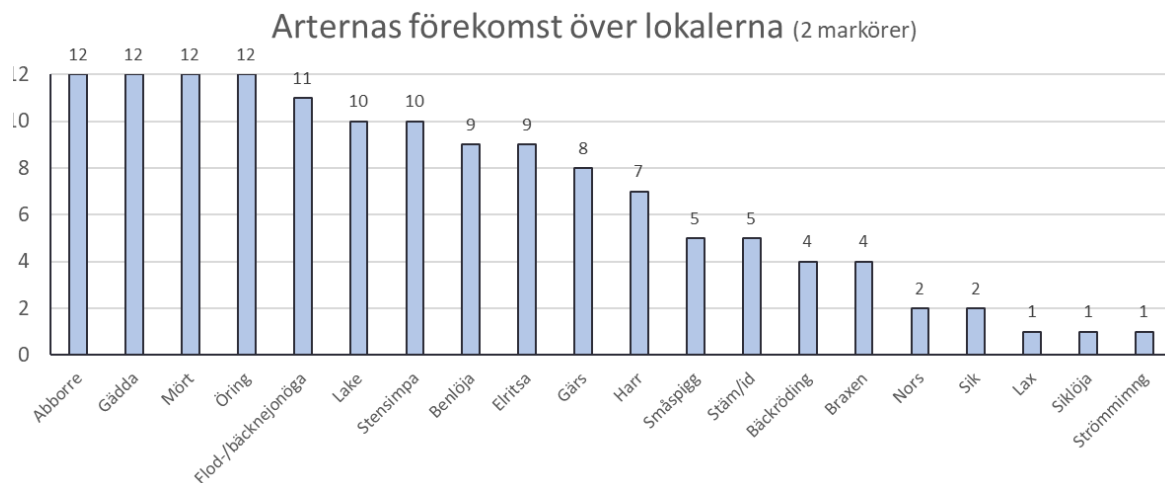
Sekvenserna för bäck- och flodnejonöga är identiska. Enligt vissa forskare kan dessa två reproducera sig med varandra och diskussioner pågår om dessa är en och samma art eller inte (Beamish 1980, De Cashan m. fl. 2020). Arten annoteras som nejonöga i denna analys. Havsnejonöga (som förekommer i Skåne)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

Tabell 2. Arternas förekomst över lokalerna från högsta punkterna (Lokal 01) till utloppet till havet (Lokal 12). Punkten 12 är nedanför bägge kraftverken. Alla markörer ingår i analysen. På lokal 2,4 och 8 har vertebratanalyser använts förutom musslor och fisk.

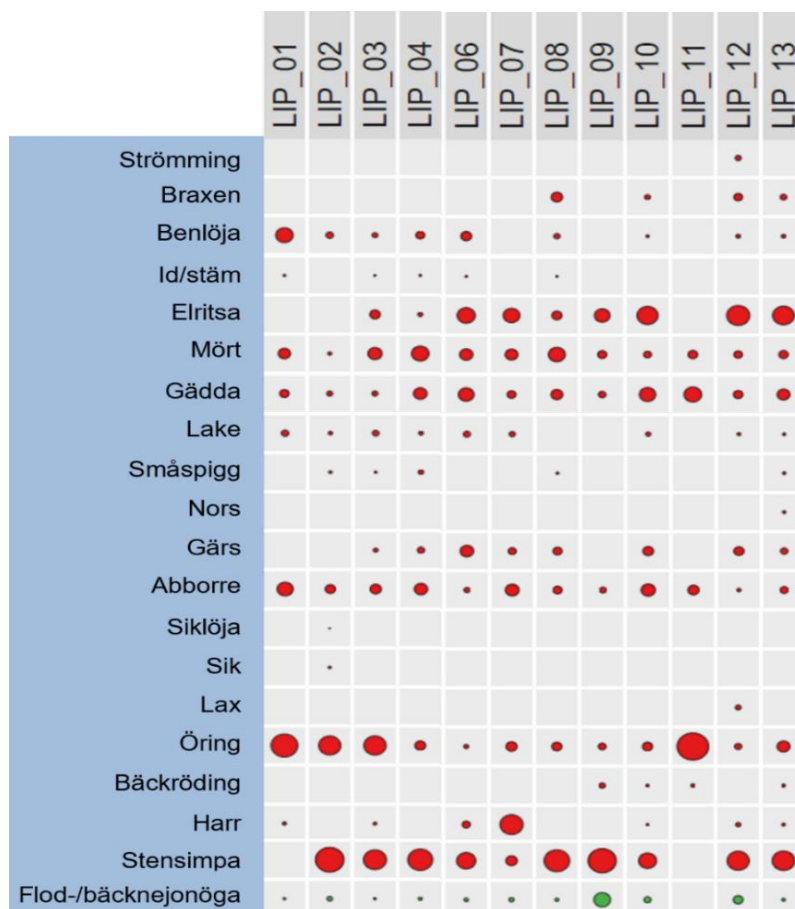
	01_ Staveträsk- Kolerånget	02_ Bänketräsk-Lyckoträsk	11_ Ersträskbäcken	03_ Lyckoträsk- Häbberbäck	04_ Häbberträsk-Pello	05_ Pello-Klockarträsk	06_ Klockarträsk-Åträsk	07_ Keupån	08_ Nedanför Keupån	13_ Mötespunkt Yttersta	10_ Råbäcken Lillpite	09_ Norrbodabäcken	12_ Lillpite Svensbyn
Abborre	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bäckröding	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-
Benlöja	X	X	-	X	X	X	-	X	X	X	X	-	X
Braxen	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	-	X
Elritsa	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Flod-/bäcknejonöga	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Gädda	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Gärs	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X
Harr	X	-	-	X	-	X	X	-	X	X	-	-	X
Lake	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X
Lax	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
Mört	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Nors	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-
Sik	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
Siklöja	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Småspigg	-	X	-	X	X	-	-	X	X	-	-	-	-
Stäm/id	X	-	-	X	X	X	-	X	-	-	-	-	-
Stensimpa	-	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Strömning	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
Öring	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Flodpärlmussla	X	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X
Flat dammussla	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-
Vanlig Dammussla	-	-	-	-	-	X	X	-	X	X	-	-	X
Älg	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
Ren	X	-	-	-	X	X	-	-	-	-	X	-	-
Räv	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bäver	-	-	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-	-
Ekorre	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Åkersork	X	-	-	-	-	X	-	X	-	X	-	-	-
Gråsidning/Rödsork	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
Skogssork	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vattensork	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vattennäbbmus	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
Vanlig näbbmus	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-

3.2 FISKARTERNAS FÖREKOMST PÅ LOKALERNA

Mest frekvent detekterade arter var abborre (*Perca fluviatilis*), gädda (*Esox lucius*), mört (*Rutilus rutilus*) och öring (*Salmo trutta*) som identifierades på samtliga 12 undersökta lokaler (Figur 4). Arternas relativa biomassa inom varje lokal visas i Figur 5. Arternas mångfald varierade från fem arter i prov LIP_11 (Ersträskbäcken) till 15 arter i LIP_13 (Mötespunkt, Yttersta). Lax och strömming detekterades i prov LIP_12 nedströms bägge vandringshinder.



Figur 4. Fiskarternas förekomst över 12 undersökta lokaler. Notera att både fisk och vertebratmarkör ingår och att lokal 5 inte ingår i analysen.

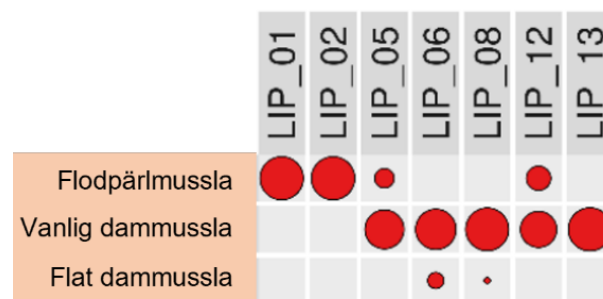


Figur 5. Arternas dominans sett som relativ biomassa inom de olika provtagningslokalerna. Den relativa biomassan anger hur många gånger en art blivit läst (kolumner). Varje kolumn visar hur många procent en art är läst av totalt 100 procent. Notera att enbart fiskmarkören ingår i denna analys och lake samt nors på lokal 8 detekterades av annan markör.

Sett till sekvensantal var stensimpa (*Cottus gobio*) den vanligast förekommande arten som stod för 26,5% av det totala sekvensantalet och utgjorde mellan 8–55% av andelen detektioner i varje prov. Andra vanligt förekommande arter var öring (17,8% av det totala sekvensantalet) och elritsa (*Phoxinus phoxinus*) (13,3% av det totala sekvensantalet).

3.3 STORMUSSLORNAS FÖREKOMST PÅ LOKALERNA

Stormusslor detekterades på sju av de 13 undersökta stationerna. Vanlig dammussla var den mest frekvent detekterade arten sett till både antal stationer och sekvensantal. Totalt utgjorde den 69% av det totala antalet lästa sekvenser, följt av flodpärlmussla (28,7%) och flat dammussla (2,2%) (Figur 6). Flodpärlmussla och flat dammussla är båda rödlistade och klassade som starkt hotad (EN) respektive nära hotad (NT). Flodpärlmusslan detekterades högt upp i systemet samt nära älvens utlopp.



Figur 1. Arternas dominans sett som relativ biomassa inom de olika provtagningslokalerna. Den relativa biomassan anger hur många gånger en sekvens av en art blivit läst (kolumner). Varje kolumn visar hur många procent en art är läst av totalt 100 procent.

4 DISKUSSION

eDNA inventeringen visar att Lillpiteälven är en artrik älv där både sällsynta musslor (flodpärlmussla och flat dammussla) och 20 unika fiskarter förekommer.

År 1815 konstruerades ett sågverk i Lillpiteälven mitt i byn i Lillpите. Laxarna kunde inte vandra upp i älven mellan 1815 och början av 1950-talet då den gamla trädammen revs. Under åren 1953 fram till 1987 fanns inga vandringshinder mitt i byn. Laxsmolt sattes ut mellan 1983 och 1986 (Gunnar Bergman pers. kom.). En betongdamm byggdes på samma ställe 1987. Lax gick upp i älven oktober 1993 som bars över hindret men de ingen av laxarna överlevade.

Resultaten i denna undersökning visade också att lax förekom vid utloppet till havet, men inte ovanför vandringshindret vid kraftverksdammen. Lax spelar även en stor roll för flodpärlmussla och öppnade vandringsvägar kan ge arten nya möjligheter att återetablera sig i vattensystemet. Arten påträffades vid älvens utlopp och förekomst kunde verifieras av lokala fiskare. Om lax skall återintroduceras i älven behöver yngel, som senare kan vandra, sättas ut.

Flodpärlmusslan återfanns på fyra av tolv undersökta lokaler. Dessa lokaler borde undersökas för att kontrollera om populationerna visar nyrekrytering. Flodpärlmusslan använder sig av lax eller öring som värd (Martin Österlin pers. kommunikation 2023) som en del av musslans

reproduktionscykel. Eftersom musslorna i olika älvar föredrar antingen lax eller öring som värdar (Salonen m. fl. 2017) finns en risk att laxarna som fanns i älven före 1815 fungerade som musselvärdar och i det fallet är det viktigt att återintroducera lax i älven så att musslorna kan föröka sig.

Om flodpärlmusslorna i Lillpiteälven har lax som värd i de tidiga utvecklingsstadierna är det viktigt att vandrande lax från havet kan migrera upp i älven förbi hinder för att försäkra flodpärlmusslans fortplantning. Utan laxen riskerar flodpärlmusslan att dö ut om lax är huvudvärd.

Vandringen av havsöring från havet kan vara viktig eftersom flera och större individer vandrar upp om de får möjlighet, jämfört med mindre öringar som befinner sig uppströms vandringshindren. Eftersom storleksskillnaden mellan havsöring och bäcköring är anmärkningsvärd, påverkar brist av vandrande havsöring musslornas möjligheter att föröka sig effektivare, förutsatt att öring är den värd som musslorna föredrar.

Havsöring och bäcköring är samma art som t.o.m. kan härstamma från samma föräldrar, men ekologin mellan vandrande och stationär öring skiljer sig märkbart (Jonsson & Greenberg 2022). Högsta mängder med öring i totala läsningar förekom vid lokalerna LIP_01 (Staveträsk-Koleränget) och LIP_11 (Ersträskbäcken) vilka båda är högt uppe i vattensystemet och stämmer väl överens med lokalbefolkningens iakttagelser.

Denna undersökning jämfördes med ett prov som samlades in i januari 2017 ovan kraftverket i Lillpiteälven för eDNA undersökningar (Hellström & Spens, 2017) och visade liknande arter som detekterades nedan kraftverket 2022. Här bör noteras att Amerikansk bäckröding förekom nedan kraftverket 2022 men inte ovan 2017. Provtagningen 2017 visade signaler för regnbåge (*Onchorynchus mykiss*), arten påträffades inte 2022. Föreningen Lillpitefisket gör med tillstånd av länsstyrelsen gjort av regnbåge vid stortjärn för "put-and-take" fiskeverksamhet (Piteå kommun 2014, Lillpitefisket 2019, 2020). Kassarna för dessa fiskar bevarades tillfälligt ovan Råbäcken kraftstation varje år fram till 2019. Detta förklarar varför regnbåge inte detekterades med eDNA vid kraftverket i Rokåbäcken 2022. Regnbågar sattes ut i själva älven på början av 2000 talet men utsättningarna avbröts eftersom fiskarna dog och flöt upp.

Nejonöga förekom på många lokaler, men i mycket höga mängder på provlokalerna 9, 10 och 12. Detta sammanföll med tidpunkten då flodnejonöga vandrar upp i älvar för förökning på våren. Förekomster av nejonöga förekom i betydligt mindre mängder ovan vandringshindret och dessa sekvenser utgörs troligtvis av bäcknejonöga. Nejonöga är mycket viktiga för laxfiskar eftersom de rör om i substratet, bidrar till att cirkulation av näringsämnen och tillför syre. Nejonöga utgör föda för både fiskar och fåglar (Sjöberg, 1980).

Olika fiskar påverkas med varierande intensitet av vandringshinder. Id hör till de cyprinider som påverkas av hinder då de inte kan vandra upp i älvar och sjöar (Van Treeck, 2022).

Strömning påträffades vid utloppet till havet vid lokal 12.

Fiskarnas roll i systemet beskrivs nedan:

Abborrens (*Perca fluviatilis*) förekomst överskattas vid provfisken med översiktsnät eftersom de lättare fastnar i nät än andra arter. Abborre är sämre anpassad för hög vattenhastighet, och är en s.k. lugnvattenfisk. Abborre förekom på alla provpunkter i Lill-Piteälven.

Benlöja (*Alburnus alburnus*) uppträder i stora stim tätt under ytan särskilt i varmare och näringsrika vatten. Benlöja är en viktig bytesfisk för gädda, abborre och gös.

Bäckröding (*Salvelinus fontinalis*) är en amerikansk kallvattenart som trivs speciellt bra i små igenfrusna vatten i Sverige. Under årtiondena tycks den amerikanska bäckrödingen utrota våra naturliga öringbestånd i små tjärnar och bäckar. Endast mindre eDNA-värden närmare 1000 eller mindre förekom i dessa åar och rör sig om enstaka fiskar vilka troligtvis kommer från bäckrödingrika biflöden.

Braxen (*Abramis brama*) är likt abborre en lugnvattenart. Under vintern samlar sig braxarna i relativt täta och passiva aggregationer, vilket leder till en säsongrelaterad överdominans på lokaler där ansamlingarna finns. I Ryssland är braxen en omtyckt matfisk bland annat på grund av sin höga fetthalt. Braxen förekommer till största delen i systemets nedre del där fosforhalterna är högre.

Elritsa (*Phoxinus phoxinus*) är en liten strömlevande karpfisk som kräver syrerika vatten. Fynd av elritsa genom eDNA gjordes i 9 av de 12 undersökta lokalerna. All förekomst var i Lill-Piteälven, men inte i de översta lokalerna.

Gädda (*Esox lucius*) har etablerats naturligt vid samtliga provlokaler. Gädda är det största rovdjuret i svenska vatten och utgör tillsammans med barriärer (vattenkraftsdammar och vägkorsningar) den huvudsakliga begränsande faktorn för laxartad fisk, t.ex. öring (*Salmo trutta*) och lax (*Salmo salar*) att sprida sig i systemet. Gäddan äter allt levande den kan fånga, inklusive artfränder, andra fiskarter, vattensork, groddjur och små sjöfåglar (framför allt ungfågel). Stärkta gäddbestånd motverkar övergödningsproblem och bidrar till friskare fjärdar. Den relativa mängden gädd-eDNA i Lill-Piteälven var god, upp till 20% av hela fiskbestånden.

Gärs (*Gymnocephalus cernua*) är en stor konkurrent till abborre. Huvudet har några slemfyllda gropar vilket gett fisken det alternativa namnet snorgärs. Den har ett känsligt sidolinjesystem som gör att den kan finna föda i grumligt vatten och under nattetid när många andra fiskar sover.

Harr (*Thymallus thymallus*) lever i kalla, klara och syrerika älvar och åar, sjöar men även i brackvatten. Den är en relativt stationär kallvattenart. Harren är Sveriges populäraste flugfisk. En orsak till detta är att harren är utpräglad insektsätare. Fisketrycket på harr är ofta högt och endast få stora individer brukar därför förekomma. Harren är en god matfisk som bör tillagas direkt vid fångst då köttet annars snabbt blir förstört. Harren är en karaktärsart för Lill-Piteälven där den förekommer i alla punkter i huvudfåran utom 8 och 9, som sannolikt har missats vid analysen (då endast 1 prov tagits med 54% sannolikhet för detektion om förekomsten <1%).

Id (*Leuciscus idus*) Som flera andra arter som vandrar upp i vattendrag för att leka har id-bestånden tagit skada av dammar som hindrar deras vandring. I Sverige har id inget ekonomiskt värde som matfisk. I öststaterna uppskattas den som föda och särskilt i Ryssland bedrivs ett betydande fiske. Denna eDNA-analys skiljer ej på id och stäm vilket inte ger en säker bild av förekomsten.

Lake (*Lota lota*) vandrar under vintern upp i åarna för att reproducera sig. Kallvattenarten lake var tidigare uppsatt på den svenska rödlistan som nära hotad (NT), som beror på sannolik minskning i antalet populationer och utbredningsområde i Sverige. Lake förekommer i hela Lill-Piteälvs-systemet utom Ersträskbäcken.

Lax (*Salmo salar*) är en vandringsfisk. Den är mycket hemtrogen och återvänder inte bara till samma älv, utan till samma plats där den kläcktes, för att leka. Rommen läggs och befruktas i lekgröpar på strömsatta grusbotten på hösten. De utlekta laxarna kallas vraklaxar. Många dör kort efter leken, men en mindre andel vandrar ut i havet igen. De växer sig större och kan sedan leka en andra och ibland en tredje gång. Laxar som leker för fjärde gången har påträffats i andra vattensystem. Rommen kläcks på våren. När laxungen utvecklats till smolt (1–5 års ålder) utvandrar den till Östersjön för att växa sig stor.

Inför utvandringen är kroppslängden 10–19 cm. I havet kallas den för blanklax, och äter uteslutande fisk. Laxen blir könsmogen vid 2 till 9 års ålder. Maximal ålder är cirka 15 år och fiskarna kan bli upp till 150 cm långa och väga uppåt 40 kg. De största registrerade spöfångade laxarna i Sverige vägde 29 kg. Minimimåttet vid laxfiske i Sverige är 60 cm. Återintroduktionen av lax till Lill-Piteälven är endast möjligt om kraftverksdammen vid Råbäcken åtgärdas. Den lax som förekom vid älvens mynning 12 kan vara tillfälligt besökande lax från den närliggande Pite älv. Laxens återintroduktion kan vara livsviktig för att flodpärlmusslan skall kunna reproducera sig.

Mört (*Rutilus rutilus*) är en försurningskänslig art som förekom i betydande mängder (antal DNA-träffar) vid alla undersökningslokaler. Mörten är mycket känslig för sura miljöer och trivs inte i lågt pH. Riklig förekomst tyder på att Lill-Piteälven inte är försurningsdrabbad utan har tillräckligt pH över hela året.

Nejonöga (*Lampetra fluviatilis* eller *L. planeri*). De olika formerna av nejonöga (flod- eller bäcknejonöga) är på samma sätt som de olika öring-formerna (havs-, sjö- och bäcköring) omöjliga att skilja emellan genetiskt. Den formen som vi detekterade med eDNA uppströms provpunkt 10 är mest sannolikt det icke-parasitiska bäcknejonögat, som är vida utbredd och den vanligaste formen, ända högt upp i Lill-Piteälvens vattensystem. Alla former av nejonöga kräver tillgång till både sand och grusbotten för lek samt mjukbotten som uppväxtområden. Sekvenserna för bäck- och flodnejonöga är identiska. Enligt vissa forskare kan dessa två reproducera sig med varandra och diskussioner pågår om dessa är en och samma art eller inte (Beamish 1980, De Cashan m. fl. 2020). Arten annoteras som nejonöga i denna analys. Havsnejonöga (som endast förekommer i Skåne) däremot har sekvenser som skiljer sig markant från flod/bäck-nejonöga.

Nors (*Osmerus eperlanus*) har en doft av gurka och utgör en viktig bytesfisk för öring, lax och andra fiskarter. Stora havslevande stim av nors vandrar upp i norrländska älvar från havet för att leka under maj månad. Den lilla restförekomsten nors i provpunkt 8 och 13 kommer sannolikt från någon av sjöarna uppströms under högsta kustlinjen och utgör inte någon del av Lill-Piteälvens förökande fiskbestånd. Möjligen skulle norsbeståndet etableras om vandringshindren vid kraftverken skulle åtgärdas.

Sik (*Coregonus maraena*) Siken och dess olika underarter och former sammanslås nuförtiden till en enda art under samlingsnamnet sik. Olika underarter och ekotyper av sik har inte med säkerhet bestämts genom jämförelser med typmaterial. Siken lever och leker i sjöar, älvar och i havet. Siken bygger inte lekgröpar utan rommen släpps till den fria vattenmassan där den efter befruktning sjunker mot botten. Rommens överlevnad är högst på grus- och sandbotten. Leken sker under hösten men i undantagsfall även långt in på vintern. Siken är en laxfisk vars uppväxande bestånd tål gäddpredation. Normalt utrotas alla andra sjölevande laxfiskbestånd helt av gädda under Högsta kustlinjen i Sverige om inte sjön är mycket stor. Siken kräver kallt och förhållandevis syrerikt vatten och tål därför inte övergödning. Den lilla rest av sik som detekterades mellan Bänkerträsk och Lyckoträsk kommer sannolikt från dessa sjöar.

Siklöja (*Coregonus albula*) Den sticlevande siklöjan uppehåller sig i den fria vattenmassan i kalla, näringsfattiga sjöar under högsta kustlinjen (HK) eller i havet. Den är mest känd och eftertraktad för den populära dyra "löjrommen". Siklöjans huvudsakliga föda består av kräftdjurplankton. I denna eDNA-provtagning detekterade vi siklöja mellan Bänkerträsk-Lyckoträsk.

Småspigg (*Pungitius pungitius*) lever både i havet och i sjöarna. Vid lektiden anlägger hanen en röd parningsdräkt och bygger ett bo på sjöbotten. Spiggen hotar rovfiskar som gädda och abborre, dels genom att massförekomst av spigg äter rovfiskens ägg och yngel, dels genom att storspigg, unga abborrar och unga gäddor konkurrerar om samma föda. Storspiggen kan förstärka övergödningens effekter genom att äta upp smådjuren som annars skulle beta bort trådalger. Spiggar är ofta angripna av den parasitiska masken *Schistocephalus*. Spiggens eDNA hittades på fem lokaler i denna undersökning.

Stensimpa (*Cottus gobio*) kräver syrerika hårbottnar och klart vatten för att trivas. I rinnande vattendrag i Lill-Piteälven är stensimpa en dominerande fiskart, där den ofta representerar en stor del av allt eDNA. Arten är en god indikator för vattenkvalitet. Den goda förekomsten av stensimpa i Lill-Piteälven är ett gott tecken på nuvarande vattenkvalitet t.ex. försurningsläget. Stensimpan är nattaktiv och svåriskad eftersom den lever gömd under stenar och grus. Stensimpa påträffades ej i två lokaler, de minsta lokalerna högst upp i vattensystemet. Stensimpa leker flera gånger under året och ökar därför sin eDNA-mängd betydligt utan att detta speglar fiskens biomassa. Det är därför svårt att avgöra hur stort beståndet av stensimpa är.

eDNA-metoden detekterade arten på alla andra lokaler, vanligen med de högsta eDNA-mängderna. Stensimpan är listad i EU:s Annex II lista till EU:s habitatdirektiv. De största satsningarna på artnivå då det gäller utbredning och habitat genom EU:s LIFE-restaureringsprojekt har fokuserat på stensimpan. Tyvärr har inga uppföljningar av dessa genomförts. Arten är svårinventerad med nu använda standardmetoder såsom nätfiske och eDNA-metoden kan avhjälpa detta med avsevärt förbättrade detektioner i både storälvar och sjöar vilket även möjliggör adekvat uppföljning av genomförda åtgärder.

Stäm (*Leuciscus leuciscus*) Förekommer i snabbt rinnande strömmar i klara vatten med rena grusbottnar (lekbottnar) och hög syrgashalt. I sjöar förekommer de oftast i närheten av till- eller utlopp. eDNA-prover visade en förekomst av stäm/id i hälften av provtagna lokalerna i övre delen av vattensystemet. Denna eDNA-analys skiljer ej på id och stäm vilket ger en osäker bild av förekomsten. Förekomst av Id/Stäm saknas helt nedströms kraftverket och skulle sannolikt etableras här om dammen blev åtgärdat, hindret elimineras.

Öring (*Salmo trutta*) förekommer i Lillpiteälvsystemet som både havsöring och bäcköring, vilket är olika former av samma art. Varje vattens bestånd av öring har unika egenskaper och anpassningar, likt laxen. Havsöring vandrar normalt uppströms till lek- och uppväxtområden. Havsöringen vandrar alltid uppströms för att leka efter en eller flera säsongers tillväxt i havet. Bäcköringen stannar hela livet i rinnande vatten och är stationär. Öringen leker på rena grusbottnar i rent strömmande vatten.

Öringen har stor betydelse för sportfisket. Vidare kan öringen vara av stor betydelse för den rödlistade flodpärlmusslans livscykel förutsatt att musslorna föredrar öring som värd för fortplantning. Öring förekommer vid samtliga lokaler och har den högsta biomassan av alla arter i Lillpiteälven bortsett från stensimpa. Vid Ersträskbäcken och längst upp i Lill-Piteälven vid Staveträsk-Koleträsk så saknas stensimpa och öring är då den dominerande arten. Om

vandringshindren vid kraftverken skulle åtgärdas så kommer havsöringen att etableras och öka öringens biomassa betydligt i Lillpiteälven.

5 SLUTSATSER

Baserat på resultaten från denna undersökning föreslår vi följande åtgärder och vidareundersökningar för att Lillpiteälven skall kunna fungera som en levande älv för kommande generationer:

- Öppna upp vandringshinder i älven så att vandrande arter kan ta sig igenom systemet.
- Eftersom flodpärlmusslans förökning är beroende av vandrande lax eller öring som värdart under förökningscykeln vore det viktigt att undersöka vilken värdart som musslorna föredrar. Detta kan göras med hjälp av infektionsexperiment i akvarier (Martin Österling personlig kommunikation). Som ett först steg är det viktigt att undersöka nyrekrytering i Lillpiteälven och därefter undersöka värdpreferens för musslorna. Om ny rekrytering av musslor inte har detekterats i älven är möjligtvis laxarna värdar.
- Återetablering av lax innebär att smolt, eller t.o.m. äggkluster från laxar implanteras i biflöden i älven så att vandrande lax kan etablera sig i älven.
- Denna undersökning visar att Lillpiteälvens arter bör skyddas för att försäkra levande vattendrag, goda fiskemöjligheter samt för att försäkra nyrekrytering av vandrande arter.

Undersökningen gav utslag på 20 unika fiskdetektioner och tre musselarter samt 11 däggdjursarter och vanlig groda. Några av dessa arter är idag rödlistade och resultaten kan därför bidra till eventuella åtgärdsbeslut eller inducera mer detaljerade inventeringar för att skydda arterna. Kombinerade inventeringsmetoder med eDNA (förekomst av flera arter) och påföljande traditionella inventeringar på utvalda platser (ålder, storlek kön) blir ett kraftfullt verktyg som ger betydligt större resolution och bättre dataunderlag för åtgärder och beslut i miljöövervakningen.

Resultaten i denna rapport visar att eDNA-metabarkoding som inventeringsmetod har stora fördelar vid inventering av biologisk mångfald eftersom ett stort antal arter kan detekteras på en gång. Fördelen med eDNA är att provtagning kan ske i svårtillgängliga områden, och eftersom insamling och filtrering av vatten kräver mindre tid i fält jämfört med inventeringar på traditionellt sätt, kan undersökningar ske över stor geografisk skala. På detta sätt kan metoden generera stora dataset på ett sätt som tidigare inte varit möjligt.

eDNA som verktyg inom miljöövervakning är både kostnadseffektivt och påverkar inte arterna negativt eftersom metoden är icke-skadlig för de arter som undersöks.

Metoden är till nytta för att inventera arter före och efter åtgärder, som vid exempelvis utrivningar av kraftverksdammar. eDNA används redan som inventeringsmetod i Sverige och andra delar av Europa för att exempelvis undersöka förekomsten av hotade arter innan uppstarten av större infrastrukturprojekt.

eDNA som metod har utvecklats mycket under de senaste 10 åren och olika faser av metodens användning standardiseras i nuläget inom CEN och SIS. Forskning pågår för att särskilja

populationer inom arter och användningen av dessa analyser i framtiden stärker eDNA som inventeringsverktyg och komplement till andra inventeringsmetoder.

Analyser samt artbestämning är beroende av referensdatabaser och trots att de flesta arterna i Sverige är sekvenserade finns det ännu luckor. En nationell satsning på sekvensering av mitokondriska genomet i samarbete med naturhistoriska museer, taxonomer och genetiker skulle kunna vara en lösning på detta problem

6 TACK

Tack till hela Lillpitegruppen och till Gunnar Bergman som höll kontakt och föreslog eDNA-projekt samt bidrog med kunskap, närvaro samt organiserade husrum i Lillpite. Ett stort tack till Anders Hägglund som tog oss ut i fält, delade med sig av sin gedigna lokalkunskap, guidade oss till provlokaler, hjälpte till med temperaturmätningar och diskuterade genetik. Tack till Lillpiteälvgruppen som ordnade en fältdemonstration med kaffe i regnet för intresserade markägare, lokalbefolkning, kraftverksägare, representanter för länsstyrelsen och för oss om tog vattenprover. Tack till Jan Isaksson Pite älvs ekonomisk förening med säte i Älvsbyn för diskussioner, visat intresse och närvaro vid fältdemonstrationen. Tack till Kristoffer Markström vid Piteå Tidningen för intressanta frågor och visat intresse – och för en trevlig artikel om projektet. Tack till professor Martin Österling vid Karlstad Universitet för diskussioner och ny information om flodpärlmusslans förökningscykel och värdpreferenser. Undersökningen finansierades med LOVA bidrag till Lillpitegruppen från länsstyrelsen i Luleå och ingår i ett större projekt.

7 KÄLLHÄNVISNINGAR

- Artdatabanken 2022. Hur blir en art rödlistad, <https://www.artdatabanken.se/det-har-gor-vi/rodlisning/hur-blir-en-art-rodlistad/> Uppdaterad 29 mars 2022.
- Bruce, K. Bourlat, S. Blackmann, R., **Hellström, M.**, m.fl. & Deiner, K. 2021. A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment". PenSoft Publishers Bulgaria 2021. ISBN 978-619-248-052-3 (paperback), ISBN 978-619-248-053-0 (e-book) DOI: 10.3897/ab.e68634
- Brys, R., Haegeman, A., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Staelens, A., Auwerx, J., & Ruttink, T. (2021). Monitoring of spatiotemporal occupancy patterns of fish and amphibian species in a lentic aquatic system using environmental DNA. *Molecular ecology*, 30(13), 3097-3110.
- De Cahsan, B., Nagel, R., Schedina, I. M., King, J. J., Bianco, P. G., Tiedemann, R., & Ketmaier, V. (2020). Phylogeography of the European brook lamprey (*Lampetra planeri*) and the European river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) species pair based on mitochondrial data. *Journal of fish biology*, 96(4), 905-912.
- 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.
- 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.
- Harper, L. R., Lawson Handley, L., Hahn, C., Boonham, N., Rees, H. C., Gough, K. C., ... & Hänfling, B. (2018). Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Ecology and evolution*, 8(12), 6330-6341.
- **Hellström, M** & Spens, J. 2017. eDNA - Fiskförekomst i 10 kustmynnande vattendrag, Norrbottens län AquaBiota Rapport 2017:10. 30 sid.
- Jonsson B. & Greenberg L. (2022). Egg incubation temperature influences the population - specific outmigration rate of juvenile brown trout *Salmo trutta*. *Journal of Fish Biology*, 100(4), 909-917.
- Kačergytė, I., Petersson, E., Arlt, D., **Hellström, M.**, Knape, J., Spens, J., ... & Pärt, T. (2021). Environmental DNA metabarcoding elucidates patterns of fish colonisation and co - occurrences with amphibians in temperate wetlands created for biodiversity. *Freshwater Biology*, 66(10), 1915-1929.
- Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Crowder LB (2014) Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm. *PLoS ONE* 9(1): e86175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086175>.
- 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.
- Lillpitefisket 2019, 2200, 2021. https://www.facebook.com/lillpite.fiske/?locale=sv_SE
- 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
- Piteå Kommun 2014. <https://www.pitea.se/contentassets/c6931e92e1924b0c8ec76a112ccfecc1/informationstext-till-fiskekarta-pitea-kommun.pdf>
- Salonen, J. K., Luhta, P. L., Moilanen, E., Oulasvirta, P., Turunen, J., & Taskinen, J. (2017). Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brown trout (*Salmo trutta*) differ in their suitability as hosts for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in northern Fennoscandian rivers. *Freshwater Biology*, 62(8), 1346-1358.
- 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.
- Sjöberg, K. (1980). Ecology of the European river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) in northern Sweden. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(11), 1974-1980.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793
- Van Treeck R. 2022. Beyond turbine mortality: Holistic assessment of hydropower hazards for European fishes. PhD Thesis, Berlin. <https://doi.org/10.18452/24014>

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.

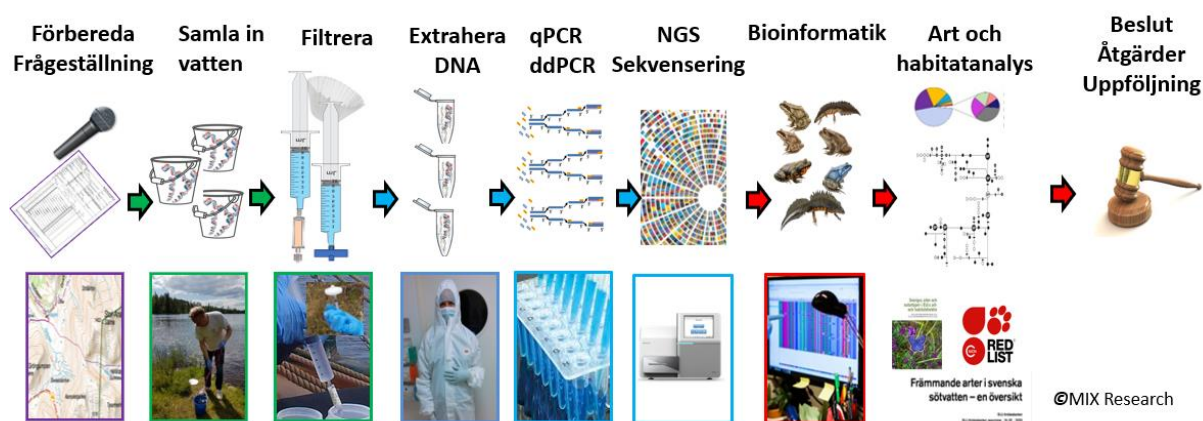
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundansen mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Analystiden för enartsanalyser är kortare än analystiden för flerartsanalyser.

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	CGCCGCGTTATACGAGA	Ja/Nej	Artlista	Dominans
	CGCCGCGTTATACGAGA	OTU 1	Match →	10 %
Flerartsanalys - Metabarkodning	CACCGCGTTATACGAGA	OTU 2	Match →	65 %
	CGCCGCGTTACACCACT	OTU 3	Match →	5 %
	CGCCGCGGTACACCGTG	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.



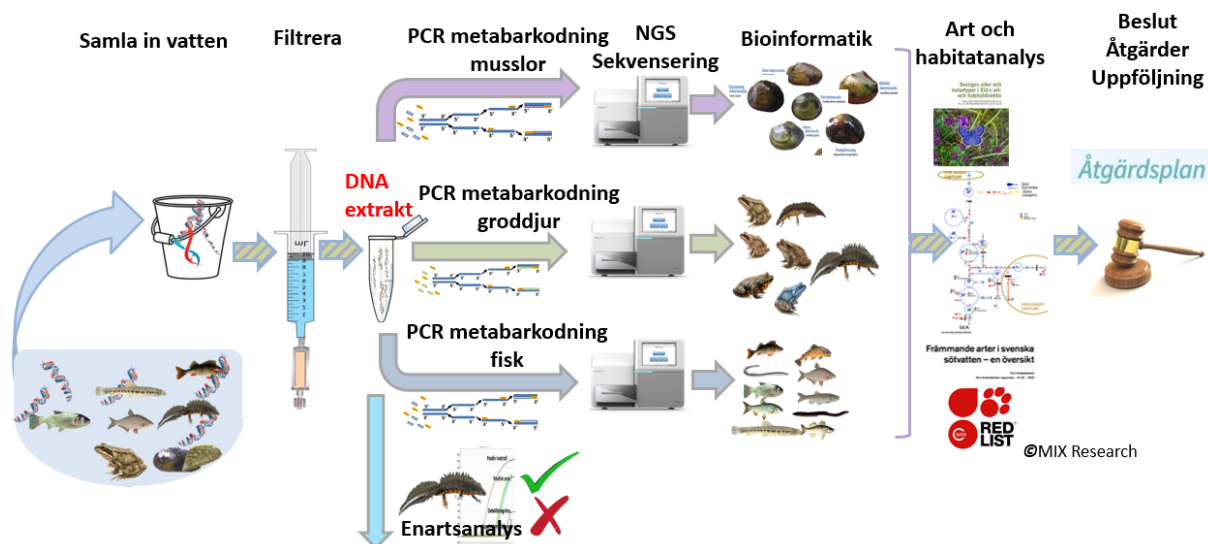
BILAGA 2. LABORATORIEARBETE FLERARTSANALYSER

B.2.1 EXTRAKTION

eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll för slutna filter i etanol från Spens m. fl. (2017) fi 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 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 proverna inte kan sekvenseras samtidigt eftersom PCR produkterna varierar i längd mellan markörer. Sekvenseringsprotokoll och bioinformatik anges i Kačergytė m. fl. 2021. Som positiv laboratoriekontroll används ett prov med känd artsammansättning av tropiska arter som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyseras för att säkerhetsställa kvaliteten och tillförlitlighet av resultat (bilaga 3).



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 175 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)). Strålfeniga fiskar, Actinopterygii, skiljer sig genetiskt från nejonöga som hör till Hyperoartia (Kraniedjur). För att detektera artkomplexitet innebär degenererade primers ett problem och alternativet är att följa principerna för modifierade primers enligt Miya m. fl. (2020).

B.2.2.2 Vertebrater (däggdjur, fåglar, groddjur och fisk)

Flerartsanalyserna för vertebrater använde en vertebratmarkör (Riaz m. fl. 2011 och Kelly m. fl. 2014) som detekterar däggdjur, groddjur, fiskar (inte fullständigt) och delvis fåglar. Markören läser en 195

bp region på 12S genen. Protokollet följde Hänfling m. fl. (2016) och bioinformatiken anpassades för markören. Protokollet och källor finns nämnda ovan.

B.2.2.3 Stormusslor (Unionidae)

Stormusslor inom Unionidae analyserades med ett markörpar för Unionidae i Prié m. fl. (2021) som läser en ca 125 bp hypervariabel region på 16S genen.

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 504 000 kända arter finns tillgängliga med 2,5 miljard sekvenser och 15,3 triljoner baspar enligt GenBank och NCBI hemsida (Sayers, m.fl. 2021). 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). 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.

Antalet läsningar per art ger en relativ uppskattning (relativ biomassa) av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov.

Referenser

- Hänfling, B., Handley, L. L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., ... Winfield, I. J. (2016). Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*, 25(13), 3101–3119.
- 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.
- Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Crowder LB (2014) Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm. *PLoS ONE* 9(1): e86175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086175>
- 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 (2020).
- NCBI websida <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Prié, V., Valentini, A., Lopes-Lima, M., Froufe, E., Rocle, M., Poulet, N., ... & Dejean, T. (2021). Environmental DNA metabarcoding for freshwater bivalves biodiversity assessment: methods and results for the Western Palearctic (European sub-region). *Hydrobiologia*, 848(12), 2931-2950.
- 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.,avanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Schoch, C. L., Sherry, S. T., & Karsch-Mizrachi, I. (2021). GenBank. *Nucleic acids research*, 49(D1), D92-D96.
- 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. 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 målartern 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 9- 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. Alla negativa kontroller var negativa för målarter. DNA-koncentrationer var normala. Miya 12S markören för fisk resulterade i 973 456 artspecifika sekvenser och varierade mellan 43 358 – 108 696 per prov, vilket är höga värden och en indikation på högkvalitativ analys samt provtagning. Stormusselmarkören Unio på 16S genen detekterade musslor på 8 lokaler med 418 681 läsningar och läsningarna per prov låg mellan 34 705 och 80 181 läsningar. Vertebratanalyserna på 12S genen (Riaz 2011, Kelly 2014) utfördes på tre prover med 18 468 och 48 485 läsningar per prov för målarter. Vertebratmarkörerna plockar upp stora mängder mänskligt DNA samt ko, får och kyckling som ingår i reagenserna.

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. De olika markörerna anges som FiskM, Unio, och Kelly.

Prov-ID	DNA koncentration (ng/µL)	PowerClean	FiskM + PCRs	Fisk M #sekvenser	Musslor Unio + PCR	Unio # sekvenser	Kelly +PCR	Vertebrat K # sekvenser
LIP_01	7.56	Yes	12	80 468	9	34 705	12	18 468
LIP_02	6.52	Yes	12	54 389	5	47 664		
LIP_03	4.42	Yes	12	43 377	0	-		
LIP_04	4.5	Yes	12	68 869	0	-	12	48 445
LIP_05	8.36	Yes	12	73 652	8	69 675		
LIP_06	1.84	Yes	12	84 192	9	65 307		
LIP_07	5.48	Yes	12	108 696	0	-		
LIP_08	4.18	Yes	12	67 267	9	76 696	12	35 656
LIP_09	2.74	Yes	12	59 496	0	-		
LIP_10	2.92	Yes	12	79 398	0	-		
LIP_11	7.62	Yes	12	100 778	0	-		
LIP_12	5.74	Yes	12	99 470	7	80181		
LIP_13	5.86	Yes	12	56 312	5	45742		
LIP_NEG	0.02	Yes	8	68 398	0	0		

BILAGA 6: RÅDATA FÖR DETEKTERADE ARTER, ANTAL VERIFIERADE LÄSNINGAR

Tabell B6_1. Antalet eDNA-läsningar (MiFish) per detekterad 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.

Arter (latin)	Arter	Similarity	LIP_01	LIP_02	LIP_03	LIP_04	LIP_05	LIP_06	LIP_07	LIP_08	LIP_09	LIP_10	LIP_11	LIP_12	LIP_13
<i>Clupea harengus</i>	Strömming	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 754	-
<i>Abramis brama</i>	Braxen	100	-	-	-	-	-	-	-	5 165	-	1 244	-	4 086	1 233
<i>Alburnus alburnus</i>	Benlöja	100	15 209	1 598	643	2 979	749	5 688	-	1 217	-	211	-	792	398
<i>Leuciscus leuciscus/idus</i>	Stäm/id	100	128	-	16	91	310	84	-	40	-	-	-	-	-
<i>Phoxinus phoxinus</i>	Elritsa	-	-	-	2 716	709	1 887	17 514	18 956	3 908	8 996	22 707	-	34 704	17 191
<i>Rutilus rutilus</i>	Mört	100	7 105	285	5 322	13 245	12 721	8 995	10 401	11 982	2 700	2 554	5 186	3 867	2 766
<i>Esox lucius</i>	Gädda	100	3 913	860	695	7 707	13 540	12 851	4 638	5 563	1 767	13 255	19 831	4 939	5 521
<i>Lota lota</i>	Lake	100	2 275	356	970	594	116	2 096	1 998	-	-	913	-	452	144
<i>Pungitius pungitius</i>	Småspigg	100	-	177	63	877	263	-	-	104	-	-	-	-	189
<i>Osmerus eperlanus</i>	Nors	100	-	-	-	-	70	-	-	-	-	-	-	-	192
<i>Gymnocephalus cernua</i>	Gärs	100	-	-	387	1 849	2 749	9 299	3 658	3 032	-	5 308	-	5 871	1 572
<i>Perca fluviatilis</i>	Abborre	100	12 886	3 356	3 279	7 473	5 994	1 494	12 456	3 027	1 430	9 842	7 560	593	1 952
<i>Coregonus albula</i>	Siklöja	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coregonus maraena</i>	Sik	-	-	116	-	-	99	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmo salar</i>	Lax	100	-	-	-	-	432	-	-	-	-	-	-	1 524	-
<i>Salmo trutta</i>	Öring	100	38 288	17 296	14 018	4 662	4 344	820	7 706	3 874	1 882	4 657	67 543	2 626	5 606
<i>Salvelinus fontinalis</i>	Bäckröding	100	-	-	-	-	-	-	-	-	1 134	259	658	-	229
<i>Thymallus thymallus</i>	Harr	100	542	-	200	-	307	3 017	39 254	-	-	128	-	1 154	236
<i>Cottus gobio</i>	Stensimpa	100	-	29 596	15 009	28 284	29 749	19 597	8 376	29 026	31 186	16 144	-	31 795	18 830
<i>Lampetra fluviatilis/planeri</i>	Flod-/bäcknejonöga	100	122	735	40	399	-	596	1 210	329	10 267	2 004	-	5 268	221
			80 468	54 389	43 358	68 869	73 330	82 051	108 653	67 267	59 362	79 226	100 778	99 425	56 280
<i>Alces alces</i>	Älg	100	-	-	-	-	122	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rangifer tarandus</i>	Ren	100	-	-	-	-	472	-	-	-	-	137	-	-	-
<i>Castor fiber</i>	Bäver	-	-	-	-	-	-	190	-	-	-	34	-	-	-
<i>Myodes glareolus</i>	Skogssork	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	336	-	-
<i>Arvicola amphibius</i>	Vattensork	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	168	-	-
							594	190				171	504		
<i>Anas platyrhynchos</i>	Gräsand	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98	-	-
													98		
Totalt antal sekvenser			80 468	54 389	43 358	68 869	73 924	82 241	108 653	67 267	59 362	79 397	101 380	99 425	56 280

Tabell B6_2. Antalet eDNA-läsningar (Kelly) per detekterad 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.

Arter (latin)	Arter	Similarity	LIP_01	LIP_04	LIP_08
<i>Abramis brama</i>	Braxen	-	-	-	3406
<i>Alburnus alburnus</i>	Benlöja	1911	2751	761	
<i>Phoxinus phoxinus</i>	Elritsa	-	1005	1440	
<i>Rutilus rutilus</i>	Mört	1100	12371	4174	
<i>Esox lucius</i>	Gädda	232	1431	582	
<i>Lota lota</i>	Lake	239	861	1404	
<i>Pungitius pungitius</i>	Småspigg	-	455	-	
<i>Osmerus eperlanus</i>	Nors	-	-	192	
<i>Gymnocephalus cernua</i>	Gärs	-	545	149	
<i>Perca fluviatilis/Sander lucioperca</i>	Abborre/gös	1231	4982	2616	
<i>Coregonus sp</i>		-	640	-	
<i>Salmo trutta</i>	Öring	7146	4680	703	
<i>Cottus gobio</i>	Stensimpa	-	8189	14255	
<i>Lampetra fluviatilis/planeri</i>	Flod-/bäcknejonöga	-	-	23	
			11859	37910	29705
<i>Corvus corax/Corvus corone</i>	Korp/Kråka	36	-	-	
<i>Erithacus rubecula</i>	Rödhake	-	622	-	
<i>Turdus sp.</i>	Trastar	21	222	-	
<i>Anas platyrhynchos</i>	Gräsand	271	3784	851	
<i>Columba sp.</i>	Duvor	35	-	-	
			363	4628	851
<i>Rangifer tarandus</i>	Ren	3501	2280	-	
<i>Vulpes vulpes</i>	Räv	28	-	-	
<i>Castor fiber</i>	Bäver	-	1518	2470	
<i>Microtus agrestis</i>	Åkersork	45	-	436	
<i>Myodes rufocanus/Myodes rutilus</i>	Gråsidig/Rödsork	59	51	-	
<i>Sciurus vulgaris</i>	Ekorre	36	-	-	
<i>Neomys fodiens</i>	Vattennäbbmus	-	81	-	
<i>Sorex araneus</i>	Vanlig näbbmus	-	-	47	
			3669	3930	2953
<i>Rana temporaria</i>	Vanlig groda	2094	152	1133	
			2094	152	1133
Totalt antal sekvenser			17985	46620	34642

Tabell B6_3. Antalet eDNA-läsningar per detekterad 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.

Arter (latin)	Arter	Similarity	LIP_01	LIP_02	LIP_05	LIP_06	LIP_08	LIP_12	LIP_13
<i>Margaritifera margaritifera</i>	Flodpärlmussla	100	34705	47664	13320	-	-	24583	-
<i>Anodonta anatina</i>	Vanlig dammussla	100	-	-	56355	55999	75327	55598	45742
<i>Pseudanodonta complanata</i>	Flat dammussla	100	-	-	-	8266	1132	-	-
Totalt antal sekvenser			34705	47664	69675	64265	76459	80181	45742



MIX Research
Sweden