

eDNA-inventering av fisk och marina däggdjur – Vindpark Triton

AquaBiota Report 2021:11

Författare: Viktor Birgersson, Martin Andersson-Li

AquaBiota Water Research



STOCKHOLM, NOVEMBER 2021

Beställare:

Rapporten är utförd av AquaBiota Water Research på uppdrag av OX2 AB.

Författare:

Viktor Birgersson (viktor.birgersson@aquabiota.se), Martin Andersson-Li

Omslagsbild:

Provtagning i fält. Foto: Amanda Östman. AquaBiota

Kontaktinformation:

AquaBiota Water Research AB

Adress: Sveavägen 159, 113 46 Stockholm

Tel: +46 8 522 302 40

Mail: info@aquabiota.se

www.aquabiota.se

Kvalitetsgranskad av:

Martin Isaeus

Distribution:

Fri efter tillstånd från kund

Internetversion:

Nedladdningsbar hos www.aquabiota.se efter tillstånd från kunden

Citera som:

Birgersson V & Andersson-Li M. 2021. eDNA-inventering av fisk och marina däggdjur – Vindpark Triton. AquaBiota Rapport 2021:11. ISBN: 978-91-89085-35-0

AquaBiota Report 2021:11

ISBN: 978-91-89085-35-0

© AquaBiota Water Research 2021



SAMMANFATTNING

På uppdrag av OX2 AB har AquaBiota utfört fältinventeringar i svensk ekonomisk zon utanför Skånes sydkust. Syftet med undersökningarna är att ta fram underlag till den kommande miljökonsekvensbeskrivningen för uppförandet av den planerade vindparken Triton.

Undersökningarna ägde rum under juni samt augusti år 2021 och innefattade fiskinventering med hjälp av eDNA. Även marina däggdjur inkluderades i inventeringen.

Akvatiskt miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) har under det senaste decenniet visat sig vara ett lovande verktyg för inventering av vattenorganismer inom miljöövervakning. Undersökningsmetoden baserar sig på det faktum att alla levande organismer, både växter och djur, kontinuerligt avger genetiska avtryck i miljön i form av slem, avföring, svett och döda celler. Dessa genetiska spår kallas eDNA. Akvatiskt eDNA är spåren som organismer avger i vattenmiljön. eDNA kan utvinnas ur små mängder vatten (0,1 – 5 liter) och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område utan att man vare sig ser eller fångar organismen. eDNA ger en uppskattning av artförekomst i nutid eftersom DNA i vatten normalt sönderfaller inom några dagar efter det att en specifik art lämnat miljön.

Denna rapport redovisar resultaten från eDNA-metabarkodningsanalys med målgrupperna fisk och marina däggdjur. Proverna togs under juni och augusti 2021 vid tio lokaler utanför Skånes sydkust. Vid det första inventeringstillfället i juni detekterades totalt 26 olika taxa, varav 24 tillhörde fiskar och två tillhörde däggdjur. Vid det andra inventeringstillfället i augusti detekterades totalt 33 olika taxa, samtliga tillhörande fisk.

Sju rödlistade arter detekterades: torsk (*Gadus morhua*, sårbar), fyrtömmad skärlånga (*Enchelyopus cimbrius*, nära hotad), vitling (*Merlangius merlangus*, sårbar), kolja (*Melanogrammus aeglefinus*, sårbar), kummel (*Merluccius merluccius*, sårbar), långa (*Molva molva*, starkt hotad) och havskatt (*Anarhichas lupus*, starkt hotad)

Tumlare (*Phocoena phocoena*) och gråsäl (*Halichoerus grypus*) detekterades i ett prov vardera vid provtagningen i juni. I augusti detekterades inga marina däggdjur.

INNEHÅLL

Sammanfattning.....	3
Innehåll.....	4
1. Inledning	5
2. Material och Metoder	5
2.1. Fältarbete.....	5
2.2. Laboratoriearbete – eDNA	6
3. Resultat	8
3.1. eDNA–undersökning juni 2021	8
3.2. eDNA–undersökning augusti 2021	10
4. Diskussion och analys	13
Referenser	17
Bilaga 1 Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar	19
Bilaga 2. Kvalitetssäkring av eDNA	21

1. INLEDNING

Undersökningar av biologisk mångfald i akvatiska ekosystem har historiskt i huvudsak skett genom traditionella fysiska, akustiska och visuella metoder. Exempel på dessa är nätfiske, trålning, elfiske, telemetri, undervattensvideo, snorkling, fällor och undervattenssonar. Dessa metoder har begränsningar eftersom de är mer eller mindre selektiva och ingen enskild metod beskriver hela mångfalden av fisk. Vidare är vissa konventionella metoder destruktiva eller letala eftersom de kräver att utföraren av studierna rör, skadar eller dödar sitt studieobjekt vilket är ett potentiellt problem i bevarandeeekologiska undersökningar. En annan begränsning av konventionella metoder är att sällsynta, invasiva och svårfångade arter inte upptäcks, och deras förekomst underrapporteras vilket kan ge felmarginaler i insamlade data (Trigal och Degerman 2015).

Undersökningsmetoden miljö-DNA eller eDNA (environmental DNA) baserar sig på det faktum att alla levande organismer, både växter och djur, kontinuerligt avger genetiska fotavtryck i miljön i form av slem, avföring, respiration, svett och döda celler (Pedersen m.fl. 2015). Definitionen på eDNA anges som; "det DNA som kan studeras från dessa spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet" (Taberlet m.fl. 2012). I akvatiska miljöer kan detta material utvinnas ur små mängder vatten och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område, utan att man ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är relativt kortlivat ger analyserna en bild av artförekomst i nutid (uppskattningsvis ca 2–10 dagar beroende på miljöförhållanden). eDNA har visat sig ha en stor potential som verktyg för inventering av vattenorganismer (Bohmann m.fl. 2014, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017). Vidare har flera studier visat att eDNA i marina miljöer detekterar flera eller minst lika många arter som konventionella inventeringsmetoder som trålning (Stoeckle m.fl. 2020, Zou m.fl. 2020, Thomsen m.fl. 2016, Thomsen m.fl. 2012).

På uppdrag av OX2 AB utfördes en eDNA-inventering av fisk och marina däggdjur i svensk ekonomisk zon utanför Skånes sydkust. Syftet med inventeringen är att undersöka artsammansättningen av fisk och förekomsten av marina däggdjur för att kunna bedöma vilka effekter en etablering av vindkraft kan få i området. Resultaten från undersökningen kommer utgöra ett underlag till den kommande miljökonsekvensbeskrivningen för uppförandet och drift av den planerade vindparken Triton.

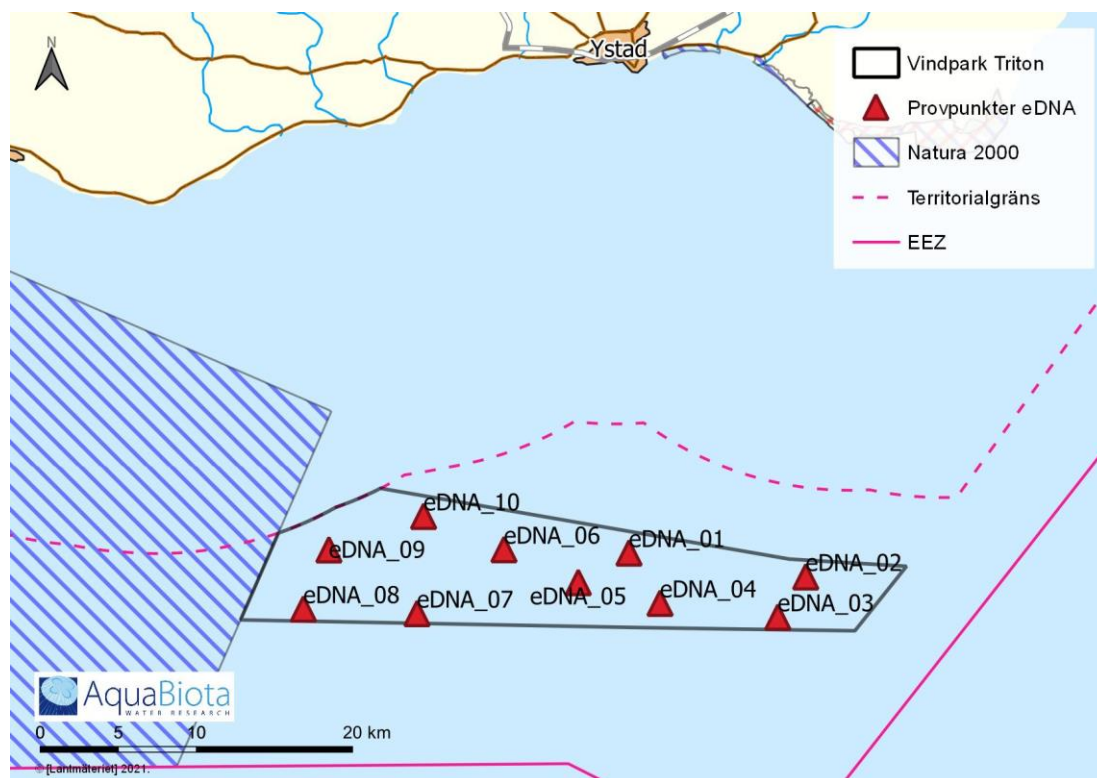
2. MATERIAL OCH METODER

2.1. Fältarbete

Under juni och augusti 2021 utfördes vattenprovtagningar för eDNA vid tio lokaler i Sveriges ekonomiska zon utanför Skånes sydkust. Vid samtliga tio lokaler togs ett bottenprov (ca 1–5 meter från botten) samt ett ytprov (ca 2–5 meter under ytan) vilket resulterade i 20 prover per inventeringstillfälle, och totalt 40 prover. Djupet vid lokalerna varierade mellan ca 42–45 meter. Provtagningspunkter visas i figur 1.

Innan provtagningarna genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria engångsförpackningar. På

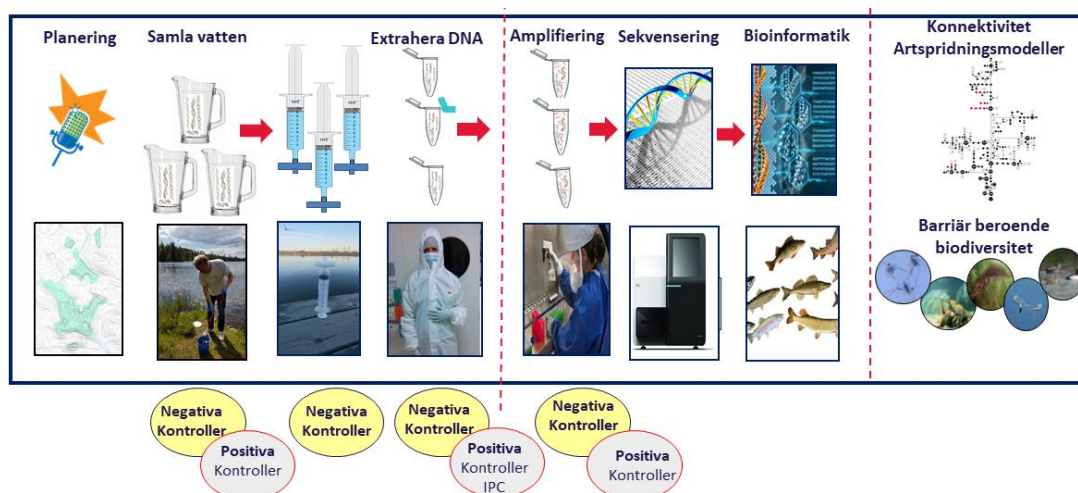
provtagningspunkterna samlades fem liter vatten in med en Ruttnerhämtare. Vattnet blandades och filtrerades med inkapslade (slutna) engångsfiltar för att minska risken för kontaminering. Negativa fältkontroller utgjordes av rent vatten som hanterades med samma provtagningsutrustning och filtrerades i fält för att studera potentiell kontaminering av DNA från havsvatten, från provtagare eller från båten. Insamling och fixering följde Spens m.fl. (2017).



Figur 1. Den planerade vindparken Triton samt provtagningspunkterna för eDNA.

2.2. Laboratoriearbete – eDNA

2.2.1. Extraktion, PCR och sekvensering



Figur 2. Flödesschema som visar de olika stegen för eDNA undersökningar.

Flödesschemat i figur 2 beskriver eDNA-processen från insamling till analys. eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Proverna analyserades med flerartsanalyser för förekomst av fisk och marina däggdjur. Varje PCR-prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs under bioinformatiken. Markörer som amplifierar 12S-rRNA genen användes för fisk (MiFish, Miya m.fl. 2015), samt 16S-rRNA genen för marina däggdjur (MarVer3, Valsecchi m.fl. 2020). Principerna för metabarkodning förklaras mer utförligt i bilaga 1. Vidare användes en positiv DNA "mock community" kontroll med känd artsammansättning av tropiska fiskar som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyserades också för att bedöma kvalitetsparametrar (se bilaga 1).

2.2.2. Bioinformatik och verifiering

Varje enskild art har en unik streckkod eller DNA-sekvens. Varje unik sekvens fick en molekyllär identitet. De olika sekvenserna kördes mot en internationell databas (tillgänglig för allmänheten, som grundar sig på GenBank och upprätthålls av National Center for Biotechnology Information, NCBI¹ där sekvenser på mer än 460 000 kända arter finns tillgängliga (Schoch m.fl. 2020). Sekvenserna lagrade hos NCBI är endast delvis kurerade (verifierade av taxonomer) och kan ibland vara felaktiga, efter kvalitetsfiltrering av data kördes därför alla sekvenser även mot en kurerad databas över alla Europas fiskar som upprätthålls av NatureMetrics Ltd. Artidentifiering baseras på fullständig match mot en referens. I vissa fall kan arter ha en likadan sekvens och då nämns båda arterna i resultattabellerna. Databaserna uppdateras löpande och arter som inte har referenssekvenser inkluderas när de blir tillgängliga. De olika sekvenserna matchades mot databasen och fick på så sätt fisk och marina däggdjurs taxonomisk identitet. Tack vare nya framsteg inom metabarkodning är det möjligt att få träffar på artnivå istället för enbart familje- eller genusnivå för många djurgrupper.

Antalet läsningar per art ger en relativ uppskattning av hur mycket eller lite arten förekom i ett prov. Ju mer DNA från en viss art i provet, desto större andel läsningar erhålls vid analys. Förenklat är den relativa mängden DNA från en viss art proportionell mot den relativa biomassan i det analyserade artsamhället. Det finns artspecifika faktorer som komplicerar sambandet, vilket man kan justera för (exempelvis kopieras vissa arters DNA mer effektivt än andras). Detta beror även på hur proverna samlas in samt analyseras. Det finns många studier med olämplig metodik som inte ser detta samband men det finns flera studier från både limnisk och marin miljö som visar en god överensstämmelse mellan den relativa andelen DNA-träffar och den relativa andelen biomassa. Sambandet mellan fiskbiomassa och antalet läsningar finns exempelvis beskrivet i Evans m.fl. (2016), Ushio m.fl. (2018) och Stoeckle m.fl. (2020). En undersökning i Östersjön utförd av AquaBiota visade att eDNA-prover tagna direkt i anslutning till nätprovfisken visade god samstämmighet mellan andelen fångst av vanligt förekommande arter och andelen läsningar (Näslund m.fl. 2019).

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

3. RESULTAT

3.1. eDNA-undersökning juni 2021

I provtagningen i juni detekterades totalt 26 taxa vid de tio lokaler som provtogs för eDNA. Av totalt 26 taxa kunde vidare 25 bestämmas till art och ett till släkte. Fiskarna och däggdjuren som detekterades var överlag typiska för de besökta lokalerna och regionen i stort. De vanligast förekommande arterna var skarpsill (*Sprattus sprattus*), som förekom i samtliga 20 prover, rödspätta (*Pleuronectes platessa*) och torsk (*Gadus morhua*), som detekterades i 19 av 20 prover, samt sill (*Clupea harengus*) och sandskädda (*Limanda limanda*) som detekterades i 18 av 20 prover.

Tre rödlistade arter detekterades i inventeringen – torsk (sårbar), som var en av de vanligast förekommande arterna, vitling (*Merlangius merlangus*, sårbar) som detekterades i 14 prover och fyrtömmad skärlånga (*Enchelyopus cimbrius*, nära hotad) som detekterades i fem prover (tabell 1).

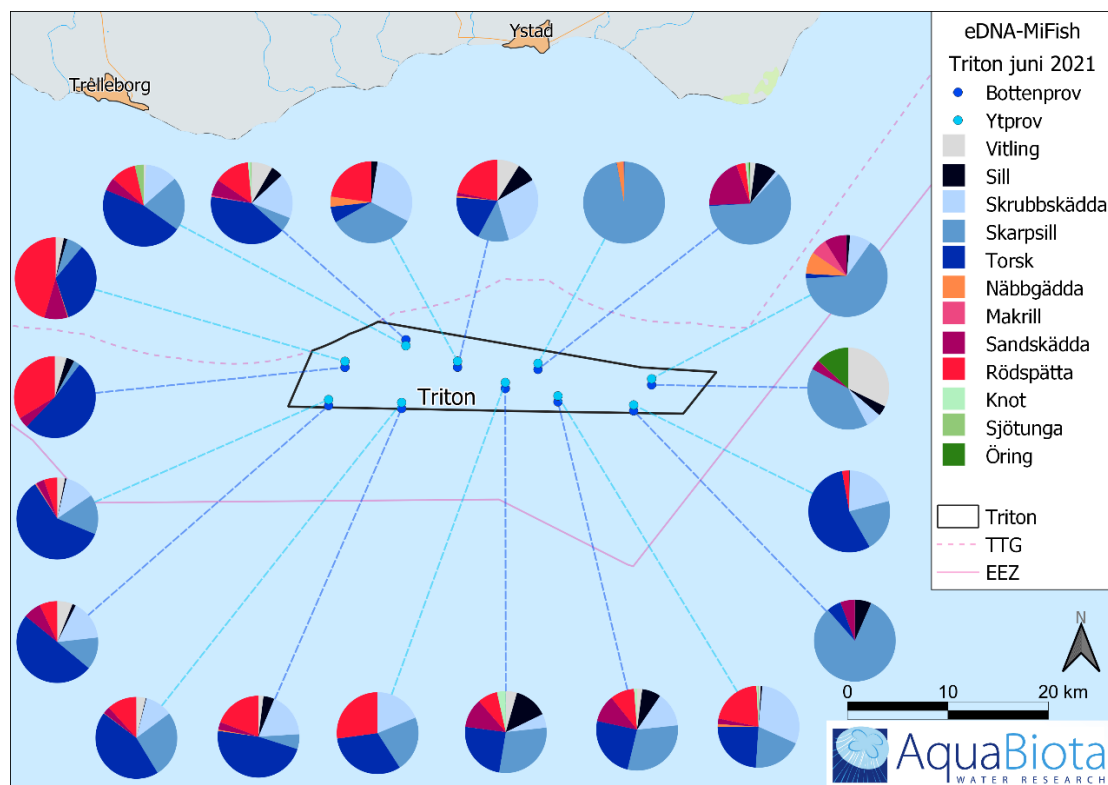
Tabell 1. Arter som detekterades i undersökningen juni 2021 visade som antal prover med detektion (*= rödlistade arter). Detektioner av arter till följd av naturlig kontaminering² har exkluderats i denna rapport.

Fiskart	Vetenskapligt namn	Antal prov
Näbbgädda	<i>Belone belone</i>	9/20
Sill	<i>Clupea harengus</i>	18/20
Skarpsill	<i>Sprattus sprattus</i>	20/20
Torsk*	<i>Gadus morhua</i>	19/20
Vitling*	<i>Merlangius merlangus</i>	14/20
Fyrtömmad skärlånga*	<i>Enchelyopus cimbrius</i>	5/20
Storspigg	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	2/20
Tobisfiskar	<i>Ammodytes sp.</i>	4/20
Randig sjöcock	<i>Callionymus lyra</i>	2/20
Sandstubb	<i>Pomatoschistus minutus</i>	1/20
Makrill	<i>Scomber scombrus</i>	3/20
Spetslångebarn	<i>Lumpenus lampretaeformis</i>	4/20
Rödtunga	<i>Glyptocephalus cynoglossus</i>	1/20
Sandskädda	<i>Limanda limanda</i>	18/20
Bergskädda	<i>Microstomus kitt</i>	3/20
Rödspätta	<i>Pleuronectes platessa</i>	19/20
Skrubbskädda	<i>Platichthys flesus</i>	17/20
Piggvar	<i>Scophthalmus maximus</i>	2/20
Slätvar	<i>Scophthalmus rhombus</i>	4/20
Tunga	<i>Solea solea</i>	4/20
Öring	<i>Salmo trutta</i>	3/20
Röt-/Hornsimpa	<i>Myoxocephalus scorpius/quadricornis</i>	1/20
Sjorygg	<i>Cyclopterus lumpus</i>	4/20
Knot	<i>Eutrigla gurnardus</i>	5/20
Tumlare	<i>Phocoena phocoena</i>	1/20
Gräsäl	<i>Halichoerus grypus</i>	1/20

² Exempel på naturlig kontaminering inkluderar: frekventa besökare på platsen, avföring från rovdjur, boskap, avloppsvatten och fiskbete. Denna typ av kontaminering är vanligtvis oundviklig och mycket svår att kvantifiera. Typiska kontamineringsarter inkluderar ko, gris, hund, katt, får etc.

För regionen mer sällsynta arter som detekterades var randig sjökok (Callionymus lyra), rödtunga (Glyptocephalus cynoglossus), bergskädda (Microstomus kitt), tunga (Solea solea) och knot (Eutrigla gurnardus).

Proportioner av detekterade sekvenser inom varje prov visar på en klar dominans av torsk, skarpsill, skrubbskädda och rödspätta. Proportioner av detekterade sekvenser inom varje prov för de tolv vanligast förekommande arterna visas i figur 3.



Figur 3. Proportioner av detekterade sekvenser för de tolv vanligast förekommande arterna vid eDNA-inventeringen av fisk i juni 2021. TTG: territorialgräns, EEZ: exklusiv ekonomisk zon.

Marina däggdjur som detekterades var tumlare (*Phocoena phocoena*) och gråsäl (*Halichoerus grypus*), vilka detekterades i ett prov vardera. De tumlare som detekterades tillhör sannolikt den livskraftiga Bälthavspopulationen då inventeringstillfället inte sammanföll med den tidsperiod då Östersjöpopulationen tros kunna uppehålla sig i området.

De negativa kontrollerna uppvisade förväntade resultat med mycket låga koncentrationer av DNA (tabell 2). Resultaten påvisade dock detektioner av tre av de vanligaste förekommande arterna skarpsill, torsk och skrubbskädda vilket högst sannolikt härrör från kontamination av havsvatten. Då källan kan bestämmas samt att kontaminationsnivåerna var så pass låga bedöms det sakna betydelse för resultatet.

Tabell 2. Volym anger medelvolym filtrerat vatten per prov. eDNA koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific).

Prov ID	Volym filtrerat (ml)	DNA (ng/ul)
T_01_Y	5000	0.18
T_01_B	5000	3.06
T_02_Y	5000	0.40
T_02_B	5000	0.37
T_03_Y	5000	0.26
T_03_B	5000	0.53
T_04_Y	5000	0.55
T_04_B	5000	0.56
T_05_Y	5000	0.31
T_05_B	5000	1.69
T_06_Y	5000	0.20
T_06_B	5000	0.32
T_07_Y	5000	0.99
T_07_B	5000	0.20
T_08_Y	5000	0.59
T_08_B	5000	0.35
T_09_Y	5000	0.25
T_09_B	5000	0.08
T_10_Y	5000	0.38
T_10_B	5000	0.28
Fält neg 1	1500	<0,01
Lab neg 1	NA	<0,01

3.2. eDNA-undersökning augusti 2021

I provtagningen detekterades totalt 33 taxa vid de tio lokaler som provtogs för eDNA. Av totalt 33 taxa kunde vidare 32 bestämmas till art och ett till släkte. Inga marina däggdjur detekterades. Fiskarna som detekterades var överlag typiska för de besökta lokalerna och regionen i stort.

De vanligast förekommande arterna var skarpsill, sill, skrubbskädda, rödspätta, sandskädda och torsk som detekterades i samtliga 20 prover. Även vitling, slätvar (*Scophthalmus rhombus*) samt knot var vanligt förekommande och detekterades i 19 av 20 prover. Sju rödlistade arter detekterades i inventeringen – torsk (sårbar), vitling (sårbar), kolja (*Melanogrammus aeglefinus*, sårbar), kummel (*Merluccius merluccius*, sårbar), fyrtömmad skärlånga (nära hotad), långa (*Molva molva*, starkt hotad) och havskatt (*Anarhichas lupus*, starkt hotad), se tabell 3.

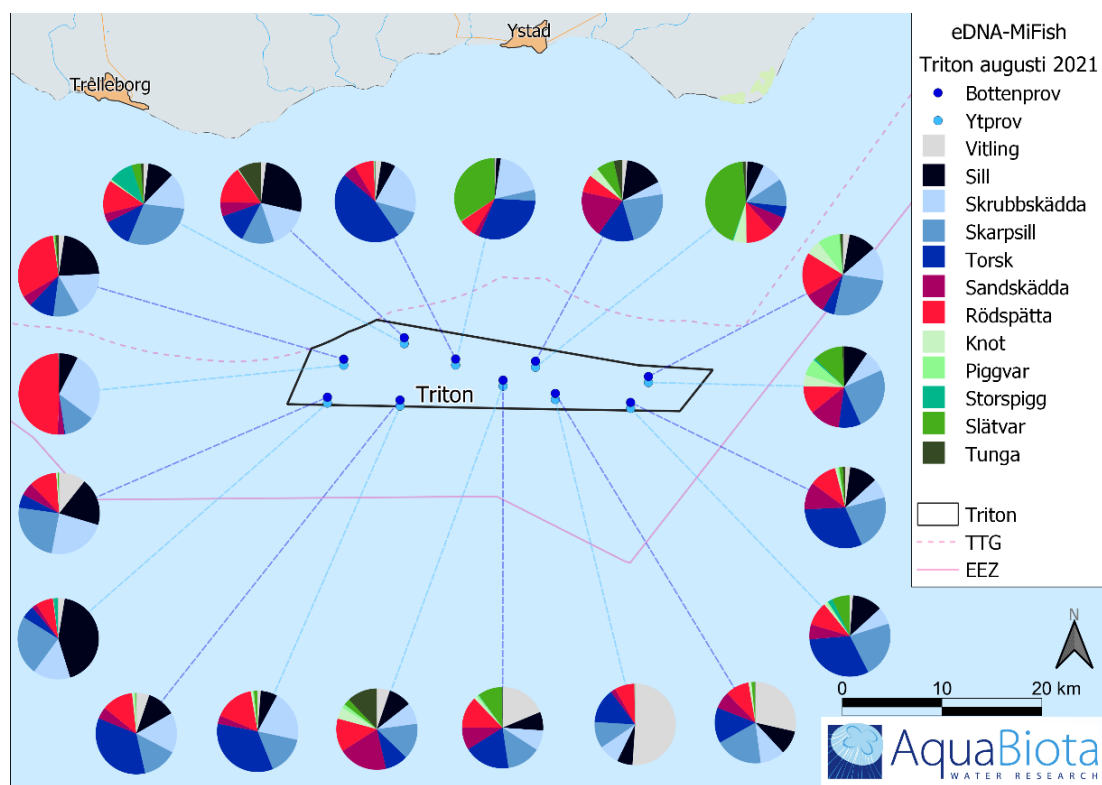
Tabell 3. Arter som detekterades i undersökningen augusti 2021 visat som antal prover med detektion (*= rödlistade arter). Detektioner av arter till följd av naturlig kontaminering³ har exkluderats i denna rapport.

Fiskart	Vetenskapligt namn	Antal prov
Näbbgädda	<i>Belone belone</i>	4/20
Sill	<i>Clupea harengus</i>	20/20
Skarpsill	<i>Sprattus sprattus</i>	20/20
Ansjovis	<i>Engraulis encrasicolus</i>	1/20
Torsk*	<i>Gadus morhua</i>	20/20
Kolja*	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	5/20
Vitling*	<i>Merlangius merlangus</i>	19/20
Vitlinglyra	<i>Trisopterus esmarkii</i>	2/20
Fyrtömmad skärlånga*	<i>Enchelyopus cimbrius</i>	4/20
Långa*	<i>Molva molva</i>	1/20
Kummel*	<i>Merluccius merluccius</i>	6/20
Storspigg	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	10/20
Marulk	<i>Lophius piscatorius</i>	1/20
Tobisfiskar	<i>Ammodytes sp.</i>	4/20
Havskatt*	<i>Anarhichas lupus</i>	2/20
Randig sjökock	<i>Callionymus lyra</i>	1/20
Sjustrålig smörbult	<i>Gobiusculus flavescens</i>	1/20
Sandstubb	<i>Pomatochistus minutus</i>	2/20
Makrill	<i>Scomber scombrus</i>	5/20
Spetslångebarn	<i>Lumpenus lampretaeformis</i>	5/20
Tånglake	<i>Zoarces viviparus</i>	2/20
Rödtunga	<i>Glyptocephalus cynoglossus</i>	14/20
Sandskädda	<i>Limanda limanda</i>	20/20
Bergskädda	<i>Microstomus kitt</i>	17/20
Rödspätta	<i>Pleuronectes platessa</i>	20/20
Skrubbskädda	<i>Platichthys flesus</i>	20/20
Piggvar	<i>Scophthalmus maximus</i>	15/20
Slätvar	<i>Scophthalmus rhombus</i>	19/20
Tunga	<i>Solea solea</i>	16/20
Öring	<i>Salmo trutta</i>	1/20
Röt-/Hornsimpa	<i>Myoxocephalus scorpius/quadricornis</i>	6/20
Sjurygg	<i>Cyclopterus lumpus</i>	2/20
Knot	<i>Eutrigla gurnardus</i>	19/20

För regionen mer sällsynta arter som detekterades var randig sjökock, rödtunga, bergskädda, tunga och knot. Vidare detekterades ansjovis (*Engraulis encrasicolus*) och marulk (*Lophius piscatorius*) i ett prov vardera, samt havskatt i två av 20 prover. Ansjovis är en sporadisk besökare till den svenska västkusten men har även påträffats ett fåtal gånger tidigare i Östersjön (SLU Artdatabanken 2021). Marulk är allmän i västerhavet men har även tidigare observationer i Öresund (SLU Artdatabanken 2021). Även havskatt är allmän längs västkusten men förekommer också sällsynt i Öresund och de västligaste delarna av Östersjön (SLU Artdatabanken 2021).

³ Exempel på naturlig kontaminering inkluderar: frekventa besökare på platsen, avföring från rovdjur, boskap, avloppsvatten och fiskbete. Denna typ av kontaminering är vanligtvis oundviklig och mycket svår att kvantifiera. Typiska kontamineringsarter inkluderar ko, gris, hund, katt, får etc.

Proportioner av detekterade sekvenser inom varje prov visar på en klar dominans av torsk, skarpsill, rödspätta och skrubbskädda. Proportioner av detekterade sekvenser inom varje prov för de tolv vanligast förekommande arterna visas i Figur 4.



Figur 4. Proportioner av detekterade sekvenser för de tolv vanligast förekommande arterna vid eDNA-inventeringen av fisk i augusti 2021. TTG: territorialgräns, EEZ: exklusiv ekonomisk zon.

De negativa kontrollerna uppvisade förväntade resultat med låga koncentrationer av DNA (tabell 4). Resultaten påvisade dock detektioner av några av vanligaste förekommande arterna vilket högst sannolikt härrör från kontamination av havsvatten. Då källan kan bestämmas samt att kontaminationsnivåerna var så pass låga bedöms det sakna betydelse för resultatet.

Tabell 4. Volym anger medelvolym filtrerat vatten per prov. eDNA koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific).

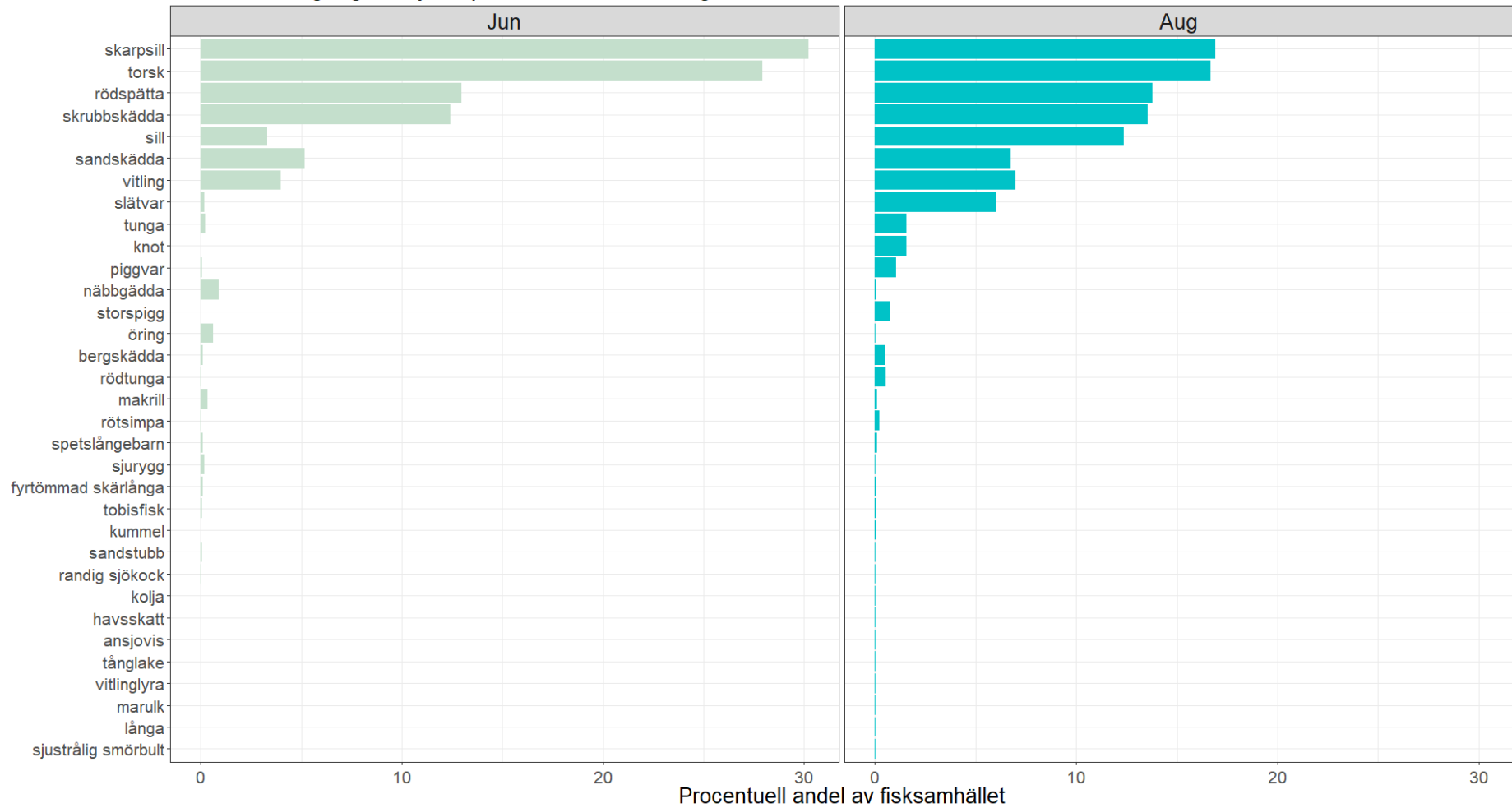
Prov ID	Volym filtrerat (ml)	DNA (ng/ul)
T_01_Y	5000	80.4
T_01_B	5000	20.2
T_02_Y	5000	82
T_02_B	5000	23.2
T_03_Y	5000	89.0
T_03_B	5000	22.6
T_04_Y	5000	75
T_04_B	5000	5.96
T_05_Y	5000	104
T_05_B	5000	18
T_06_Y	5000	34.2
T_06_B	5000	16.9
T_07_Y	5000	31.0
T_07_B	5000	12.7
T_08_Y	5000	45.8
T_08_B	5000	9.7
T_09_Y	5000	64
T_09_B	5000	11.6
T_10_Y	5000	10.6
T_10_B	5000	46.2
Fält neg 1	1500	1.55
Lab neg 1	NA	0.39

4. DISKUSSION OCH ANALYS

Analysen av variationen mellan inventeringar visade att det var sju fiskarter som dominerande vid båda inventeringstillfällena (sill, skarpsill, torsk, sandskädda, vitling, rödspätta och skrubbskädda), med över 90% av alla eDNA-sekvenser vid respektive inventering (figur 5). Av dessa var det sill, skarpsill och torsk som påvisade en signifikant variation mellan inventeringarna (t-test, $df = 9$, $p < 0,05$). Skarpsill och torsk minskade från juni till augusti medan sill ökade. Att det var signifikant mer detektioner av torsk i juni kan bero på att det var större mängder könsceller i vattnet då inventeringstillfället sammanföll med artens lekperiod (Öhman m.fl. 2021).

Fisksamhällets variation bedömdes även utifrån dess eDNA-sekvenser via NMDS (non-metric multidimensional scaling). NMDS är en multivariat ordinations-teknik som bedömer variation i ett obegränsat antal parametrar, i detta fall fiskarter, och omvandlar den samlade variationen till ett geometriskt avstånd som beskriver lokalernas relativa likhet till varandra. Är två prover lika, placeras de i närheten av varandra i grafen och på så sätt går det att utläsa om det är någon specifik förklaringsvariabel, exempelvis djup, som påverkar vilka fiskarter som återfinns i respektive provtagning. Vidare säger en NMDS inget om den absoluta nivån av skillnad, utan endast provers relativa likhet.

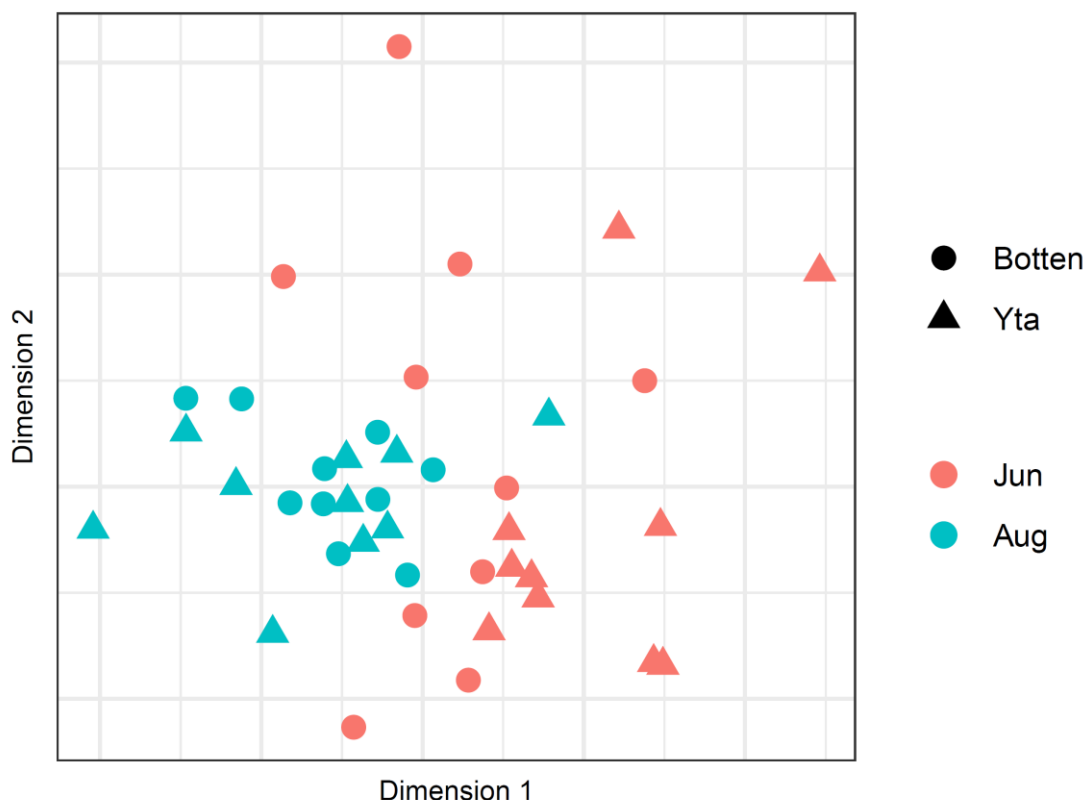
Genomsnittlig signalstyrka per eDNA-inventering, MiFish, Triton 2021



Figur 5. Genomsnittlig DNA-signalstyrka från respektive inventering. Y-axel = arter, X-axel procentuell andel av fiskesamhället. Sju arter (skarpsill, sill, torsk, vitling, rödspätta, skrubbskädda och sandskädda) utgjorde tillsammans >90% av eDNA-sekvenserna vid båda inventeringstillfällena. Skarpsill, sill och torsk varierande signifikant mellan inventeringstillfällena.

En NMDS som initialt beräknades för de dominerande arterna påvisade en svag, men noterbar, gruppering för respektive inventeringstillfälle. När samtliga fiskarter inkluderas i NMDS-analysen separerade kluster från respektive inventering tydligt, medan provtagningens djup saknade noterbar effekt på den observerade variationen i fisksammansättning (figur 6).

NMDS: Variation i fisksammansättning, Triton 2021



Figur 6. Variationen i fisksammansättning bland eDNA-prover analyserade med fiskprimern MiFish, beräknat via non-metric multi-dimensionell scaling (NMDS). Varje punkt representerar ett prov, färg representera månaden för inventeringstillfället och form representera provets djupnivå. Grupperingen av proverna inom respektive inventeringstillfälle påvisar en förändring av fisksamhället. Djupnivå uppvisade ingen påverkan på variation i fisksamhället. Stressnivå: 0,121, K-dimensioner=3, distanstyp: bray-curtis.

Sammantaget kan man utläsa att förändringar skedde i fisksamhället men att stommen av de observerade samhällena bestod mellan de två inventeringstillfällena. De sju mest förekommande fiskarterna, vilka utgjorde över 90% av det totala antalet sekvenser, var de samma i augusti och juni. Dock förekom det variation inom denna fördelning, där sill och skarpsill hade en statistiskt signifikant ökning i augusti medan torsk minskade.

Den observerade fiskdiversiteten i juni var 24 taxa som ökade till 33 i augusti. Arterna som skiljde mellan inventeringstillfällena var mindre vanligt förekommande fiskarter för området, så som havskatt, marulk och ansjovis.

Påverkan av fysikaliska faktorer så som djup, syre och salinitet testades men uppvisade endast marginell inverkan på fisksamhällets sammansättning. Endast arterna sandskädda och sill varierade signifikant med djup vid inventeringstillfället i juni (t-test, sandskädda, $df = 9$, $p < 0,05$) (t-test, sill, $df = 9$, $< 0,0001$). I NMDS-tester sågs ett svagt mönster i relation till djup och salinitet vid första inventeringen men vid andra inventeringen saknades denna korrelation helt. Vidare kan vi se i NMDS:en ovan (figur 6) att effekten av djup

försvinner när den ställs i relation till variationen i fiskssamhället mellan inventeringstillfällen.

Rörelse av eDNA-partiklar i vattenmassan har sannolikt en påverkan på de svaga korrelationer mellan fiskssamhället och de fysikaliska parametrarna. Exempelvis kan det inte uteslutas att en eDNA-partikel i den djupare vattenmassan ursprungligen kommit från en individ som befann sig högre upp i vattenpelaren.

Fisksamhällen inventerade med eDNA skiljer sig normalt från de som detekteras i traditionella provfisken. Den största skillnaden är att fler arter detekteras med eDNA-provtagning per provtagen station. Att till viss del andra arter detekterats än vid standardiserade provfisken beror på flera faktorer. Till exempel så kan eDNA-provtagning utföras i miljöer som sällan provfiskas med standardiserade metoder samt under andra säsonger. Det är dessutom väl känt att rörliga och pelagiska arter är överrepresenterade vid nätprovfisken, samt att demersala arter ofta är överrepresenterade vid trålprovfisken. Då eDNA är relativt kortlivat i vattenmiljön (normalt några dagar till två veckor) ger resultaten en bild av fiskssamhället för en kort period innan inventeringstillfället. Detta medför att för målarter av särskilt intresse som utnyttjar områden under en begränsad period av året, för exempelvis lek eller migration, är det av vikt att genomföra provtagningen vid rätt tidpunkt.

Med de genetiska markörer och det genetiska referensbibliotek som användes vid tillfället för analys var det inte möjligt att skilja mellan olika arter av simpor (*Myoxocephalus sp.*) och tobisfiskar (*Ammodytes sp.*). Sekvensen för *Myoxocephalus sp.* var en perfekt match till både rötsimpa (*M. scorpius*) och hornsimpa (*M. quadricornis*), vilka inte går att skilja på denna gen. Detektionen tillhör troligen rötsimpa då hornsimpa främst förekommer längre norrut i Östersjön samt i sjöar i mellersta Sverige. Sekvensen för *Ammodytes sp.* matchar med arterna kusttobis (*A. tobianus*) och havstobis (*A. marinus*). Då havstobis endast förekommer sporadisk längst den svenska västkusten tillhör detektionen med största sannolikhet kusttobis som är vanligt förekommande längs hela svenska kusten.

Sammanfattningsvis visar resultatet på att fiskssamhället utgörs av fiskar och marina däggdjur som överlag är typiska för regionen. Vidare uppvisar resultaten att de dominerande arterna är de samma vid båda inventeringstillfällen (figur 5), men en viss variation i förekomst samt artsammansättning kunde också påvisas (figur 6). Resultatet styrker ytterligare att analys av eDNA är en metodik som kan användas för att inventera och tydligt visa den mångfald samt sammansättning av arter som förekommer i både större och mindre vattenmassor.

REFERENSER

- Artdatabanken, SLU. Ansjovis - Artbestämning från SLU Artdatabanken (artfakta.se).
Läst 26 oktober 2021.
- Artdatabanken, SLU. Marulk - Artbestämning från SLU Artdatabanken (artfakta.se).
Läst 26 oktober 2021.
- Artdatabanken, SLU. Havskatt - Artbestämning från SLU Artdatabanken (artfakta.se).
Läst 26 oktober 2021.
- Bohmann, K., A. Evans, M. T. P. Gilbert, G. R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, D. W. Yu, och M. de Bruyn. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 29:358 – 367.
- Deiner, K., H. M. Bik, E. Mächler, M. Seymour, A. Lacoursière-Roussel, F. Altermatt, S. Creer, I. Bista, D. M. Lodge, N. de Vere, M. E. Pfrender, och L. Bernatchez. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26:5872-5895.
- Evans, N. T., B. P. Olds, M. A. Renshaw, C. R. Turner, Y. Li, C. L. Jerde, A. R. Mahon, M. E. Pfrender, G. A. Lamberti & D. M. Lodge. (2016). Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 16: 29–41.
- 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.
- 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.
- Näslund J., Didrikas T., Hellström P, Hellström M., Inventering av fiskfaunan i Gåsefjärden, Karlskrona Skärgård, med nätprovfiske och eDNA. *AquaBiota Rapport* 2019:15. ISBN: 978-91-89085-02-2.
- 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.
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., ... & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020.
- Spens, J., A. R. Evans, D. Halfmaerten, S. W. Knudsen, M. E. Sengupta, S. S. T. Mak, E. E. Sigsgaard, och M. Hellström. (2017). Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645.
- Stoeckle, M. Y., Adolf, J., Charlop-Powers, Z., Dunton, K. J., Hinks, G., & VanMorter, S. M. (2020). Trawl and eDNA assessment of marine fish diversity, seasonality, and relative abundance in coastal New Jersey, USA. *ICES Journal of Marine Science*.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793.

- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Møller, P. R., Rasmussen, M., & Willerslev, E. (2012). Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS one*, 7(8), e41732.
- Thomsen, P. F., Møller, P. R., Sigsgaard, E. E., Knudsen, S. W., Jørgensen, O. A., & Willerslev, E. (2016). Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PloS one*, 11(11), e0165252.
- Trigal, C., & Degerman, E. (2015). Multiple factors and thresholds explaining fish species distributions in lowland streams. *Global Ecology and Conservation*, 4, 589-601.
- Valsecchi, E., Bylemans, J., Goodman, S. J., Lombardi, R., Carr, I., Castellano, L., ... & Galli, P. (2020). Novel universal primers for metabarcoding environmental DNA surveys of marine mammals and other marine vertebrates. *Environmental DNA*, 2(4), 460-476.
- Ushio M, Murakami H, Masuda R, Sado T, Miya M, Sakurai S, Yamanaka H, Minamoto T, Kondoh M (2018) Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics* 2: e23297.
- Zou, K., Chen, J., Ruan, H., Li, Z., Guo, W., Li, M., & Liu, L. (2020). eDNA metabarcoding as a promising conservation tool for monitoring fish diversity in a coastal wetland of the Pearl River Estuary compared to bottom trawling. *Science of the Total Environment*, 702, 134704.
- Öhman MC, Karlsson M, van der Meijs F, Isaksson E, Berggren T, Östman A, Andersson-Li M (2021). Fisk och havsbaserad vindkraft i Östersjön söder om Skåne - Vindpark Triton. AquaBiota Report 2021:07.

Bilaga 1 Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar

Varje levande art utsöndrar genetisk arvs massa eller DNA i sin omgivning genom respiration, rörelser, filtrering, avföring, döda hudceller osv. Detta DNA som lämnas kvar i miljön utan att individen i sig provtas kallas miljöDNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) och kan samlas in och renas fram. Vissa delar av en arts DNA är helt unikt för just den arten, medan andra delar av DNA ser likadant ut hos alla organismer i en grupp. Med hjälp av globala databaser över DNA-sekvenser, som är öppet tillgängliga (ex <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), kan man välja ut ett kort segment DNA i ett område av intresse och kopiera sektion industriellt. DNA segmenten som tillverkas kallas då primer eller markör. Dessa analyserar då den del av genomet man är intresserad av, vilket gör att analyserna kan genomföras inom en rimlig tid- och budgetram i jämförelse med hela genomstudier. Markören för en art kan ibland matcha en hel artgrupp som exempelvis fiskar vilket man kan dra nytta av eftersom markören då kopierar DNA för ett specifikt område för en hel artgrupp. Resultatet, dvs ett DNA segmentet som markören kopierar kallas barcode (streckkod), och kan liknas vid den streckkod som används för att betala för enskilda varor i affärer. Dessa markörer, en droppe eDNA, ett enzym och salter blandas i ett provrör. Provröret placeras i en maskin som gör DNA kopior, en s.k. PCR (Polymerase Chain Reaction), vilket imiterar processen som sker när celler delar sig och skapar dubletter av sin arvs massa. Med hjälp av en sekvenseringsmaskin kan man sedan läsa DNA-kopierarnas nukleotidsekvenser. Denna information jämförs sedan mot databaser över arters DNA-sekvenser för att bestämma vilken eller vilka arter DNA-sekvenserna tillhörde.

Enartsstudier qPCR eller ddPCR

Inventering av förekomst av en enstaka art med eDNA görs med så kallad qPCR eller ddPCR (quantitative- och digital droplet-PCR). Frågeställningen för dessa studier är: **Finns arten här?** Varje art analyseras med en markör som är specifik för precis den arten. Provs varen anger närvaro/frånvaro av just den arten och en relativ eDNA-abundans mellan olika provtagningslokaler.

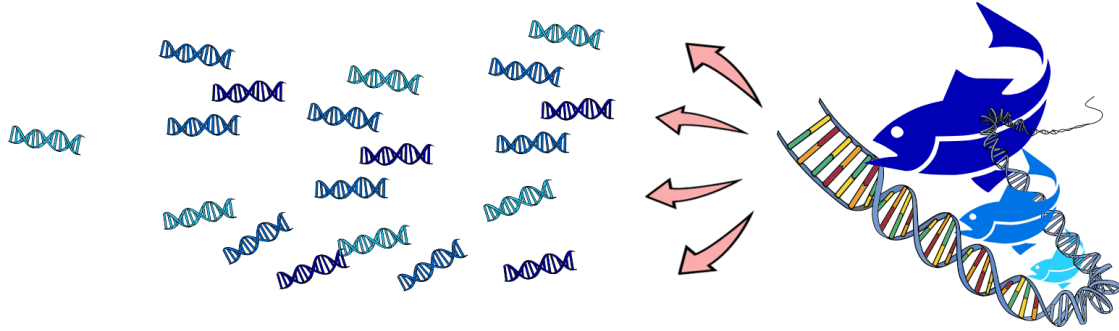
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundanser mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Som exempel kan nämnas att 1000 DNA kopior av gädda inte motsvarar 1000 kopior av abborre och analyserna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

Flerartsstudier – Metastreckkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

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

Metastreckkodning eller metabarcoding innebär att man designar en primer som är gemensam för alla arter inom en grupp – indelade exempelvis med fokus på fisk, fokus på groddjur eller fokus på musslor. Eftersom man analyserar flera olika arter på en gång kallas metoden metastreckkodning. Anledningen till att man inte kan analysera alla djurgrupper samtidigt med en primer är det inte finns lämpliga målregioner i genomen som både är gemensamma för alla arter men samtidigt varierar så pass mycket att enskilda arter kan identifieras. Dessa möjligheter kan komma att förändras i framtiden, om sekvenseringsmetoder utvecklas som kostnadseffektivt kan läsa längre genregioner.

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



BILAGA 2. KVALITETSSÄKRING AV EDNA

Därför är kontrollprover nödvändiga vid eDNA-provtagning

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

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

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

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

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

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

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

- | |
|--|
| a) en cancersjuk person blir inte diagnostiserad och dör |
| b) en skyldig person kan inte bindas till brottet |
| c) ett faderskapstest kan inte knyta rätt far till barnet |
| d) arter som finns i ett område detekteras inte (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 beredskapscapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad provberedning. -Nationellt Forensiskt Centrum, NFC 2017-05-07. NFC Rapport Avdelningskansliet 2017:04
- SFMG, Svensk Förening för Medicinsk Genetik. 2011. Riktlinjer för kvalitetssäkring i klinisk genetisk verksamhet. http://sfmg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf



www.aquabiota.se

