

Inventering av fiskarter med eDNA i Moälven Fiskförekomst och indikatorer för förorening



MIX Research

LIMNORDIC AB

Inventering av fiskarter med eDNA i Moälven

Fiskförekomst och indikatorer för förorening

| | |
|-------------------------------|--|
| Utgiven av: | MIX Research & Limnordic AB |
| Uppdragsgivare: | Nedre Moälvens FVO och Föreningen Moälvsfisket |
| Författare: | Micaela Hellström, Johan Spens |
| Granskare: | Författarna samt uppdragsgivarna |
| Omslagsbild | Provtagning vid N. Anundsjöån - Foto: Hannah Phillips |
| Foton: | Hannah Phillips, Liselott Rasmussen, Izabell Fontaeus och Micaela Hellström. |
| Fältarbete | Hannah Phillips, Liselott Rasmussen, Izabell Fontaeus |
| Uppdraget utfördes av: | MIX Research Sweden, AB Postadress: Uppsala Science Park, Dag Hammarskjölds väg 34A, 75237 Uppsala E-post: micaela@mixresearch.se Telefon: 070-782 03 10 |
| | LIMNORDIC AB Järvedsvägen 41B, 891 77 Järved, Örnköldsvik johan.spens@gmail.com Telefon: 076-7601124 |
| Rapporten citeras som: | Hellström, M & Spens J. 2021. Inventering av fiskarter med eDNA i Moälven. Fiskförekomst och indikatorer för förorening. MIX Research 2021:07 |

FÖRORD

Nedre Moälvens Fiskevårdsområde (FVO) och Föreningen Moälvsfisket har i decennier varit aktiva med att i samarbete med länsstyrelsen i Västernorrlands län och Örnsköldsvik kommun följa upp och observera förändringar av fiskartssammansättning och förändringar i Moälven. Observationer av fiskförekomster och förändringar i artsammansättningar är viktiga som dataunderlag för att på ett hållbart sätt planera sportfisket samt för att åtgärda kemisk och fysisk inverkan från mänskliga aktiviteter som påverkar miljön.

Denna undersökning är en del av Nedre Moälvens Fiskevårdsområde (FVO) och Föreningen Moälvsfisket inventeringsuppdrag. Flerartsanalyser med hjälp av akvatiskt eDNA (från engelskans environmental DNA) utfördes för fisk (14 lokaler) och flodkräfta (2 lokaler)

Artdetektioner baserade på eDNA identifierade 21 unika fiskarter och ett artkomplex som antingen är stäm eller id (eller båda arterna tillsammans). Flodkräfta registrerades på den ena av de två undersökta lokalerna. Tidsserier av historisk vattenkemi, barriärer och höjdskillnader i landskapet förenat med historiska utsättningar förklarar fiskarnas förekomst på de olika platserna.

Resultaten i rapporten fungerar som underlag för framtida skydds- och åtgärdsprogram för att uppnå miljömålen inom "Levande sjöar och vattendrag" och "Biologisk mångfald" i nära samarbete med uppdragsgivarna, länsstyrelsen och kommunen.

Uppsala/Örnsköldsvik 30 oktober 2021

Micaela Hellström
MIX Research

Johan Spens
Limnordic AB

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

| | |
|--|----|
| Innehållsförteckning..... | 7 |
| 1 INLEDNING..... | 8 |
| 2 METODER | 9 |
| 2.1 FÄLTARBETE..... | 9 |
| 2.1 LABORATORIEARBETE | 11 |
| 2.2 eDNA FLERARTSANALYSER | 11 |
| 2.3 ANALYSER VERIFIERING OCH MILJÖDATA..... | 11 |
| 3 RESULTAT..... | 12 |
| 3.1 SEKVENSERINGSRESULTAT | 12 |
| 3.1.1 FLODKRÄFTA..... | 12 |
| 3.1.2 FISKARTERNAS FÖREKOMST MED eDNA - ÖVERSIKT | 12 |
| 3.1.3 JÄMFÖRELSE eDNA OCH PROVFISKEN | 14 |
| 3.2 MILJÖFAKTORER OCH MILJÖPROBLEM I OMRÅDET | 15 |
| 3.2.1 ÖVERGÖDNING..... | 17 |
| 3.2.2 FÖRSURNING | 17 |
| 3.3 ÅTGÄRDER OCH FÖRSLAG | 18 |
| 3.4 FISKARTER I MILJÖN | 19 |
| 4 SLUTSATSER..... | 24 |
| 5 TACK | 25 |
| 6 REFERENSER | 25 |
| Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser? | 27 |
| Bilaga 2. Laboratoriearbete flerartsanalyser..... | 28 |
| Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA - kontroller | 30 |
| Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas | 30 |
| Bilaga 5: Resultat av kvalitetskontroller för flerartsanalyser | 32 |
| Bilaga 6: Fördelning av artläsningar inom lokalerna | 33 |
| Bilaga 7: Vattenanalyser och definitioner | 34 |

1 INLEDNING

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

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 eller åtgärder och tillståndsprövningar angående infrastruktur. Traditionella artinventeringar kan vara både tids- och resurskrävande vilket ofta gör storskaliga undersökningar av arters utbredning och förekomster ogenomförbara. Vidare är många provtagningsmetoder destruktiva vilket kan påverka sällsynta och hotade arter negativt. Eftersom eDNA-metoden är en icke-dödande metod är den idealisk för kartläggning av biologisk mångfald. Informationen kan sedan användas för att lokalisera områden som kräver traditionella metoder för vidare undersökningar av habitat och arter gällande ålder, storleksfördelning och reproduktionsframgång. En korrekt analys och tolkning av eDNA resultat kräver kontinuerlig uppdatering av traditionell och genetisk taxonomi, molekylära metoder samt ekologiska kunskaper och information på hur fysiska och kemiska faktorer påverkar arters utbredning.

eDNA har visat sig vara en oslagbar metod då det gäller att inventera stora mängder arter på kort tid, vilket ofta kan ge en mer precis bild av artsammansättningen på en lokal jämfört med andra metoder. Vidare är inventeringar på ett större antal lokaler och större geografisk skala möjlig, eftersom provtagningen i fält kräver mindre tid än traditionella metoder. En organism behöver inte fastna i ett nät eller upptäckas av en kamera för att detekteras. Vidare pågår ett forskningsprojekt som har visat att signalerna släcks ut på korta avstånd på mindre än en km eller då t. ex. rinnande vatten övergår in i en damm eller sjö eller när ett biflöde rinner in i ett huvudflöde.

MIX Research och Limnordic AB har på uppdrag av Nedre Moälvens Fiskevårdsområde (FVO) och Föreningen Moälvsfisket undersökt 14 lokaler i Moälven för fiskförekomst (med fokus på indikatorarter) i kombination med information om vandringshinder, vattenkemi och tidigare kalkningsaktiviteter. Alla 14 lokaler undersöktes för fiskförekomst och två lokaler analyserades för förekomst av flodkräfta.

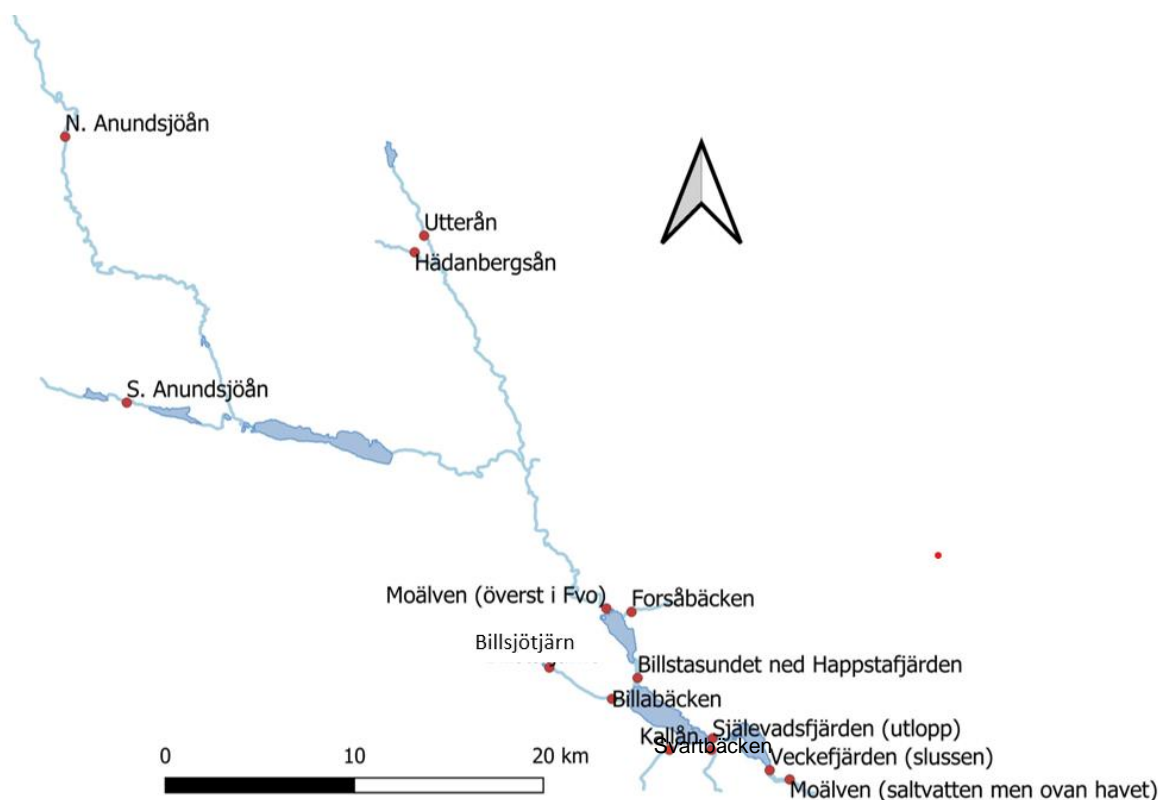
Resultaten i rapporten fungerar som underlag för framtida skydds- och åtgärdsprogram för att uppnå miljömålen inom "Levande sjöar och vattendrag" och "Biologisk mångfald" i nära samarbete med uppdragsgivarna, länsstyrelsen och kommunen.

2 METODER

2.1 FÄLTARBETE

Fältarbetet utfördes 17-19 juni 2021 i Moälven på 14 olika lokaler (14 provtagningspunkter och 19 prover samt två blanka kontroller) (Figur 1, Tabell 1, omslagsbild och figur 2).

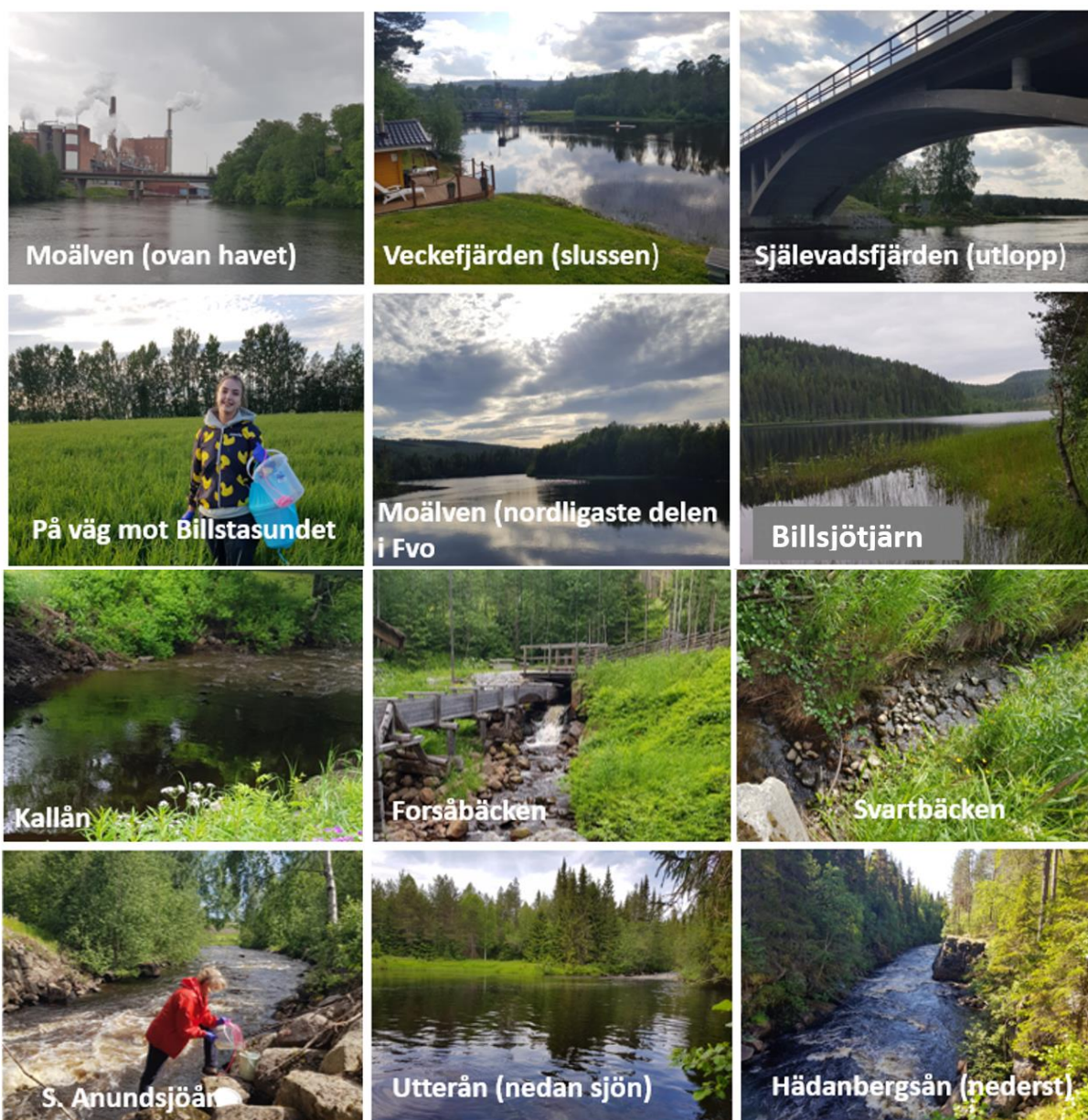
Innan eDNA-provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila enheter som lades ihop till DNA-fria kit. För varje provpunkt (14 lokaler och 19 provpunkter) samlades 5 liter vatten in i form av delprover som sammanfördes till ett samlingsprov för säkrare resultat (Harper m. fl. 2018). Provtagarna bar sterila handskar och munskydd för att förhindra att proverna kontamineras (se omslagsbild). Vattnet filtrerades för hand med en 100 ml steril spruta genom 5 µm GF/0,8 µm PES inkapslade filterenheter (se omslagsbild) (NatureMetrics Ltd UK). Medelvolymen vatten som filtrerades var 2 L (se bilaga 5 tabell B_5.1) Provpunkterna registrerades med GPS och vattentemperaturen mättes. Fixering med 96% etanol (molekylär grad 200 proof) följde protokoll enligt Spens m.fl. (2017). Efter avslutat fältarbete skickades de fixerade proven till laboratorier enbart avsedda för eDNA analys, för genetisk testning.



Figur 1. Karta över provtagningsområdet samt utsatta provpunkter. Se tabell 1 för detaljerad information..

Tabell 1. ProvtagningslokalER. Namn, datum, typ av artanalyser (fisk, kräftor), volym filtrerat vatten (ml), koordinater (RT90 och WGS 84)

| Provnr | Lokal | Datum | Fisk | Kräfta | # replikat | V ml | T °C H2O | Lat RT90 N | Long RT90 W | WGS 84 LAT | WGS 84 Long |
|--------|---------------------------------------|------------|------|--------|------------|------|-------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| MO_05 | Moälven (ovan havet) | 18/06/2021 | X | | 1 | 2100 | 17.2 | 7021090 | 1644750 | 63.27366 | 18.4959 |
| MO_01 | Veckefjärden (slussen) | 18/06/2021 | X | | 1 | 2500 | 17.2 | 7021580 | 1643690 | 63.2747 | 18.6683 |
| MO_02 | Själlevadsfjärden (utlopp) | 18/06/2021 | X | | 1 | 2300 | 16.1 | 7023260 | 1640670 | 63.29095 | 18.6096 |
| MO_03 | Billstasundet | 17/06/2021 | X | X | 2 | 1600 | 17.1 | 7026459 | 1636700 | 63.32115 | 18.5333 |
| MO_04 | Moälven (nordligaste delen i Fvo) | 17/06/2021 | X | | 1 | 2100 | 15.7 | 7030130 | 1635050 | 63.35467 | 18.5035 |
| MO_06 | Billsjötjärnen | 18/06/2021 | X | | 2 | 3000 | 15.6 | 7027010 | 1632032 | 63.32784 | 18.4407 |
| MO_07 | Billabäcken | 17/06/2021 | X | | 1 | 1200 | 18.4 | 7025347 | 1635347 | 63.3117 | 18.5054 |
| MO_08 | Kallån (inkl. Skrikesjön och Åtesjön) | 18/06/2021 | X | | 1 | 1500 | 14.8 | 7022660 | 1638380 | 63.28646 | 18.5635 |
| MO_09 | Forsåbäcken (inkl. Huggsjön) | 17/06/2021 | X | | 1 | 1180 | 14.3 | 7029950 | 1636380 | 63.35255 | 18.5299 |
| MO_10 | Svartbäcken | 18/06/2021 | X | | 1 | 1200 | 12 | 7022660 | 1640600 | 63.2856 | 18.6077 |
| MO_11 | S. Anundsjöån (ovan Gensjösjön) | 17/06/2021 | X | X | 2 | 1800 | 15.8 | 7041013 | 1609665 | 63.46091 | 18.0042 |
| MO_12 | N. Anundsjöån (NedanFällforsen) | 17/06/2021 | X | | 2 | 1900 | 14.5 | 7055070 | 1606405 | 63.58792 | 17.9483 |
| MO_13 | Utterån (Nedan Uttersjön) | 17/06/2021 | X | | 2 | 1700 | 15.2 | 7049837 | 1625404 | 63.5348 | 18.3265 |
| MO_14 | Hädanbergsån (Nederst) | 17/06/2021 | X | | 1 | 2200 | 16.7 | 7048960 | 1624901 | 63.52712 | 18.3157 |

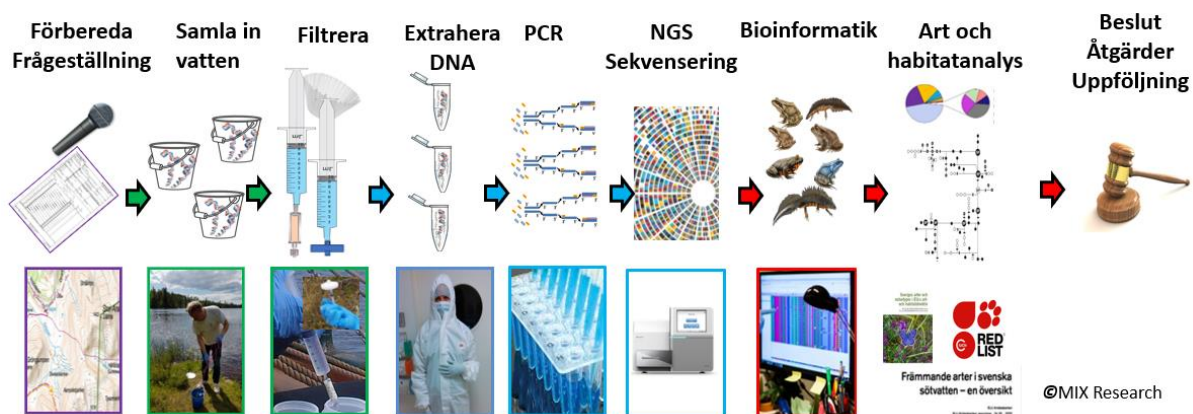


Figur 2. Provtagningspunkter. Pärmbild visar N. Anundsjöån.

Ett pågående forskningsprojekt (Hellström m. fl. opublicerat data) har visat att ett eDNA prov per lokal (där ett prov tas som flera underprover) ger en 87 % detektionssäkerhet av målarter, två prover per lokal i liknande förhållanden höjer detektionssäkerheten till 96%. Dubbla prover samlades in i några av lokalerna för att uppnå mer pålitliga resultat, där 96% av alla arter då antas ha detekterats.

2.1 LABORATORIEARBETE

Flödesschema för fält- och laboratoriearbete sammanfattas i figur 1 och beskrivs i detalj under sektion 3.1 samt i bilagorna 1 – 4. Bakgrund för enarts- och flerartsanalyser beskrivs i bilaga 1. Kräftanalyserna utfördes med enartsanalyser. Enartsanalysen fokuserar endast på en art och kan ej upptäcka om andra arter finns t. ex om signalkräfta planterats ut. Markörer och laboratoriearbete samt dataanalys för flerartsanalyser används i denna undersökning - Se bilaga 3 och 4 för kontroller och skullkrav. Kvalitetskontroller anges i bilaga 5. Eftersom flera olika artgrupper undersöktes gjordes separata analyser från ett och samma eDNA-prov för att undersöka artförekomster (Figur B2_1 bilaga 2).



Figur 3. Flödesdiagram som visar de olika stegen för flerartsanalyser från fältplanering till beslut och åtgärder (laboratoriearbete och bioinformatik beskrivs i Bilaga 2).

2.2 eDNA FLERARTSANALYSER

Bioinformatiken beskrivs i bilaga B.2.3 (anger relativ biomassa från mest till minst dominerande art). Antalet läsningar i ett prov ger en uppfattning om den relativa förekomsten av arten vid en punkt. Kvalitetskontroller samt skullkraven beskrivs i bilaga 3 och 4. Vidare kontrollerades sekvenserna huvudsakligen mot NCBI:s databas samt mot en intern referensdatabas. Resultaten jämfördes även med andra eDNA rapporter och sekvenserna som kan ge upphov till olika resultat undersöktes noggrant för att nå verklighetsbaserade resultat.

2.3 ANALYSER VERIFIERING OCH MILJÖDATA

På två lokaler jämfördes registrerad fiskförekomst mellan eDNA prover tagna för detta uppdrag under en tidpunkt, och tillgängligt historiskt provfiskedata från elfiskedatabasen SERS som upprätthålls av Sveriges lantbruksuniversitet (SERS 2021) och information från länsstyrelsen i Västernorrland och Örnsköldsviks kommun. Närvaro av arter från eDNA verifierades förutom genom elfiskedata även med uppdragsgivarna och länsstyrelsen.

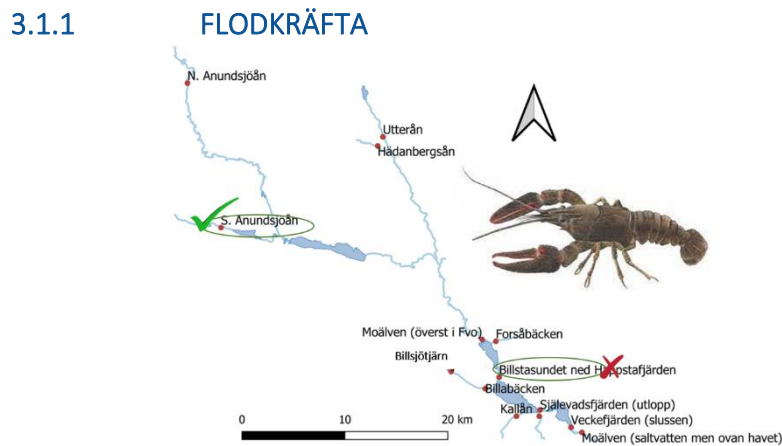
Vattenkemiska data (från Örnsköldsvik kommun och Limnordic AB) som ger information om surhet (pH) och övergödning användes som bakgrundsdata tillsammans med fiskedatat från eDNA för att ge en bild av arternas förekomster i förhållande till miljöfaktorer för att ge underlag för eventuella åtgärder i Moälvens vattensystem. De samlade resultaten fungerar som underlag för åtgärder och uppföljning av ekologisk status i Moälvens vattensystem.

3 RESULTAT

3.1 SEKVENSERINGSRESULTAT

eDNA flerartsanalyser registrerade 21 unika sekvenser på artnivå samt ett artkomplex som anger antingen id eller stäm (eller båda).

Resultaten och kvalitetskontrollerna samt skullkraven beskrivs i bilaga 3 och 4 och redovisas i bilaga 5. Artanalyserna diskuteras i avsnitt 3.1.1 till 3.1.2 i denna rapport. Totalantal läsningar och fullständiga artlistor beskrivs i bilaga 6.



Figur 4. Flodkräftans förekomst på de två undersökta lokalerna.

Flodkräfta påträffades i södra Anundsjöån men inte i Billstasundet. Proverna togs ovanför reningsverket och flodkräftor har påträffats längre ner i systemet. Hot mot flodkräfta är både försurning och kräftpest. eDNA är en god metod för att i framtiden inventera förekomst av flodkräfta och kräftpest för att ge underlag för åtgärder.

3.1.2 FISKARTERNAS FÖREKOMST MED eDNA - ÖVERSIKT

Detektion av fiskarternas förekomst inom de olika lokalerna visas i tabell 4.

Fiskmarkörerna detekterade 21 fiskarter och ett artkomplex. Tabell 4 anger vilka arter som var närvarande på de olika lokalerna som i medeltal visade 10.5 arter per lokal och 1-16 arter (inklusive id/stäm artkomplex) per lokal. Största antalet arter detekterades i Moälven Ö med 16 arter per prov. I Svartbäcken hittades enbart öring i stor mängd.

Artkomplex i detta sammanhang innebär att två arter maskeras som en eftersom de har identiska gensekvenser inom den del av DNA som analyseras (i detta fall en liten del av 12S genen). I denna studie kunde inte fiskmarkören skilja på id/stäm. Sekvenserna för bäck- och flodnejonöga är identiska. Enligt vissa forskare kan dessa två reproducera sig med varandra

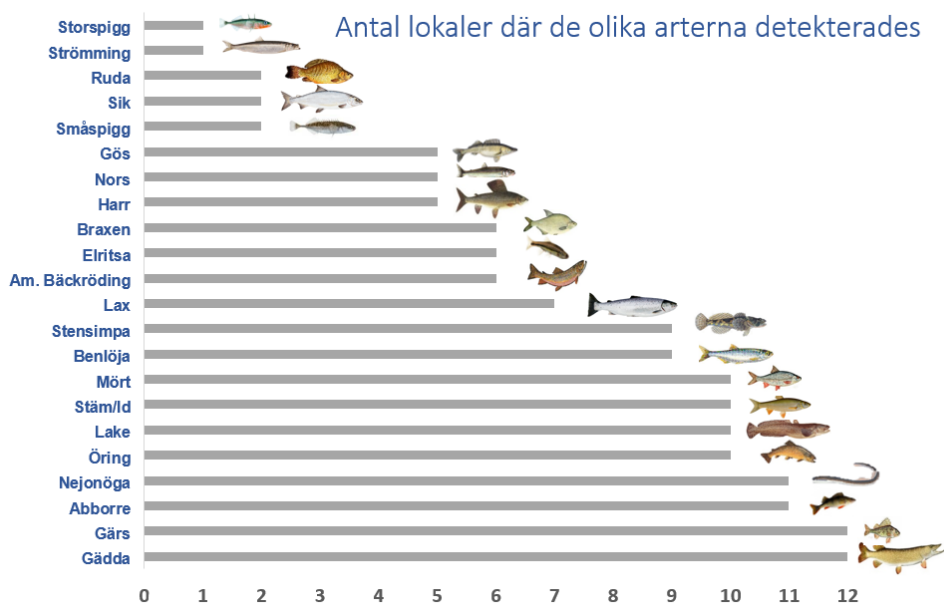
och diskussioner pågår om dessa är en och samma art eller inte (Beamish 1980, De Cashan m. fl. 2020). Arten annoteras som nejonöga i denna analys. Havsnejonöga (som förekommer i Skåne) däremot har sekvenser som skiljer sig markant från flod/bäck-nejonöga.

Tabell 4. Fiskarterna som detekterades på de undersökta lokalerna. Total antal fiskarter detekterade med eDNA anges för varje lokal. Närvaro anges med "X". Färgerna på texten och i första kolumnen anger vilka familjer fiskarna hör till.

| | Moälven hav | Veckefjärden | Självevadsfjärden | Billstasundet | Moälven Ö | Svarbäcken | Kallån | Billsjöjärn | Billabäcken | Forsbäcken | S. Anundsjoån | N. Anundsjoån | Utterån | Hädanbergssån |
|-----------------------|-------------|--------------|-------------------|---------------|-----------|------------|-----------|-------------|-------------|------------|---------------|---------------|-----------|---------------|
| Strömming | X | | | | | | | | | | | | | |
| Storspigg | X | | | | | | | | | | | | | |
| Småspigg | X | | | | | | | | | X | | | | |
| Lax | | | | X | X | | | X | | X | X | X | X | X |
| Öring | | | | X | X | X | | X | X | X | X | X | X | X |
| Am. Bäckröding | | | | | | X | | X | X | | X | X | X | X |
| Harr | | | | X | X | | | | | | | X | X | X |
| Sik | X | X | | | | | | | | | | | | |
| Nors | X | X | X | | X | | | | | X | | | | |
| Gädda | X | X | X | X | X | | X | | X | X | X | X | X | X |
| Abborre | X | X | X | X | X | | X | | X | X | X | X | X | X |
| Gös | X | X | X | X | X | | | | | | | | | |
| Gärs | X | X | X | X | X | | X | | X | X | X | X | X | X |
| Lake | X | X | X | X | X | | | X | | X | X | X | X | X |
| Stäm/ld | X | X | X | X | X | | X | | X | | X | X | X | X |
| Ruda | | X | | | | | | X | | | | | | |
| Mört | X | X | X | X | X | | X | | | X | X | X | X | X |
| Benlöja | X | X | X | X | X | | X | | | X | X | X | X | X |
| Elritsa | | | | X | X | | | | | X | X | X | X | X |
| Braxen | X | X | X | X | X | | X | | | | | | | |
| Stensimpa | X | | X | X | X | | X | | | X | X | X | X | X |
| Nejonöga | | X | X | X | X | | X | | X | X | X | X | X | X |
| Totalt # arter | 15 | 13 | 12 | 15 | 16 | 1 | 10 | 3 | 8 | 5 | 15 | 14 | 14 | 11 |

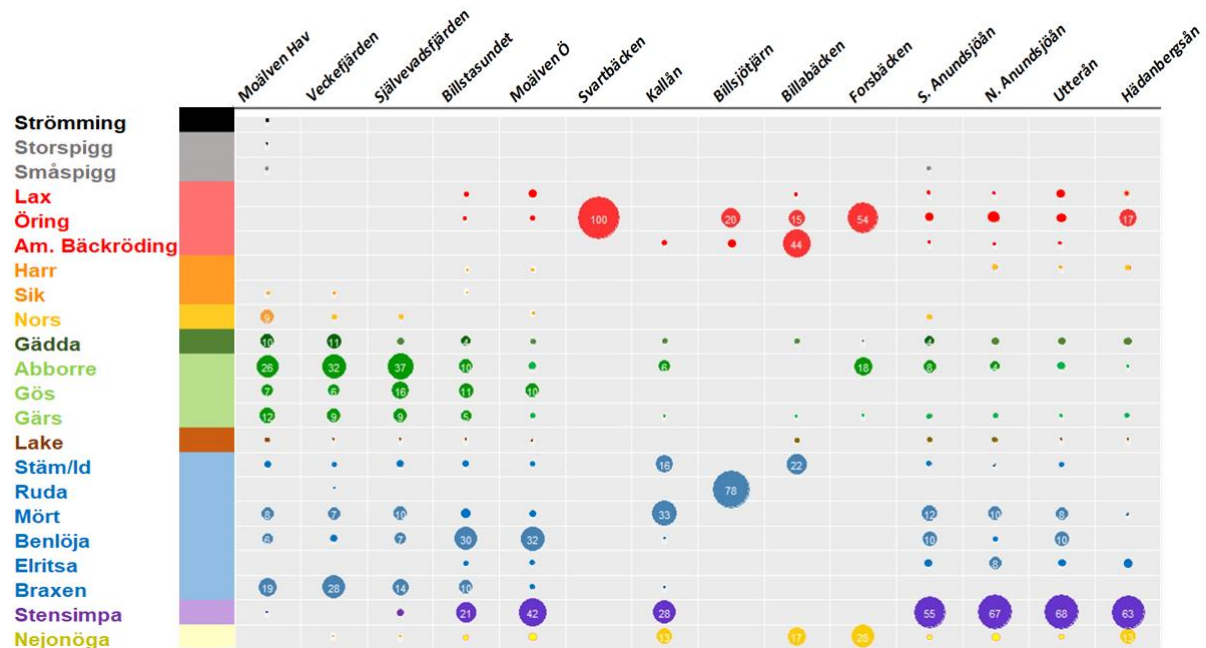
(svart=strömmingfiskar, mörkgrått = spiggar, röd = laxfiskar. mörkororange = laxfiskar, brandgul = nors, mörkgrön = gädda, ljusgrön = abborrfiskar, brun = torskfiskar, blå = karpfiskar, violett = simpor, gul = nejonöga.

Arternas spridning i Moälven på de undersökta lokalerna visar att storspigg och strömming var närvarande på 1 lokal medan gädda och gärs hittades på 12 lokaler (figur 5).



Figur 5. Antal lokaler (av totalt 14) som de olika arterna förekom på. (Bilder från Iduns kokbok Elisabeth Östman 1911, Aktiebolaget Ljus AB, Isaac Marcus Stockholm).

Arternas dominans i förhållande till varandra beskrivs i figur 6. Varje kolumn är en namngiven lokal och cirkelarna i bubbeldiagrammet anger hur många procent av DNA läsningar av de olika arterna förekommer i ett prov. Cirkelarna ökar i storlek ju mer en sekvens av en art påträffas. Detta ger en procentuell överblick av mer och mindre vanliga arter och visar även hur arterna dominerar i olika delar av systemet. Antalet läsningar per art ger en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov (Li m.fl. 2019, Di Muri m.fl. 2020) Exakta antalet läsningar ges i bilaga 6. Detta ger en procentuell överblick av mer och mindre vanliga arter och visar även hur arterna dominerar i olika delar av systemet.



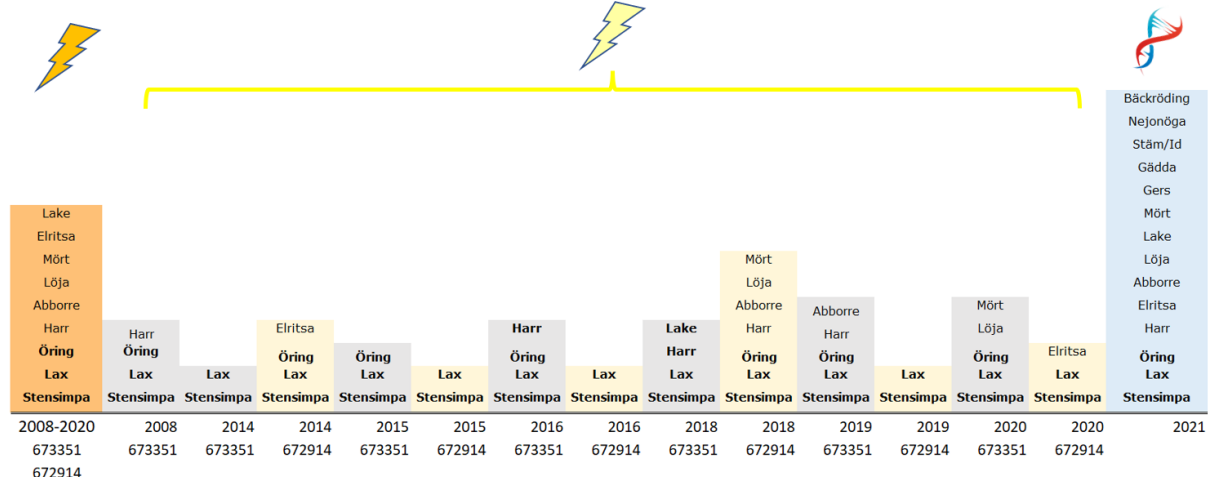
Figur 6. Bubbeldiagram som visar dominansförhållanden av arter inom de 14 olika lokalerna (kolumner). Varje kolumn summeras upp till 100% och ger en uppfattning arter med högre och lägre biomassa. Totala antalet rå-läsningar finns i bilaga 6. Färgerna på texten och i första kolumnen anger vilka familjer fiskarna hör till (svart = strömmingfiskar, mörkgrått = spiggar, röd = laxfiskar, mörkororange = laxfiskar, brandgul = nors, mörkgrön = gädda, ljusgrön = abborrfiskar, brun = torskfiskar, blå = karpfiskar, violett = simpor, gul = nejonöga).

3.1.3 JÄMFÖRELSE eDNA OCH PROVFISKEN

Antal arter som upptäckts genom 13 utfisken med elfiske på två lokaler mellan 2008 och 2020 sammanslogs och jämfördes med eDNA läsningar av fisk i Utterån från ett enda eDNA prov 2021. Stapeldiagrammet i figur 7 visar jämförelsen där provfisken i SERS rapporterar sammanlagt 9 arter. Antalet fiskarter som registrerats per år visas även i figuren. Detta kan jämföras med ett eDNA prov 2021 som detekterade 14 arter (artkomplexet stäm/id räknas som en art) baserat på 1,7 liter filtrerat vatten.

Flera studier världen över visar att eDNA är ett suveränt verktyg för att bestämma arternas mångfald, eftersom flera arter upptäcks med metoden. Traditionella elfisken är inriktade på att följa upp lax, öring och stensimpa och figur 7 visar att dessa arter fångas i elfiske. Elfiske som verktyg kan bestämma storlek och åldersklass, men är inte en lämplig metod då den biologiska mångfalden skall undersökas. Detta överensstämmer med publicerade eDNA-studier som jämför eDNA och provfisken.

Historiska elfisken vs. eDNA Utterån



Figur 7. Stapeldiagram som jämför detektion av fiskförekomst mellan historiskt elfiske och eDNA. Elfiskedata är taget från två provpunkter SERS lokal 673351 (grå staplar) och 672914 (ljusgula staplar). Den brandgula stapeln sammanfattar artdetektion (total artmångfald) med elfiske mellan 2008 och 2020 från de båda elfiskelokalerna. Den blå stapeln anger eDNA provtagningen i denna undersökning som genomfördes med ett prov i Utterån 2021.

3.2 MILJÖFAKTORER OCH MILJÖPROBLEM I OMRÅDET

Vattenkemi tillsammans med biologiska data såsom fiskars, musslors, kärlväxters och kiselalgers närvaro ger ett mått på i vilket skick en sjö eller rinnande vatten är. I detta uppdrag togs tillgängliga mätvärden från kommunen för vattenkemi som sedan matchades med närvaro av fiskarter. Fokus låg på övergödning och försurning. Mätningarna för de undersökta lokalerna anges i tabell 5. Övergödning och försurning och hur de mäts beskrivs i bilaga 7.

Övergödning av vattendrag uppstår då näringsämnen från t.ex. jordbruk eller avlopp når vattendragen och halten av fosfor överstiger 25 µg totalfosfor per liter (Naturvårdsverket 2007, HVMFS 2019). Många fiskarter är känsliga för övergödning medan karpfiskar så som braxen och mört börjar dominera, vilket ytterligare bidrar till övergödningproblemet.

Försurade vattendrag och pH värden beskrivs i bilaga 8. Notera att pH skalan är logaritmisk. Det betyder att då pH värdet sjunker från 7 till 6 är skillnaden 10 gånger surare och då pH sjunker från 6,3 till pH 6,0 så fördubblas koncentrationen av vätejoner. Vatten med låga pH värden gör att många fiskarter och bottenlevande djur inte kan existera i området.

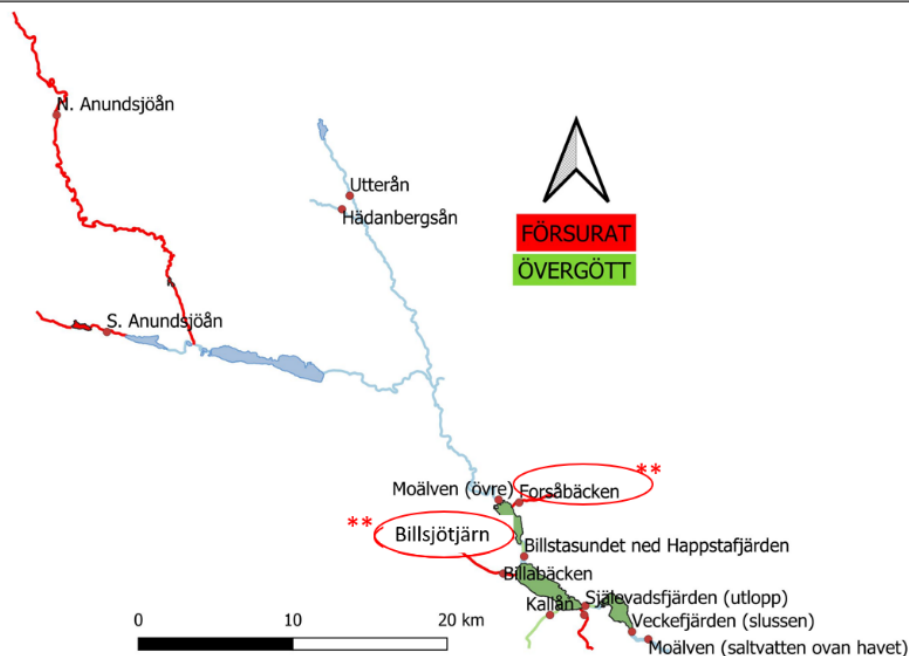
Öring, den invasiva amerikanska bäckrödingen och ruda klarar av mycket låga pH värden, medan mört och lax är känsliga för lågt pH. För försurade vatten visas endast det sämsta provet, dvs vattenprovet med lägsta pH-värdet. Det görs för att normalt det sämsta pH-värdet avgör vilka djur eller växter som överlever. Det viktigaste i försurningskontrollen är därför att hålla pH värdet över 6,3

Bottenlevande djur så som flodkräfta, sötvattenmusslor, insektslarver o.s.v. är känsliga för lågt pH. På HaV:s hemsida kan man läsa att upp till 2/3 av de bottenlevande arterna försvinner i försurade vattendrag. Då pH understiger 6,0 förökar sig flodkräftan sämre medan flodpärlmusslan behöver ett pH som överstiger 6,2 för att kunna fortplanta sig.

Övergödning, pH, konduktivitet, alkalinitet och vattenfärg förklaras och definieras i detalj i bilaga 7 som baseras på HVMFS 2019. Tabell 5 visar vilka lokaler som nått gränsvärden för försurning/övergödning och anger tillgängliga mätvärden. Figur 8 visar lokalerna på en karta där rött indikerar försurning och grön övergödning.

Tabell 5. Vattenkemidata för de olika lokalerna med avseende på försurning (pH, alkalinitet och vattenfärgkonduktivitet) och totalfosforvärden. Datum för vattenprovtagning anges. Värden är historiska värden tagna från kommunen och länsstyrelsens mätningar. Övergödda lokaler anges i grönt, försurade i rött och lokaler med god status i svart. Beteckningarna på totalfosfortabellen visar följande uppmätta fosforvärden: * anger 23 värden på 2000-talet 24,6ug/L. ** anger 4 värden 1990-talet i Vitsjön, *** anger 3 värden 1990 talet, # anger 24 värden 2000-talet Kubbeån, ## anger tre värden 1990 talet i Uttersjön och † anger 3 värden 1990-talet i Hemsjösjön. I N. Anundsjöån mättes all vattenkemi 2020 och pH på okänd punkt 2021.

| Status | Datum prov | H ₂ O # H ₂ O prov | pH | Alk | Kond | Färg | Total P | |
|-------------------------------------|--------------|--|-------|-----------|------|------|---------|-------|
| Moälven (saltvatten men ovan havet) | 27-Aug-07 | 1 st | 7.0 | 0.22 | 31.2 | 75 | 21 | |
| Veckefjärden (slussen) | Övergödd | 2000-talet | 23 st | 6.8 | 0.16 | 4.1 | 108 | 29 |
| Själlevadsfjärden (utlopp) | 2000-talet | 24 st | 6.8 | 0.15 | 3.5 | 109 | 24 | |
| Billstasundet nedan Hapstafjärden | 14/10/2020 | 1 st | 6.6 | 0.09 | 3 | 163 | 25* | |
| Moälven (översta delen i Fvo) | Övergödd | 2000-talet | 10 st | 6.8 | 0.15 | 3.2 | 107 | 32 |
| Svartbäcken | Återförsurad | 2000-talet | 6 st | 5.5 | 0.01 | 2.3 | 103 | 4** |
| Kallån | Övergödd | 2000-talet | 27 st | 7.0 | 0.33 | 12.6 | - | 58 |
| Billsjötjärn | Kalkbehov! | 23/02/1987 | 1 st | 5.5 | 0.01 | 3.2 | 46 | 9 |
| Billabäcken | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Forsåbäcken | Kalkbehov! | 13/02/1989 | 1 st | 5.4 | 0.02 | 2.7 | 55 | 8 |
| S. Anundsjöån (ovan Gensjösjön) | Återförsurad | 12/12/2006 | 1 st | 5.5 | 0 | 3.0 | 157 | 10*** |
| N. Anundsjöån (NedanFällforsen) | Återförsurad | nov2020/höst2021 | 2 st | 5.6/(6.0) | 0 | 2.1 | 229 | 20# |
| Utterån (Nedan Uttersjön) | Kalkad | 04/11/2020 | 1 st | 6.1 | 0.04 | 2.3 | 237 | 10## |
| Hädanbergsån (Nederst). | Kalkad | 18/05/2020 | 1 st | 6.7 | 0.18 | 3.1 | 147 | 6† |



Figur 8. Karta över nedre delen av Moälvens vattensystem. Röda siffror anger pH-värden (Tabell 5). Gröna siffror anger fosfor-värden (totalfosfor Tabell 5). De rödfärgade vattendragen N. Anundsjöån, S. Anundsjöån, Billabäcken och Forsåbäcken är försurade områden som behöver kalkas. De grönfärgade Kallån och fjärdarna (Vecke-, Själlevads- och Hapsta-) i Moälven är övergödda (fosfor >25) och behöver fosforrening. De blåfärgade vattnen visar god vattenkemi.

3.2.1 ÖVERGÖDNING

Övergödningen i Kallån, Veckefjärden och Moälvens översta del i Moälven har lett till att vattnen saknar försurningsproblem, är nästan neutrala med genomsnittliga pH på mellan 6,8 och 7. Vattnen räknas som övergödda när fosforhalten i genomsnitt överstiger 25 µg per liter.

3.2.1.1 Kallån

Den mest övergödda delen av fiskevårdsområdet är Kallån, där halten fosfor låg på en oacceptabelt hög halt på 58 µg totalfosfor per liter under ett decennium på 2000-talet. Detta är mer än dubbelt så högt som en acceptabel halt. Utsläpp i Kallån är inte godtagbart. Detta tillsammans med den amerikanska bäckrödingen har utrotat det tidigare goda havsöringbeståndet i Kallån. Mört dominerar Kallån och uppgick till 33% av eDNA vilket förklaras av den höga fosforhalten.

3.2.1.2 Veckefjärden

Veckefjärden är utsatt för stora kommunala utsläpp och låg på en genomsnittlig halt på 29 µg fosfor per liter under ett decennium på 2000-talet vilket är tydligt övergött. Effekten av övergödningen har lett till att Veckefjärden domineras av braxen. Eventuellt är sjön så pass övergödd att varken sik eller siklöja trivs här. Endast en liten förekomst av sik-eDNA registrerades vid slussen och nedströms i Moälven som i mängd motsvarade en dryg promille av fiskarternas sammanlagda eDNA. Det rör sig sannolikt om enstaka sik individer som vandrat upp från havet. I tidigare eDNA undersökningar som utfördes i augusti 2020 detekterades fler arter (men ej sik) i Veckefjärden eftersom dubbelprov användes.

3.2.1.3 Moälvens översta del i FVO

Moälvens översta del i FVO är relativt övergödd med en genomsnittlig halt på 32 µg per liter under ett decennium på 2000-talet. Det uppströms liggande biflödet Forsån bidrar väsentligt till övergödningen här. Glädjande visar laxbeståndet en uppgång till 2% av fiskbestånden i älven, som domineras av Benlöja 33% och Stensimpa 42%.

3.2.2 FÖRSURNING

Billsjötjärnen och Huggsjön (Forsåbäcken) visade sig under senare delen av 1980-talet vara mycket försurade och i behov av kalkning eftersom pH-värden låg mellan 5,4 och 5,5 under stabil period under vintern. Billsjötjärnen domineras av ruda som tål sura vatten och den relativa biomassan utgjorde 78% av fiskbestånden. Inga andra fiskbestånd än ruda, öring och amerikansk bäckröding har koloniserat sjön efter rotenonbehandling som utfördes 1961. I Huggsjön och Forsåbäcken har bestånden av mört och stensimpa (som är mycket känsliga för försurning) utrotats. Under vintern 1989 mättes ett pH på 5,4. Vi saknar några indikationer på att pH i Forsåbäcken och Billsjötjärnen har förbättrats tills idag eftersom dessa två sjöar aldrig har kalkats.

Södra och Norra Anundsjöån har under de senaste 15 åren legat på kritiska pH-värden som omöjliggör överlevnad av lax. I Norra Anundsjöån var pH 5,6 utan buffertförmåga i november 2020 och laxrommen behöver pH som överstiger 6,2. eDNA visar att den blygsamma förekomsten (enstaka fiskar) av lax på 0,1% av fiskbestånden i ån, inte haft tillräckliga förutsättningar att växa till.

I Utterån steg pH värdet med kalkning fram till november 2020 då det lägsta pH värdet mätte 6,1 och buffertkapaciteten mätte 0,04 i alkalinitet. Lax- och öring-bestånden uppgick nu tillsammans till 5% av fiskbeståndet enligt eDNA-analys. Nya mätningar från 2021 (Dan-Erik Lindberg, pers. kommunikation) indikerar att pH sjunkit igen och lägsta pH värdet mätte 5,98 vilket betyder att vattnet är 25% surare jämfört med året innan.

Den mindre Hädanbergsån hade pH 6,7 och buffertförmåga på 0,18 efter kalkning och laxbeståndet var 0,2% av fiskbestånden enligt eDNA-provet.

Tabell 6 sammanfattar vilka arter som påverkas av miljöproblemen i de 14 undersökta lokalerna av vilka flera är drabbade av övergödning eller försurning.

Tabell 6. Fiskarnas förekomst i förhållande till försurning och övergödning i Nedre Moälvens vattensystem. Övergödda lokaler anges i grönt, försurade i rött och lokaler med bättre status i svart.

| Lokal | Status | # arter | Miljöproblemens påverkan på arterna |
|-------------------------------------|--------------|---------|--|
| Moälven (saltvatten men ovan havet) | | 15 | Artrik |
| Veckefjärden (slussen) | Övergödd | 13 | Fler arter förekommer, (dubbelprov bör tas) |
| Själlevadsfjärden (utlopp) | | 12 | Sik utrotad |
| Billstasundet nedan Happstafjärden | | 15 | Sik utrotad |
| Moälven (översta delen i Fvo) | Övergödd | 16 | Artrikast. Sik utrotad |
| Svartbäcken | Återförsurad | 1 | Endast öring kvar |
| Kallån | Övergödd | 10 | Öring utrotad av övergödning & främmande bäckröding |
| Billsjöjärn | Kalkbehov! | 3 | Massförekomst av ruda, samt öring och invasiv bäckröding. Andra arter återvänder ej. |
| Billabäcken | | 8 | |
| Forsåbäcken | Kalkbehov | 5 | Mört och stensimpa utrotade av försurning |
| S. Anundsjöån (ovan Gensjösjön) | Återförsurad | 15 | Laxreproduktion omöjlig p g av försurning |
| N. Anundsjöån (NedanFällforsen) | Återförsurad | 14 | Laxreproduktion omöjlig p g av försurning |
| Utterån (Nedan Uttersjön) | Kalkad | 14 | |
| Hädanbergsån (Nederst). | Kalkad | 11 | |

3.3 ÅTGÄRDER OCH FÖRSLAG

I denna undersökning rapporterades förekomst av fisk (eDNA) och befintligt vattenkemidata.

Totalfosfor-värdena får aldrig överstiga 25 µg /L för att undvika av övergödning. Moälvens nedre del med fjärdarna är nu kraftigt övergödda och behöver åtgärdas med fosfor-rening. Fiskbestånden övergår alltmer till att bestå av vitfisk (karpfisk).

Kalkning är en beprövad metod för att motverka försurning i sjöar och vattendrag. Stora kalkningsåtgärder på 1980-talet i området vidtogs som åtgärd för att höja pH på flera lokaler i Moälvens vattensystem. Kalkningsåtgärderna i kombination med att Öststaternas industriutsläpp minskade och medförde att pH normaliserades i de åtgärdade vattendragen. En del av de åtgärdade vattnen återförsurades eftersom kontinuitet i kalkningsåtgärder avbröts. Därför är det av stor vikt att övervaka åtgärdade lokaler för att bibehålla goda förhållanden.

Den historiska satsningen på restaurering av lax och havsöring har varit på god väg att lyckas i Moälvens vattensystem, men kalkningsåtgärder behövs för att satsningen ska lyckas i Södra och Norra Anundsjöån. Vattnet får inte understiga pH 6,2 för att erhålla en god reproduktion av lax.

Ett sätt att garantera pH-nivån i vattendragen är att kalka upp och överdosera tidigare nedlagda kalksjöar (Gafselesjön, Stor-Åskasjön, Tällvattnet, Holmsjön, Stor-Tågsjön, Sågbäckens sjöar m. fl.) i Moälvens vattensystem.

Ett annat förslag är att bygga nya kalkdoserare, men nackdelen med dessa är att de har ett stort tillsynsbehov. Kalkdoserare är ett stort åtagande. Fisk och bottenlevande djur anpassas med tiden till det högre pH-värdet, fler arter återvänder men dessa försvinner om pH värdet sjunker, även för en kortare tid. De försurningståliga djurarterna försvinner på sikt när man kalkar, så resultatet av en otillräcklig skötsel blir sämre än om ingen kalkdoserare alls byggdes. En gott tilltagen sjökalkning har inte detta problem. Sjöarna doserar utan avbrott när dosen väl lagts ut i sjön. En doserare som inte följs upp under surstötter förstör därför vattnet.

I sjöar i södra Sverige har man börjat bekämpa övergödning med *aluminiumfällning* i stället för kalkning. Aluminium sänker fosforhalterna men sänker även pH värdet. Metoden har även införts i Västerbottens län och förslag finns att minska på kalkningsinsatserna och i stället satsa på aluminiumfällning. Metoden är en aning billigare än kalkning men aluminium är skadligt för djurlivet i vattnet. Aluminiumbeläggning på fiskars gälar gör att de utsöndrar mera slem och får en sämre syreupptagningsförmåga. Problemet vid aluminiumfällning är att jonerna tillförs vattendragen och skadar fisk och bottenlevande djur.

I södra Sverige anses fällningen ha gett goda kemiska resultat. Gedigen uppföljning och forskning på hur fiskar och bottenlevande djur påverkas visar dock att växt- och djurlivet i vattnen tar skada av aluminium. Den beprövade kalkningen är att föredra för att skydda livet i Moälven.

3.4 FISKARTER I MILJÖN

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 i alla utom rotenonbehandlade provpunkter samt den försurade Svartbäcken. I Själevadsfjärden var abborrens relativa biomassa 37% av eDNA läsningarna vilket räknas som ett stort bestånd.

Benlöja (*Alburnus alburnus*) uppträder i stora stim tätt under ytan i varma och näringsrika vatten. Den är kanske vanligaste fisken man ser i lugnflytande, breda åar som Moälven och i samtliga fjärdar där den rör sig vid ytan för att söka föda. I Moälven ovan Hoppstafjärden står den för nästan en tredjedel av hela fiskbeståndet. 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. I Moälvens vattensystem har utrotningarna skett i de högst belägna sjöarna i Utterån, Södra och Norra Anundsjöån. Endast eDNA-värden närmare 0 förekom i dessa åar och rör sig om enstaka fiskar vilka troligtvis kommer från deras 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 säsongsrelaterad 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 i fjärdarna och

Moälven där fosforhalterna är höga. Stora mängder av braxen i ett ekosystem tyder på övergödning.

Elritsa (*Phoxinus phoxinus*) är en liten strömlevande karpfisk som kräver syrerika vatten. Fynd av elritsa genom eDNA gjordes i knappt hälften av de 14 undersökta lokalerna. All förekomst var i de större vattendragen Moälven, Anundsjöåarna och Utterån/Hädanbergsån, men inte i sjöarna.

Gädda (*Esox lucius*) har etablerats naturligt vid samtliga provlokaler och förekom på 12/14 lokaler och utgjorde >1% av totala fiskbeståndet. Gädda detekterades inte i Billsjötjärnen som tidigare rotenonbehandlats eller i den försurade Svartbäcken. I Forsåbäcken finns inte lämpliga miljöer för gäddan att fortplanta sig och de gäddor som påträffas är enstaka individer som ibland vandrar ner från Höksjön. Gädda är det största rovdjuret i svenska vatten och utgör tillsammans med barriärer (vattenkraftsdammar och vägar) den huvudsakliga begränsande faktorn för laxartad fisk, t.ex. öring (*Salmo trutta*) 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 övergödningssproblem och bidrar till friskare fjärdar i Moälven. Den relativa mängden gädd-eDNA i fjärdarna var god, mellan 2-11% 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. Gärs förekommer till 1-12% av totalbeståndet i fjärdarna, och endast små ströförekomster finns i sjöar och sel i vattendragen.

Gös (*Sander lucioperca*) Gösen lever i långsamt rinnande vattendrag som Moälven och relativt varma syrerika sjöar och fjärdar med högt pH och grumligt vatten. Gösen är en rovfisk som är en huvudkonkurrent till gädda och abborre. Gösen ser bra, i mörker är den mest aktiv nattetid under sommaren och skymningsaktiv under andra årstider. En stor hona kan producera över en miljon ägg som hon fäster på bottenväxter. Hanen vaktar äggen och ser till att inga inkräktare kommer för nära. Gös registrerades i stora mängder (6 - 16% eDNA) i alla fjärdar (med störst dominans i Själevadsfjärden) och i Moälven.

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 tycks avge mindre eDNA än andra fiskar, så fler prover än normalt kan behövas för att erhålla en rättvis bild av harrförekomsten. Eventuellt så är inte primern riktigt anpassad för denna typ av svensk harr.

Id (*Leuciscus idus*) Som flera andra arter som vandrar upp i vattendrag för att leka har idbestånden 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. Id förekommer i mindre mängd i hela systemet, speciellt i fjärdarna.

Lake (*Lota lota*) vandrar under vintern upp i åarna för att reproducera sig. Kallvattenarten lake är uppsatt på den svenska rödlistan som nära hotad (NT), p g av sannolik minskning i antalet populationer och utbredningsområde i Sverige. Lake förekommer i hela Moälvs-systemet förutom starkt försurade vatten som Svartbäcken, Forsåbäcken och Billsjötjärnen.

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 utvecklat till smolt (1–5 års ålder) i Moälven eller i någon av de stora biflödena Utterån eller Anundsjöåarna 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 köns mogen 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 laxarna i Moälven (Utterån) vägde 20 kg. Minimimåttet vid laxfiske i Sverige är 60 cm. År 2020 vandrade c:a 200 laxar upp genom trappan i Utterån för att leka. År 2021 gick 144 laxar och 87 havsöringar upp i trappan (Ronnie Byström, personlig kommunikation). Den högsta mängden lax-eDNA hittades i Utterån följt av Moälven ovan Hoppstafjärden och något lägre förekomst i Billstasundet.

Återintroduktionen av lax till Utterån är lyckad och totalfrekvensen ligger på samma nivå som Utteråns gädda och abborre, på cirka 2% av hela fiskbeståndet.

Mört (*Rutilus rutilus*) är en försurningskänslig art som förekommer i betydande mängder (antal DNA-träffar) vid 11/14 undersökningslokaler. Mörten är mycket känslig för sura miljöer och trivs inte i lågt pH. Riklig förekomst tyder på att lokalerna inte är försurningsdrabbade. I Forsåbäckssystemet har mörten troligen utrotats p g av försurning. Den stora dominansen av mört i Kallån beror sannolikt på övergödningen, dvs höga fosforhalter. Hög fosforhalt (58 µg/L, tillsammans med bäckröding) har sannolikt lett till havsöringens utrotning i Kallå-systemet.

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 är mest sannolikt det icke-parasitiska bäcknejonögat, som är vida utbredd och den vanligaste formen, ända högt upp i Moälvens vattensystem. Även flodnejonöga förekommer i nedre Moälven och vandrar förbi t ex upp i Forsån men även till S. Anundsjöån. Alla former 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 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 gös, lax och andra fiskarter. Stora havslevande stim av nors vandrar upp i Moälvens fjärdar för att leka under maj månad. Beräkningar från en filmkamera visade att 10-tals ton nors vandrade upp

förbi slussen under maj månad, och eDNA visar att nors nu förekommer i både Veckefjärden, Själevadsfjärden upp till Moälvens inlopp i Hoppstafjärden.

Ruda (*Carassius carassius*) är den mest seglivade av alla Sveriges fiskar. Rudan har en enastående överlevnadsförmåga och kan övervintra i bottenfrusna gölar genom att den tillbringar vintermånaderna i dvala i bottengyttjan helt utan syre. Den förekommer ofta i övergödda tjärnar där få andra fiskar överlever. Rudan har en unik förmåga att överleva i syrefattigt vatten eftersom den omvandlar kroppens slaggprodukter till alkohol i stället för mjölksyra. Rudan är nästan omöjlig att utrota med rotenon och har krävt 10 gånger högre doser av kemikalien jämfört med andra fiskar. Rudan överlevde i den rotenonbehandlade Billsjötjärnen och förekommer där som överlägset dominerande fiskart. Rudan är inte lika lätt att fiska med spö som t.ex. bäckröding, vilket gör att sportfiskarna i Billsjötjärnen inte märker att arten är dominerande där.

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 lekropor utan rommen släpps till den fria vattenmassan där den efter befruktning sjunker mot botten. Rommens överlevnad är högst på grus- och sandbottnar. Leken sker under hösten men i undantagsfall även långt in på vintern. Siken är en laxfisk vars uppväxande bestånd tål gäddpredation. Alla andra sjölevande laxfiskbestånd utrotas helt av gädda i Örnsköldsviks kommun. Siken kräver kallt och förhållandevis syrerikt vatten och tål därför inte övergödning. Carl Byström skrev år 1872: "har minskat, kan endast vandra upp till bruket 0,5 mil uppströms, fångas mest med not om hösten". Siken är numera utrotad i fjärdarna och Moälven, sannolikt p g av övergödning (utsläpp från Reningsverk i Örnsköldsvik). Vi föreslår att fiskevårdsområdet på sikt planerar för en återintroduktion av sik m h av utsättningar från s.k. sikglas som kan startas upp i Domsjö pumpstation. Om fosfornivån minskar i Moälven bör möjligheten att återigen hålla sik i systemet vara stor.

Siklöja (*Coregonus albula*) Den stimlevande 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 "løjrommen". Siklöjans huvudsakliga föda består av kräftdjurplankton. Frågan är om även siklöjan har utrotats i nedre Moälven p g av övergödningen. I denna eDNA-provtagning erhöll vi inte siklöja, men de har tidigare registrerats både på nätprovfiske och med eDNA i Anundsjön (Bredbyn).

Storspigg (*Gasterosteus aculeatus*) och **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 endast i Moälven strax ovan havet och i Södra Anundsjöån.

Stensimpa (*Cottus gobio*) kräver syrerika hårbottenar och klart vatten för att trivas. I rinnande vattendrag i Moälven är stensimpa den dominerande fiskarten, där den ofta representerar mer än hälften av allt eDNA. Arten är en god indikator för vattenkvalitet. Den goda förekomsten av stensimpa i Moälven är ett gott tecken på nuvarande vattenkvalitet t.ex. försurningsläget. Stensimpan är nattaktiv och svårfiskad eftersom den lever gömd under stenar och grus. Stensimpa påträffades ej i två lokaler där de bedömdes kunna finnas, Svartbäcken och Forsåbäcken. eDNA-metoden detekterade arten på alla andra lokaler bortsett från Veckefjärden och det rotenonbehandlade Billstasystemet. 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 grusbottenar (lekbottenar) och hög syrgashalt. I sjöar förekommer de oftast i närheten av till- eller utlopp. eDNA-prover visade en förekomst av stäm/id i alla lokaler utom rotenonbehandlade Billsjötjärnen, försurade Svartbäcken, Forsåbäcken och Hädanbergsån. Denna eDNA-analys skiljer ej på id och stäm vilket ger en osäker bild av förekomsten.

Ål (*Anguilla anguilla*) Ålens status i Sverige är klassad som akut hotad (CR) (Artdatabanken 2015). Ålfiske är tillåtet i utbyggda vattensystem där arten anses ha minimal möjlighet att vandra. I havet utanför Moälven har stora utsättningar av glasål bedrivits och ålen antas vandra från havet upp till Moälven. Denna provtagning visade inte någon förekomst av ål vilket tyder på att tidigare förekomst av små mängder Ål-DNA i Veckefjärden år 2020 endast utgjorde enstaka ålar eller så har de försvunnit från Moälvens vattensystem.

Öring (*Salmo trutta*) förekommer i Moälvsystemet som både havsöring, insjööring och bäcköring, vilket är olika former av samma art. Varje vattens bestånd av öring har unika egenskaper och anpassningar, liksom laxen. Sjölevande öring vandrar normalt uppströms, men ibland även nedströms (t.ex. Billsjötjärnen), till lek- och uppväxtområden efter någon eller några säsongers tillväxt i sjön. 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 grusbottenar i rent strömmande vatten.

I Moälven påträffas havsöring i både Svartbäcken, Forsåbäcken och Hoppstafjärden, men har tyvärr utrotats p g av övergödning och amerikansk bäckröding i Kallån. Enligt lokala fiskare (Carl-Uno Hellström, muntlig kommunikation) fångades stora havsöringar i Kallån innan arten utrotades. De sista havsöringarna i Kallån detekterades med elfiske på 1980-talet (J Spens, personlig observation). Nedströmslekande insjööring förekommer i Billsjötjärnen och bäcköring/havsöring förekommer i huvudfåror i Norra och Södra Anundsjöåarna, Utterån och Hädanbergsån.

Bevarande och förbättring av öringens levnadsvillkor i Moälvens vattensystem är av stor betydelse av flera orsaker. Öringen har stor betydelse för sportfisket. Moälvsöringen är genetiskt unik (utsatt Idbyåöring, Öreälvsöring och lokala former av dessa) är väl värda att

bevara. Vidare är öringen av stor betydelse för den rödlistade flodpärlmusslans livscykel. Utan öringen (eller lax) dör musslan ut.

4 SLUTSATSER

Arters närvaro i ett system ger en bild av hur fysiska och kemiska faktorer påverkar vattendragen eftersom arter försvinner då vattnen är övergödda, försurade eller innehåller fysiska hinder så som vattenkraftsdammar så att fiskar inte kan ta sig vidare i systemet. För att få en helhetsbild av vilka arter som är närvarande i ett system är eDNA ett lämpligt verktyg. I denna undersökning togs ett prov på de flesta lokaler, två prover ökar artdetektionen ytterligare.

Resultaten i denna rapport visar att eDNA metabarkoding som artinventeringsmetod har stora fördelar för inventering av artantal vid en viss tidpunkt eftersom ett stort antal arter upptäcks på en gång. I denna rapport kunde även arternas förekomst verifieras. Fördelen med eDNA är att provtagning kan ske i svårtillgängliga områden, och eftersom provtagningen är betydligt snabbare än inventeringar på traditionellt sätt kan undersökningar ske över stor geografisk skala för att generera "big data" vilket inte tidigare har varit möjligt för studier av biologisk mångfald. Vid jämförelser av eDNA och provfisken har eDNA historiskt sett detekterat betydligt flera arter per ansträngning än el eller nätfisken. eDNA är ett användbart verktyg i miljöövervakningen och är till nytta för att inventera arter före och efter åtgärder, som t.ex. utrivning av kraftverksdammar eller/och vid analyser gällande sjukdomsalstrare (svampar, virus och bakterier) eller invasiva arter som kan finnas nedanför men inte ovanför en barriär. eDNA används redan som inventeringsmetod både i Sverige och i resten av Europa för förekomst av större vattensalamander innan större infrastrukturprojekt påbörjas.

Däremot detekterar eDNA nu inte enskilda individer, ålder eller kön, även om detta teoretiskt är möjligt med DNA. Analyser och artbestämning av eDNA-prover är beroende av referensdatabaser. Trots att de flesta arterna i Sverige är sekvenserade så finns det ännu luckor. Vidare är det viktigt att referenserna är verifierade, eftersom felaktiga sekvenser kan finnas i databaserna. En nationell satsning på sekvensering av mitokondriska genomet i samarbete med naturhistoriska museer, taxonomer och genetiker kunde lösa detta problem.

Kombinerade inventeringsmetoder med eDNA (förekomst av flera arter) med 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.

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.

För att avgöra status i ett vattendrag baseras klassificeringen på både biologiska och kemiska faktorer. I denna undersökning rapporterades förekomst av fisk (eDNA) på två lokaler flodkräfta (eDNA) och befintligt vattenkemidata.

Det mest effektiva sättet att följa upp Moälvens ekologiska status är att följa upp fiskbestånden med eDNA-undersökningar. Denna eDNA-undersökning visar att Moälvens vatten i dessa delar har 22 sötvattenlevande fiskarter (vi räknade här id och stäm som två arter men flodnejonöga och bäcknejonöga som en art).

5 TACK

Ett stort tack till medlemmarna i Nedre Moälvens FVO och Föreningen Moälvsfisket för stort engagemang och deltagande i diskussionskvällen, tack för att ni delade med er av era gedigna kunskaper om fisket och era erfarenheter i området. Tack Ronnie Byström för information om lax och havsöring-vandring i Utterån från 2021. Tack till Dan-Erik Lindberg på Örnsköldsviks kommun för bakgrundsdata och diskussioner om vattenkemi och för stort engagemang. Tack till Liselott Rasmussen för fältförberedelser och fältarbete och Hannah Phillips och Izabell Fontaeus för hjälp vid insamling av fältprover.

6 REFERENSER

- Beamish, R. J. 1980. Adult biology of the river lamprey (*Lampetra ayresi*) and the Pacific lamprey (*Lampetra tridentate*) from the Pacific coast of Canada. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 37(11), 1906–1923.
- Bruce, K. Bourlat, S. Blackmann, R., Hellström, M., m.fl. & Deiner, K. 2021. A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment". PenSoft Publishers Bulgaria 2021. ISBN 978-619-248-052-3 (paperback), ISBN 978-619-248-053-0 (e-book) DOI: 10.3897/ab.e68634 i press.
- Brys, R., Haegeman, A., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Staelens, A., Auwerx, J., & Ruttink, T. (2021). Monitoring of spatiotemporal occupancy patterns of fish and amphibian species in a lentic aquatic system using environmental DNA. Molecular ecology, 30(13), 3097-3110.
- Cederborg, D., Stenqvist, M. Bjerrehorn, F. Danke Wiberg, J., Stenqvist K. & R. Hallberg. 2020. Pilotprojekt för genomförande av nationalplan för omprövning av vattenkraft, Alsterån och Badeboån. WSP Rapport för Vattenkraftens Miljöfond Sverige AB. 2020-07-03. Sid 22
- Deiner, K., H. M. Bik, E. Mächler, M. Seymour, A. Lacoursière-Roussel, F. Altermatt, S. Creer, I. Bista, D. M. Lodge, N. de Vere, M. E. Pfrender, & L. Bernatchez. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. Molecular Ecology 26:5872-5895.
- 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.
- Di Muri C, Lawson Handley L, Bean CW, Li J, Peirson G, Sellers GS, Walsh K, Watson HV, Winfield IJ, Hänfling B (2020) Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. Metabarcoding and Metagenomics 4: e56959.
- Harper, L. R., Buxton, A. S., Rees, H. C., Bruce, K., Brys, R., Halfmaerten, D., ... & Priestley, V. 2018. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. Hydrobiologia, 1-17.
- HVMFS 2019. Havs- och vattenmyndighetens författningssamling 2019:24
- 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.
- 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 fishponds inferred by metabarcoding. Environmental DNA 1 (3): 238–250.

- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ... & Kondoh, M. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088.
- Naturvårdsverket, 2007. Bedömningsgrunder för sjöar och vattendrag. Bilaga A till Handbok 2007:4. Naturvårdsverket.
- 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
- 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.
- SERS. 2021. Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Institutionen för akvatiska resurser. <http://www.slu.se/elfiskeregistret>
- Spens, J., A. R. Evans, ... M. Hellström. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793

BILAGA 1. VAD MENAS MED ENARTS- OCH FLERARTSANALYSER?

Kräfter - 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

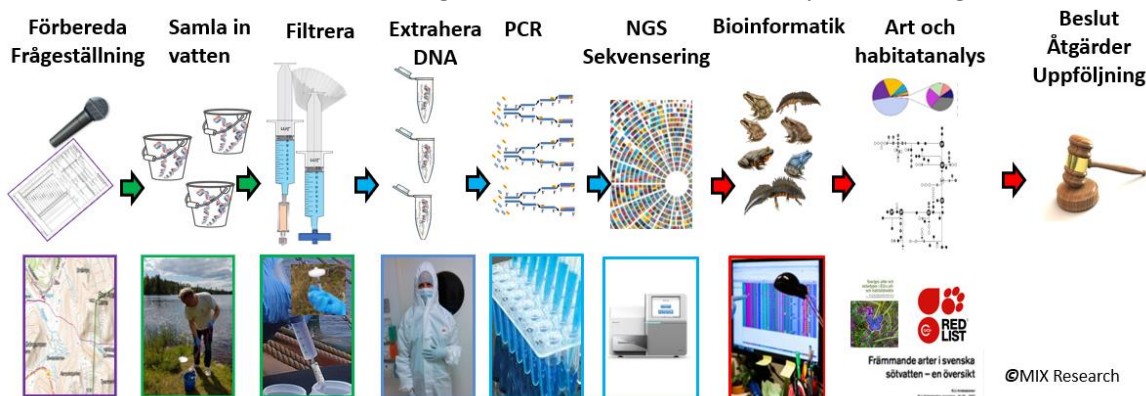
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundansen mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Analystiden för enartsanalyser är kortare än analystiden för flerartsanalyser.

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





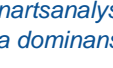
Frågeställningen för flerartsstudier är: Vilka arter finns här och hur hög är deras förekomst? Med andra ord behöver man inte på förhand veta vad man letar efter.

Invasiva och skygga arter kan identifieras och antalet arter som detekteras i en analys är obegränsat. Om man inventerar tre eller fler arter är denna metod att föredra och blir snabbt mer kostnadseffektiv än enartsanalyser. Analystiden för flerartsanalyser är längre än analystiden för enartsanalyser men mängden av data och information är så pass stor att inventeringarna kan producera "stort data" som inte har varit möjligt före eDNA- metastreckkodning (Figur B1-1)

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



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

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

Figur B1-2. Typ av data som fås genom enartsanalyser och flerartsanalyser. Enartsanalysen anger närvaro/frånvaro av en art. Flerartsanalyser ger en artlista samt arternas relativa dominans i förhållande till varandra inom ett prov.

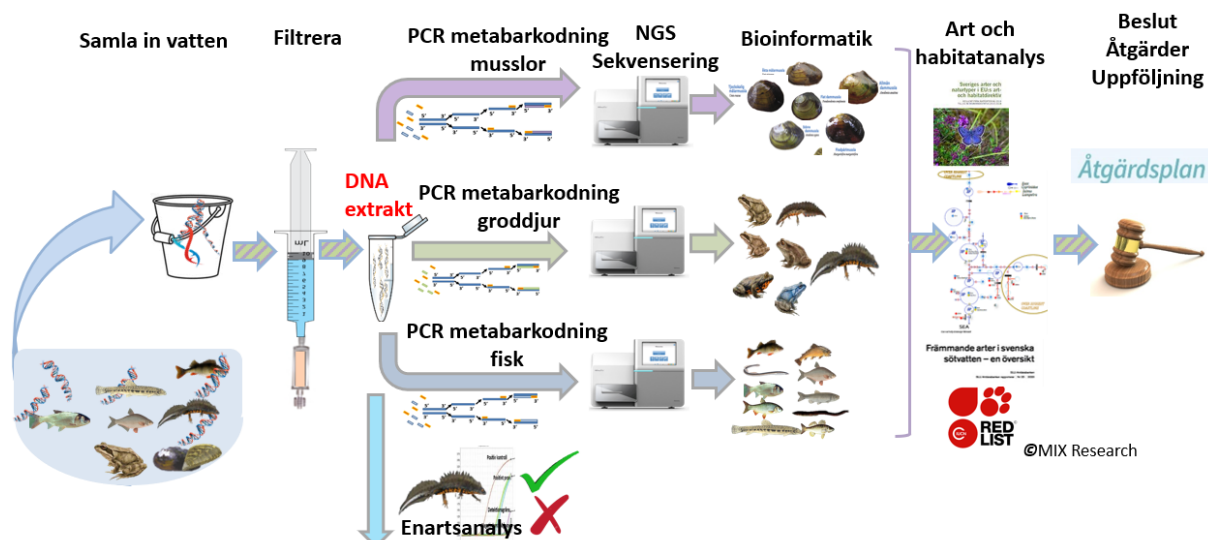
BILAGA 2. LABORATORIEARBETE FLERARTSANALYSER

B.2.1 EXTRAKTION

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

B.2.2. PCR

För alla analyser gäller att; Varje PCR-prov utförs i 12 replikat som sammanslås under bioinformatiken. Som positiv laboratoriekontroll används ett prov med känd artsammansättning av tropiska fiskar som standard för jämförelse. Negativa kontroller 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 kräft- och fiskproverna inte kan sekvenseras samtidigt eftersom PCR produkterna varierar i längd mellan markörer. Sekvenseringsprotokoll och bioinformatik anges i Kačergytė m. fl. 2021.



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

B.2.2.1 Fisk

Flerartsanalyserna för fisk genomfördes med en markör som läser en hypervariabel 325 bp region på 12S rRNA genen och protokoll enligt Miya, m.fl. (2015). Ett undantag i protokollet var att det andra basparet på framåt primern byttes ut för att matcha europeiska fiskar och vidare anpassades 5' delen av primern med ett överhäng för att matcha Illumina Nextera Index markörer (För full beskrivning se Kačergytė m. fl. 2021, överhäng förklaras på NGI websidan (National Genomics Infrastructure, Illumina 16S)). Strålfeniga fiskar, Actinopterygii, skiljer sig genetiskt från nejonöga som hör till Hyperoartia (Kraniedjur). För att detektera artkomplexet innebär degenererade primers ett problem och alternativet är att följa principerna för modifierade primers enligt Miya m.fl. (2020).

B.2.2.2 Kräftdjur

KRÄFTDJUR

Kräftdjursmarkören MiDeca amplifierar kräftdjur i hypervariabel region på den mitokondriska 16S genen med en PCR produkt på 140 till 180 bp. Metoder beskrivs i Komai m.fl. (2019).

B.2.3. BIOINFORMATIK OCH VERIFIERING

Varje enskild art har en unik streckkod eller DNA-sekvens. De unika sekvenserna jämfördes med en internationell databas (tillgänglig för allmänheten, som grundar sig på GenBank och upprätthålls av *National Center for Biotechnology Information*, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)) där sekvenser på närmare 450 000 kända arter finns tillgängliga med 1 miljard sekvenser och 6,25 triljoner baspar enligt GenBank och NCBI:s hemsida (Sayers, m. fl. 2020). De olika sekvenserna matchas mot databasen och får på så sätt arternas identitet. Vidare används en verifierad (vilket betyder att arterna som används för referens-DNA är verifierade av en auktoriserad taxonom) intern databas från NatureMetrics Ltd. Tack vare nya framsteg inom metastreckkodning för vertebrater och evertebrater är det möjligt att få träffar på artnivå - i stället för enbart familje- eller genusnivå. Antalet läsningar per art ger en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov. Bioinformatiken för samtliga taxa finns även beskrivet i Kačergytė m. fl. 2021 där flödesschemat är anpassat för markörerna.

Referenser

- 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>
- Komai T, Gotoh RO, Sado T, Miya M (2019). Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. *Metabarcoding and Metagenomics* 3: e33835.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ... & Kondoh, M. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088.
- Miya, M., Gotoh, R.O. & Sado, T. (2020). MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fish Sci* 86, 939–970.
- (2021) NCBI websida <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Riaz T, Shehzad W, Viari A, Pompanon F, Taberlet P, et al. (2011). ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 39: e145.
- Sayers, E.W., ..., Karsch-Mizrachi, I. (2020). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 48: D84-D86.
- Spens, J., A. R. Evans, ... M. Hellström. (2017). Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645.
- (2021) National Genomics Infrastructure, Illumina 16S. <https://ngisweden.scilifelab.se/methods/illumina-16s-sequencing/>



BILAGA 3. KVALITETSSÄKRING AV DNA - KONTROLLER

Positiva och negativa kontrollprov

För tillförlitliga resultat vid eDNA-provtagning är positiva och negativa kontroller nödvändiga för att utesluta kontamineringar (nedsmutsning från DNA som inte här till provet) 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 eller kolsyrat mineralvatten som ingår i fältmaterialet vid inventerade lokaler med samma provtagningsmetodik som vattenproverna. Detta prov kallas för negativ filterkontroll. 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 till DNA som finns i provet inte kan hittas så att konsekvenserna av kontamineringen kan 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

- Bruce, K. Bourlat, S. Blackmann, R., Hellström, M., m.fl. & Deiner, K. 2021. A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment". PenSoft Publishers Bulgaria 2021. ISBN 978-619-248-052-3 (paperback), ISBN 978-619-248-053-0 (e-book) DOI: 10.3897/ab.e68634 i press.
- Goldberg, Caren S., m. fl. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7.11: 1299-1307.
- Griffiths Anthony et al. 2016. *An Introduction to Genetic Analysis*. 11th edition. WH Freeman. New York. ISBN-13: 978-1464109485.
- Hedman, Johannes m. fl. 2017. Pre-PCR processing-projektet, P4 Stärkt beredskapskapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad provberedning. -Nationellt Forensiskt Centrum, NFC 2017-05-07. NFC Rapport Avdelningskansliet 2017:04.
- SFMG, Svensk Förening för Medicinsk Genetik. 2011. Riktlinjer för kvalitetssäkring i klinisk genetisk verksamhet. http://sfmg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf



BILAGA 4: KVALITETSKONTROLLER SOM REDOVISAS

1. Mängden insamlat/filtrerat vatten dokumenteras för att kunna avgöra hur mycket prov som samlats in totalt. Alla eDNA-mätningar ställs i relation till hur mycket vatten som filtrerats.
2. Total eDNA-koncentration för samtliga prov (inkl. negativa) anges. Koncentrationen varierar avsevärt naturligt men ger ändå en första indikation om hur eDNA-extraktionen lyckats.
3. Inhibitionskontroll dokumenteras och redovisas. Inhibition betyder risk för att arter som finns i proverna inte detekteras därför att DNA inhiberas av humus etc. Detta går att åtgärda så länge inhibitionstest utförs. Resultatet av antiinhibering före och efter utförandet redovisas så att resultatens tillförlitlighet kan bedömas.
4. Band på gel efter målinriktad PCR dokumenteras (närvaro/frånvaro) inklusive negativa kontroller. Detta visar att PCR har fungerat och kontroll av vilka prover som har spår av målarter, eller riskerar att vara kontaminerade, kan utföras.
5. Negativa kontroller indelade i a) fält-negativa (filter-negativa) b) extraktions-negativa samt c) PCR-negativa utförs och utfallet redovisas. Detta möjliggör en kontroll av vilka prover som riskerar att vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.
6. Positiva kontroller (används inte alltid): a) Fält-positiva där ett område känt för artförekomst provtas för kontroll att arten detekteras i fält. b) PCR-positiva för enartsanalyser (gäller qPCR och ddPCR) där DNA från målarten testas. c) Positiv flerartskontroll, där prov från ett artificiellt sammansatt samhälle ("mock community") används som positiv kontroll vid PCR och sekvensering. Falska positiva prover redovisas. De positiva proverna försäkrar att PCR och bioinformatiken fungerar som avsett.
7. För enartsanalyser anges närvaro och frånvaro av arten, för flerartsanalyser anges andel (%) av målarterna i ett givet prov. Detta ger en bild av hur väl sekvenseringen av målarterna lyckats.
8. Andel sekvenser (%) av människa, ko och gris (vildsvin) och bakterier som förekommer som bakgrundssekvenser redovisas. Detta möjliggör en kontroll av att tillräckligt många läsningar täcker målarterna.
9. Minst 10 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 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. Kontaminations-DNA tillhörande människa och ko som är vanliga i reagenser och omgivande vatten togs automatiskt bort från analysen.

MiSeq parvis sekvensering för Miya 12S som huvudsakligen detekterar fisk på ett 175 bp segment på genen fungerade som de skulle. De negativa kontrollerna visade inte målarter förutom några läsningar på stensimpa som var så få att de togs bort från analyserna. Detta gav **1.1 miljoner** läsningar som **avläste 192 miljoner baspar**. Varje prov visade i medeltal 63 390 läsningar.

MiSeq parvis sekvensering för Cray_16S som huvudsakligen detekterar storkräftar på en ca 270 bp region gav utslag på en av två lokaler. Ett av fyra prover gav signal på flodkräfta med 480 läsningar. De negativa kontrollerna visade inga läsningar.

Sekvenseringsdata analyserades genom en pipeline som anpassas till markörerna och beskrivs i Bilaga B2. Datat testades huvudsakligen mot NCBI databaser samt kurerade och sekvenserade referenser.

Tabell B5-1. Kvalitetsgranskning av eDNA och kontroller. Provnamn (se tabell 1 i huvudtexten) eDNA-koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific) angivet i (ng/μl V= volym vatten filtrerat, Inhiberingskontroll utfördes med qPCR och alla prover genomgick antiinhiberings Powerclean. PC= Powerclean. PCR-negativ innefattar 12 replikat.

| Provnamn | Lokal | eDNA (ng/ μl) | V | #PCR Miya | Fisk detektion | #PCR Cray | Fl kräft detektion |
|----------|---------------------------------------|------------------|------|-----------|-------------------|-----------|-----------------------|
| MO_05_A | Moälven (ovan havet) | 20.6 | 2100 | 12-Dec | JA | | |
| MO_01_A | Veckefjärden (slussen) | 22.2 | 2500 | 11-Dec | JA | | |
| MO_02_A | Själevadsfjärden (utlopp) | 27.8 | 2300 | 12-Dec | JA | | |
| MO_03_A | Billstasundet | 21.2 | 2000 | 12-Dec | JA | 0 | NEJ |
| MO_03_B | Billstasundet | 13.7 | 1600 | 12-Dec | JA | 0 | NEJ |
| MO_04_A | Moälven (nordligaste i Fvo) | 46.4 | 2100 | 11-Dec | JA | | |
| MO_06_A | Billsjötjärn | 57 | 3000 | 12-Dec | JA | | |
| MO_06_B | Billsjötjärn | 58.2 | 3000 | 12-Dec | JA | | |
| MO_07_A | Billabäcken | 33.4 | 1200 | 12-Dec | JA | | |
| MO_08_A | Kallån (inkl. Skrikesjön och Åtesjön) | 38.6 | 1500 | 12-Dec | JA | | |
| MO_09_A | Forsåbäcken (inkl. Huggsjön) | 19 | 1180 | 12-Dec | JA | | |
| MO_10_A | Svartbäcken | 22.4 | 1200 | 12-Dec | JA | | |
| MO_11_A | S. Anundsjöån (ovan Gensjösjön) | 43 | 1800 | 11-Dec | JA | 0 | NEJ |
| MO_11_B | S. Anundsjöån (ovan Gensjösjön) | 44 | 1700 | 12-Dec | JA | 407 | JA |
| MO_12_A | N. Anundsjöån (NedanFällforsen) | 12.4 | 1900 | 12-Dec | JA | | |
| MO_13_A | Utterån (Nedan Uttersjön) | 23 | 1700 | 12-Dec | JA | | |
| MO_14_A | Hädanbergsån (Nederst) | 14.8 | 2200 | 12-Dec | JA | | |
| MO_FNEG | | 0.121 | NA | 11-Dec | JA | | |
| LabNeg | | 0.0798 | NA | 01-Dec | JA | | |



BILAGA 6: FÖRDELNING AV ARTLÄSNINGAR INOM LOKALERNA

Tabell B_6.1. Fiskmarkör. Resultat av antal läsningar per art och lokal. Siffrorna anger hur många gånger en sekvens blivit läst på artnivå och anger relativ biomassa. Flera läsningar anger högre biomassa. Totala antalet läsningar per prov anges. Färgerna på texten och i första kolumnen anger vilka familjer fiskarna hör till (svart=strömmingsfiskar, mörkgrått = spiggar, röd = laxfiskar, brandgul =nors, mörkgrön = gädda, ljusgrön = abborrfiskar, brun = torskfiskar, blå =karpfiskar, violett= simpor, gul= nejonöga. Notera att två prover tagits på lokalerna Billistasundet, Svartbäcken och S. Anundsjön. Resultaten för dessa anger både delproverna (liten text) och sammanslagning av de två proverna (fet text)

| | Moaten Hav | Veckefjärden | Själveadsfjärden | Billistasundet | Billistasundet A | Billistasundet B | Moaten Ö | Svartbäcken | Kallien | Blisfjärden | Blisfjärden A | Blisfjärden B | Blisfjärden | Forstbäcken | S. Anundsån | S. Anundsån A | S. Anundsån B | N. Anundsån | Utträen | Häckenbergsån |
|---------------------------|---------------|---------------|------------------|----------------|------------------|------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Strömming | 197 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Storspigg | 54 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Småspigg | 201 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lax | | | | 912 | 257 | 655 | 1393 | | | | | | | 189 | 816 | 446 | 370 | 84 | 1758 | 136 |
| Öring | | | | 499 | 112 | 387 | 505 | 112238 | 26366 | 13388 | 12978 | 9570 | 34640 | 3218 | 3218 | 1317 | 1901 | 2336 | 1790 | 12787 |
| Am. Bäckroding | | | | 64 | | 64 | 133 | | 1064 | 2417 | 892 | 1525 | 28248 | 83 | 83 | | | 111 | 41 | |
| Harr | | | | | | | | | | | | | | | | | | 883 | 81 | 789 |
| Sik | 79 | 67 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nors | 4488 | 387 | 277 | | | | 34 | | | | | | | | 1110 | 206 | | | | |
| Gädda | 4897 | 4477 | 1012 | 3830 | 1718 | 2112 | 701 | 531 | 539 | 217 | 5480 | 1921 | 3559 | 1158 | 1438 | 1297 | | 1158 | 1438 | 1297 |
| Abborre | 12440 | 12639 | 16914 | 10416 | 3809 | 6807 | 1346 | 4850 | | | | | | 11594 | 10568 | 4971 | 5597 | 2851 | 1666 | 197 |
| Gös | 3578 | 2503 | 7270 | 11753 | 6321 | 5432 | 5319 | | | | | | | | | | | | | |
| Gärs | 5814 | 3478 | 4174 | 5405 | 3250 | 2155 | 481 | 417 | | | | | | 68 | 755 | 778 | | 594 | 242 | 44 |
| Lake | 343 | 187 | 103 | 217 | 137 | 80 | 206 | | | | | | | 142 | 1738 | 1076 | 662 | 537 | 103 | 100 |
| Stäm/Id | 960 | 278 | 1104 | 1685 | 876 | 809 | 550 | 12645 | | | | | | | 1855 | 901 | 954 | 129 | 581 | |
| Ruda | 53 | | | | | | | | 101180 | 45933 | 55247 | | | | | | | | | |
| Mört | 3696 | 2894 | 4378 | 4753 | 2044 | 2709 | 1097 | 25747 | | | | | | | 16874 | 8378 | 6496 | 6336 | 5470 | 338 |
| Benlöja | 2722 | 988 | 3370 | 31219 | 15725 | 15494 | 17981 | 96 | | | | | | | 13995 | 7676 | 6319 | 620 | 7154 | |
| Eiritsa | | | | 717 | 351 | 366 | 711 | | | | | | | | 2045 | 1178 | 867 | 4862 | 1420 | 2282 |
| Braxen | 9129 | 11155 | 6284 | 10057 | 5139 | 4918 | 546 | 298 | | | | | | | | | | | | |
| Stensimpa | 142 | | 896 | 22573 | 10690 | 11883 | 23210 | 22069 | | | | | | | | | | 42747 | 46607 | 48230 |
| Nejonöga | 43 | 123 | 901 | 442 | 459 | 1036 | 10121 | | | | | | | | 74163 | 31754 | 42409 | 983 | 622 | 10017 |
| Totalt # läsningar | 48 740 | 39 149 | 45 905 | 105 001 | 50 671 | 54 330 | 55 249 | 112 238 | 77 838 | 129 963 | 60 213 | 69 750 | 64 122 | 64 711 | 131 821 | 62 121 | 72 549 | 64 231 | 68 973 | 76 217 |

BILAGA 7: VATTENANALYSER OCH DEFINITIONER

Utförliga beskrivningarna av de olika parametrarna för vattenanalyser beskrivs Havs- och vattenmyndighetens författningssamling 2019:24.

Övergödning av vattendrag uppstår då näringsämnen från t.ex. jordbruk eller avlopp når vattendragen och halten av totalfosfor är högre än 25 µg/l. Många fiskarter är känsliga för övergödning medan karpfiskar såsom braxen och mört börjar dominera, vilket ytterligare bidrar till övergödningproblemet. När vattnet passerar gränsen till näringsrikt (eutrofiskt) så "flippar" de biologiska förhållandena till en annan karaktär. I dessa vatten observeras då de tydligaste negativa effekterna med igenväxning, skador och lägre ekologisk kvalitet. Sötvatten med höga fosforhalter är kväverikare, saltare, grumligare och syrefattigare. År 1994 fanns 33 bräddpunkter registrerade utifrån Prästbordets reningsverk i Veckefjärden. Där släpptes orenat vatten (totalfosfor) ut vid högvattenföring.

Totalfosfor är organiskt bundet fosfor samt oorganisk fosfor. Fosfor är det näringsämne som vanligtvis styr växtproduktionen i sjöar och vattendrag, medan kvävet brukar finnas i överskott. Detta innebär att ytterligare tillskott av fosfor till vattnet ökar växtproduktionen. Växtproduktionen styr i sin tur djurproduktionen, vilket innebär att fosfor vanligtvis har en betydelsefull roll beträffande storleken på både växt- och djurproduktionen i sjöar och vattendrag. En del växter och djur gynnas medan andra missgynnas. När totalfosfor ökar i vattnet kan algblomning uppstå. En annan effekt av ökade näringshalter är syrgasbrist, på grund av ökad nedbrytning av döda växter och djur, som i sin tur är orsakad av den förhöjda växt- och djurproduktionen. Den ökade tillväxten och nedbrytningen som eutrofiering medför, är att sjöarnas naturliga igenväxning påskyndas. Oönskade karpfiskar (mört, braxen m. fl.) och syrgasbrist-tåliga maskar gynnas t ex av de allt grundare, igenslammade områdena.

Konduktivitet mäter vattnets förmåga att leda ström vilket indirekt beror på de salter (lösta joner) som finns i vattnet. Havsvatten och kalkrika sjöar (med högt pH och låg surhet) har hög konduktivitet. Vattendrag som är känsliga för försurning visar låg konduktivitet. Konduktivitet mäts i millisiemens per meter (mS/m).

pH-värdet (vätejonkoncentrationen) anger hur surt eller basiskt vattnet är. Värdet < 7 är sura och >7 är basiska. Vattnets surhet påverkar växt- och djursamhället. Vid försurning, det vill säga minskat pH, drabbas djur ofta av störd fortplantning. Under pH 6,2 drabbas kräftor och lax av reproduktionsstörningar. Under pH 5 utrotas öring.

Alkalinitet är ett mått på vattnets buffrande förmåga och har tillsammans med pH-värdet och hårdheten betydelse för vattnets aggressiva egenskaper. Ju högre alkalinitet desto större är vattnets förmåga att stå emot försurning. Kalkning höjer vattnets alkalinitet (vätekarbonat-halten).

Färg (mg Pt l-1) Humusämnen samt vissa järnföreningar färgar normalt vatten. Vattnets färg är viktig eftersom färgen inverkar på växtlivet då mörkt vatten inte släpper igenom tillräckligt med solljus. Hög humushalt (brunt vatten) begränsar växtligheten och växtalgen. Måttligt färgat vatten 25–60, Betydligt färgat vatten 60–100, Starkt färgat vatten >100 (HVMFS 2019:24)