

# Undersökning av flodnejonöga och svartmunnad smörbult i Gotlands vattendrag



Foto: Ireå, Martin Andersson-Li

Rapport av: Martin Andersson-Li

STOCKHOLM, 11-2021

Beställare:

Länsstyrelsen Gotland 2021 utförd av AquaBiota Water Research.

Kontaktinformation:

AquaBiota Water Research



Adress: Sveavägen 159, 113 46 Stockholm  
Tel: +46 8 522 302 40  
Mail: [info@aquabiota.se](mailto:info@aquabiota.se)  
[www.aquabiota.se](http://www.aquabiota.se)

Distribution: Fri

Internetversion:

Nedladdningsbar hos [www.aquabiota.se](http://www.aquabiota.se)

Kvalitetsgranskare:

Claes Vernerback

**Ämnesord:** Flodnejonöga, svartmunnad smörbult, qPCR, probe, primer, eDNA, hydrologi.

AquaBiota Report 2021:13

Projektnummer: 2021019

ISBN: 978-91-89085-37-4

ISSN: 1654-7225

© AquaBiota Water Research 2021

AquaBiota Report 2021:13

Författare: Martin Andersson-Li

AquaBiota Water Research

## Innehåll

Sammanfattning.....	5
1. Bakgrund.....	6
1.1 eDNA.....	6
2. Metodik .....	6
2.1 qPCR .....	6
2.2 eDNA-lokaler .....	7
2.3 Fältprovtagning .....	7
3. Resultat, Diskussion och riktlinjer .....	7
3.1 eDNA-inventering .....	7
3.2 Fältprovtagningen, beskrivning och lärdomar .....	11
3.3 Återkoppling hydrologi.....	13

## SAMMANFATTNING

eDNA (environmental DNA) har under det senaste decenniet visat sig vara ett lovande verktyg för inventering av vattenorganismer inom miljöövervakning och andra miljöundersökningar. 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 och genom molekyllära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område utan att man vare sig ser eller fångar in organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat ger analyserna en bild av artförekomst i nutid.

AquaBiota har på uppdrag av Länsstyrelsen Gotland inhämtat och sammanställt eDNA-analyser för flodnejonöga och svartmunnad smörbult i 25 lokaler. Provtagningsplanen, framtagen av WSP, innehöll ursprungligen 31 lokaler men då sex av lokalerna var uttorkade vid provtagningsstillfället inventerades endast 25.

Flodnejonöga hade säkerställd positiv detektion i sju lokaler och en ytterligare lokal där 1/3 delprov påvisade förekomst. Detektion av svartmunnad smörbult gjordes vid tre lokaler i Bungevik, Gothemså och Skarnviksån på Gotlands östsida. Detektioner av både flodnejonöga och svartmunnad smörbult skedde i områden där arterna observerats tidigare under den senaste 15 års-perioden (Artfakta). Detektion av svartmunnad smörbult gjordes dock i sötvatten som var hydrologiskt avgränsad från kusten i lokalerna vid Gothemså och Skarnviksån. Vi bedömer därmed att detektion ska tolkas som att svartmunnad smörbult nyligen befunnits sig i avrinningsområdet uppströms om provtagningslokalerna. Detta är första gången enligt Artfakta och oss veterligen som svartmunnad smörbult rapporterats i limniska system på Gotland.

# 1. BAKGRUND

## 1.1 eDNA

Undersökningsmetoden 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 påvisa vilka arter som befinner sig inom ett område, utan att man vare sig ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat (ca 2 dagar till 2 veckor) ger analyserna en bild av artförekomst i nutid. 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) och har en stor fördel vid inventering av skyddsvärda arter.

Två metoder dominerar eDNA-undersökningar, qPCR och metabarcoding (Strand m.fl. 2014, Shaw m.fl. 2016). Provtagningen, lagring och DNA-extraktionen är motsvarande för de två metoderna, vilket möjliggör en växling mellan metoderna vid behov.

För den aktuella undersökning valdes qPCR metodiken, då den har känsligare detektionsförmåga och är ett billigare alternativ vid eDNA-inventeringen av ett fåtal arter.

# 2. METODIK

## 2.1 qPCR

Laboratorieanalyserna utfördes av Centrum för genetisk identifiering (CGI) vid naturhistoriska riksmuseet.

Vattenprov togs från 25 olika lokaler och parallellt samlades ett vattenprov för negativ kontroll in. Vattenproverna förvarades efter provtagning och filtrering kallt och togs till laboratorier för DNA-extraktion som gjordes med en extraktionsrobot och "Kingfisher Cell and Tissue" DNA extraktionskit enligt beskrivning från tillverkaren. Detektion av målarter har gjorts enligt Thomsen m.fl. (2012) med "Applied Biosystems™ TaqMan™ Environmental Master Mix" på ett Bio-Rad CFX96 instrument.

Samtliga prover testades för inhibering genom att tillsätta DNA från större vattensalamander till respektive prov och med qPCR kontrollera att arten detekteras. För detektion av målarterna gjordes tre oberoende qPCR replikat för respektive prov och målarart. Svartmunnad smörbult detekterades med primer och probe beskrivna i Nevers m.fl. (2018), medan nejönöga detekterades med primers som heter *Lampetra* spp i

Ostberg m.fl. (2018). En egen probe som passar till dessa primers utvecklades som en del i projektet och har sekvensen: 5'-CGAGGCATTCAATTTTCGTCCG-3'.

Parallellt med dessa analyser kördes positiva kontroller från svartmunnad smörbult (*Neogobius melanostomus*), bäck- och flodnejonöga (*Lampetra planeri* och *Lampetra fluviatilis*), samt negativa kontroller. Notera att detektion av flodnejonöga bestämdes via geografisk uteslutning, då bäcknejonöga inte observerats på Gotland, och att metoden i sig själv inte kan särskilja mellan dessa mycket närbesläktade arter.

## 2.2 eDNA-lokaler

eDNA-lokaler selekterades utifrån provtagningsprogrammet för flodnejonöga och svartmunnad smörbult som tagits fram för Gotland av WSP. Programmet innehöll 30 vattendrag samt en ytterligare lokal i Boge Viken. Programmet rekommenderar lokaler för analyser av flodnejonöga respektive svartmunnad smörbult. I praktiken analyserades dock alla lokaler för båda arterna, då skillnad i pris blir marginell och det innebär extra arbete för labbet att separera proverna för enskilda behandlingar. Endast 25 av de 31 lokalerna provtogs då 6 lokaler var uttorkade vid provtagningsstillfället.

## 2.3 Fältprovtagning

Fältprovtagningen ägde rum 19–23 september 2021. Provtagningen genomfördes av projektansvarige och utgick från Visby och fortsatte därefter runt ön medurs med övernattningar på lokala boenden. Vid varje lokal filtrerades 3000 mL vatten samt att pH, temperatur, syre och salinitet mättes vid lokalen. När vattendragen var segmenterade till följd av torka togs flertal delprover längs ett hundratal meter från lokalens koordinatpunkt.

# 3. RESULTAT, DISKUSSION OCH RIKTLINJER

## 3.1 eDNA-inventering

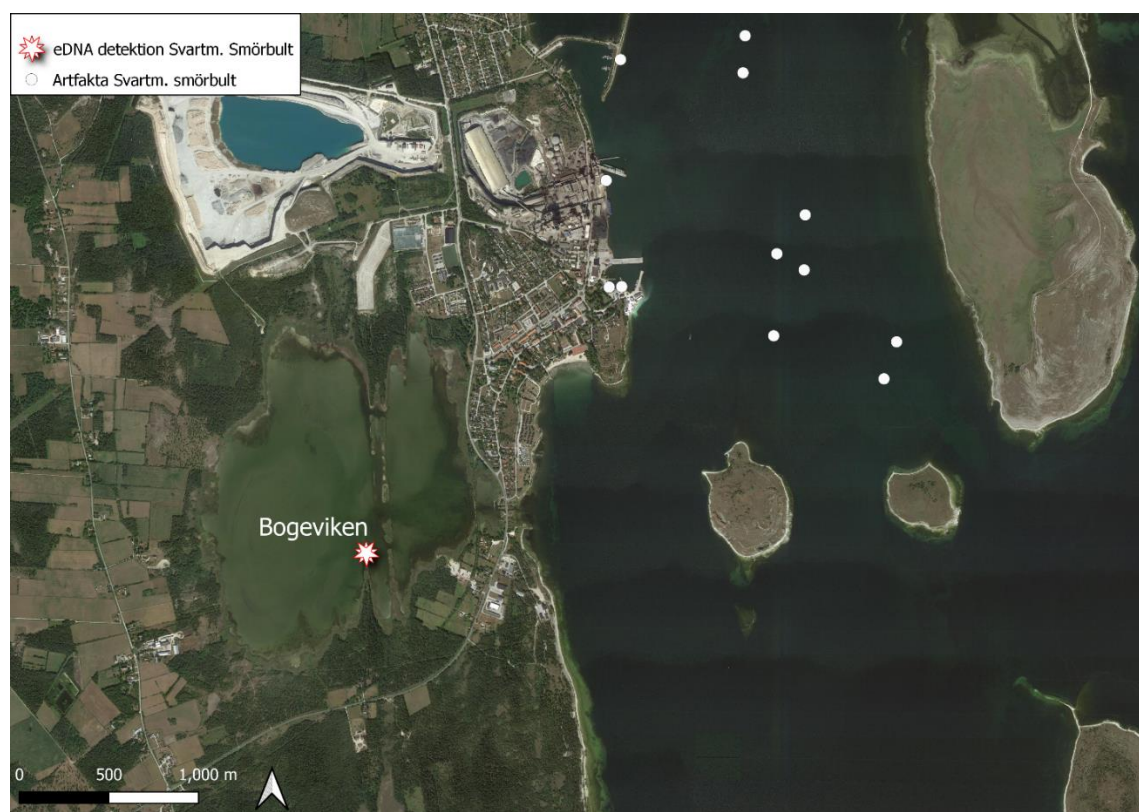
25 lokaler analyserades för båda arterna vilket representerade en stor andel av Gotlands betydande vattendrag. De negativa kontrollproverna gav ingen detektion och inga prover påvisade inhibering vid qPCR-amplifiering. Detektion av svartmunnad smörbult gjordes vid 3 lokaler (Bungevik: figur 1, Gothemsån: figur 2 och Skarnviksån: figur 3) på Gotlands nordvästra sida. Lokaler var i områden där Svartmunnad smörbult tidigare observerats i närområdet, enligt Artfakta, men detektion gjordes vid samtliga lokaler markant längre in mot land än vad som tidigare rapporterats.

I lokalerna vid Gothemsån respektive Skarnviksån var konduktivitet cirka 500  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , vilket är ett normalt värde för sötvatten. Därmed finns ingen orsak att tro att signalen skulle komma från kustområdet. Vidare gjordes inga detektioner i mellanliggande lokaler

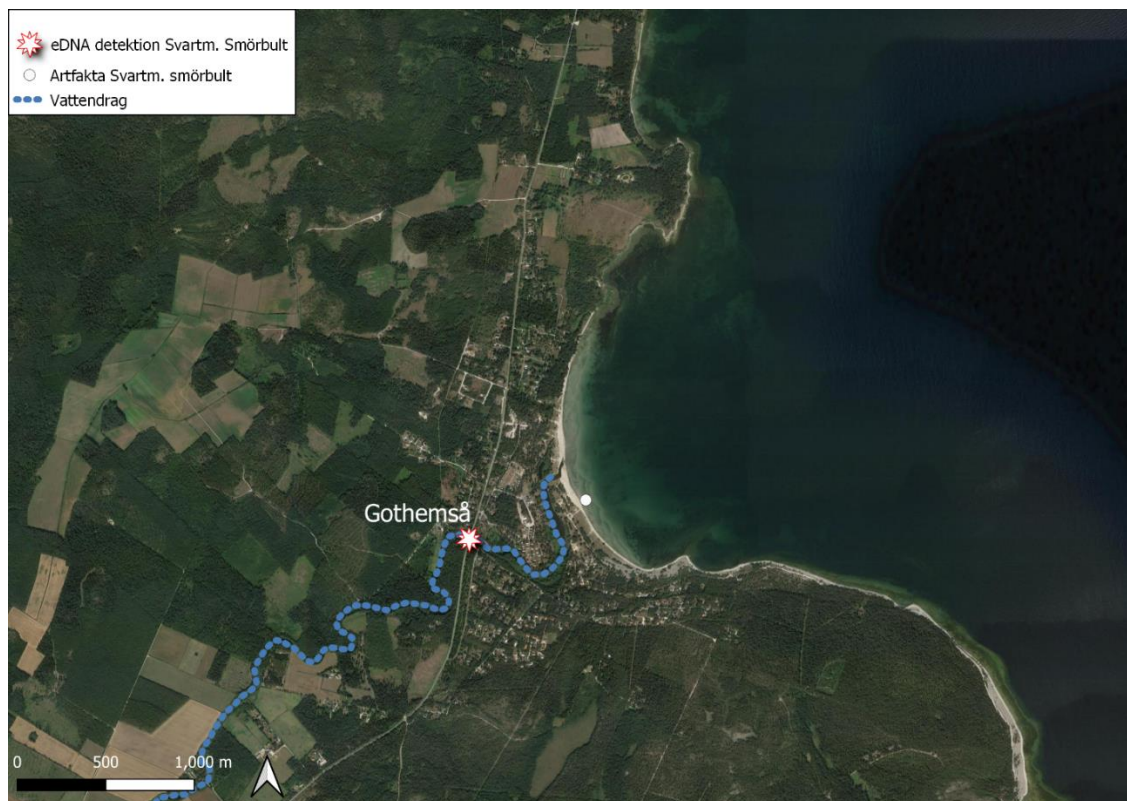


mellan dessa vattendrag, vilket betyder att potentiell korskontaminering mellan lokaler kan uteslutas. Vi bedömer därmed att detektion ska tolkas som att svartmunnad smörbult nyligen befunnits sig i avrinningsområdet uppströms om provtagningslokalerna i Gothemsån respektive Skarnviksån. Detta är första gången enligt Artfakta och oss veterligen som svartmunnad smörbult rapporterats i limniska system på Gotland.

Vid detektion i Bungeviken uppmättes en konduktivitet på 3500  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , vilket gör eDNA-partiklarnas ursprung mer svårtolkade. Provtagningspunkten var dock centralt belägen i Bungeviken och cirka 800 meter från Sjuströmmarinloppet, vilket ändå talar för att detektion kom från svartmunnad smörbult-individer som uppehöll sig inne i Bungeviken. Inga detektioner gjordes dock bland lokalerna på nordöstra Gotland, trots att området är det som tillsammans med östra Gotland har flest rapporterade fall av svartmunnad smörbult. Detta kan tolkas som att svartmunnad smörbult inte har vandrat upp i vattendragen i regionen. En alternativ förklaring var torkan som rådde i området. Två lokaler vid vattendraget i Hauträskbäcken var helt uttorkade. Vidare var Kioskbäcken vid Kappelhamnsviken närmast uttorkad med endast mindre vattensamlingar bestående, dock detekterades flodnejonöga vid lokalen. I kustområdet utanför Arå har svartmunnad smörbult rapporterats, men då ett vandringshinder ligger strax intill havet vid lokalen kan denna potentiellt förhindra uppvandring av arten här. Sammantaget indikerar inventeringen att arten inte rört sig uppåt i vattendragen på norra sidan av Gotland, men då förhållandena var försvårande är det svårt att slutgiltigt säkerställa.



**Figur 1.** eDNA-detektion för Svartmunnad smörbult i Bogevisken och tidigare fyndplatser de senaste 15 åren (Artfakta). Majoriteten av tidigare observationer gjordes 2020–2021.



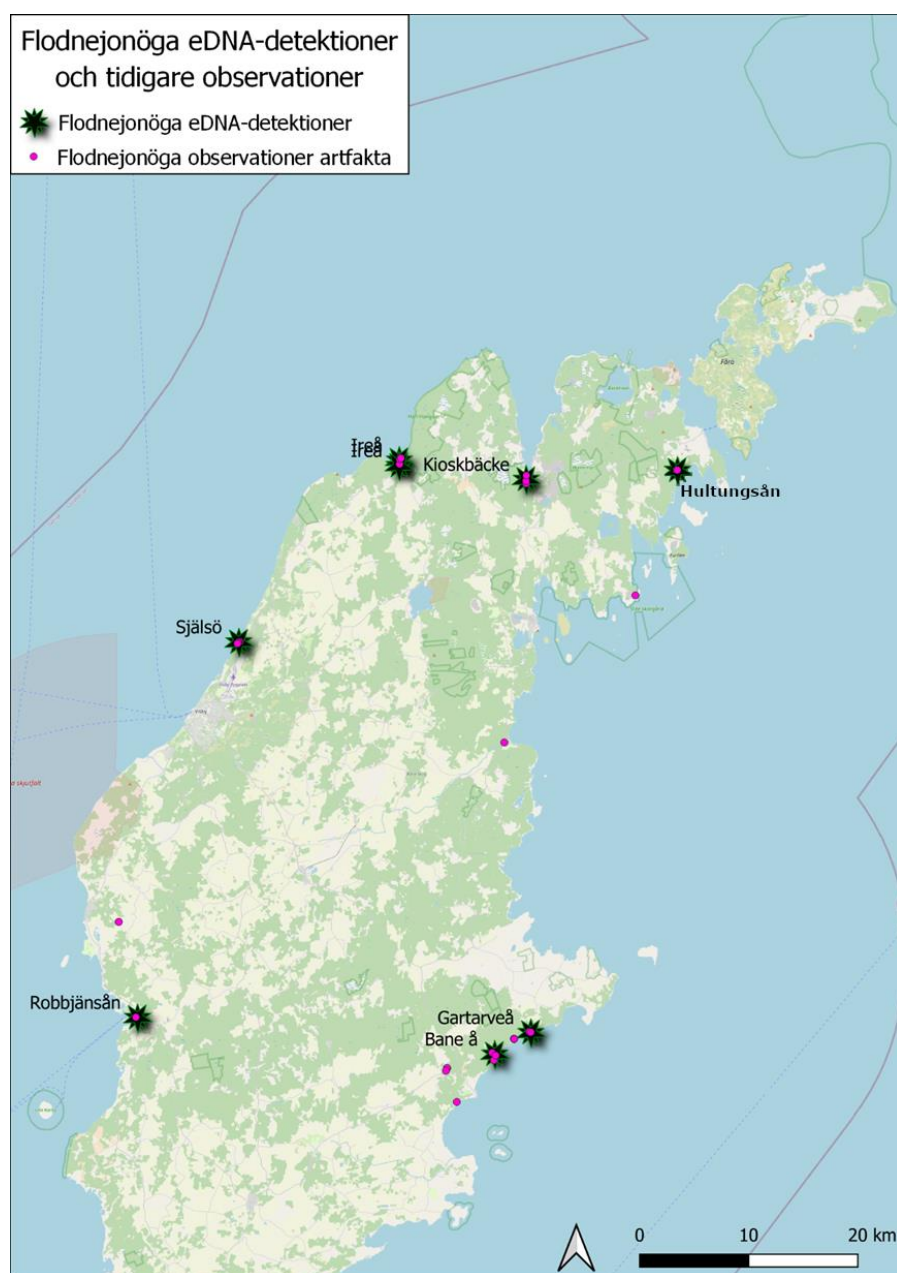
**Figur 2.** eDNA-detektion för Svartmunnad smörbult i Gothenburg och tidigare fyndplatser de senaste 15 åren (Artfakta). Den tidigare observationen i kustområdet gjordes 2019.



**Figur 3.** eDNA-detektion för Svartmunnad smörbult i Skarviken och tidigare fyndplatser de senaste 15 åren (Artfakta). De tidigare observationerna i kustområdet gjordes 2018–2020.



Flodnejonöga hade positiv detektion i åtta lokaler som var väl spridda över Gotland. Detektion gjordes i Robbjänsån, Bane å, Gartarveå, Hultungså, Kioskbäcken, Själsö samt vid båda lokalerna vid Ireå (figur 4). Detektionen vid Gartarveå var dock svag, med endast 1/3 positiva utfall i qPCR testet, men då flodnejonöga tidigare rapporterats i vattendraget vid fyra tillfällen (2017–2018) bedömer vi detektion som sannolik. Generellt matchades eDNA-detektioner väl med rapporterade observationer från de senaste 15 åren. Att positiva detektioner gjordes för flodnejonöga i Själsö, Gartarveå och Kioskbäcken trots att vattendragen var segmenterade i pooler påvisar även metodens förmåga att prestera även under ogynnsamma förhållande.



**Figur 4.** Detektioner för flodnejonöga på Gotland och tidigare fyndplatser de senaste 15 åren (Artfakta). De tidigare observationerna förekom under hela tidsspannet 2006–2021.

## 3.2 Fältprovtagningen, beskrivning och lärdomar

En rimlig tidsåtgång för provtagningen bedömer vi till 3–6 arbetsdagar, beroende på arbetstempo, erfarenhet, antal provtagare och tid per dag i fält. Provtagning bör helst genomföras i ett terrängvänligt fordon samt med en elektronisk handpump för vattenfiltrering. Allokering av provtagningspunkter var välgenomtänkt och representerade en stor andel av Gotlands betydande vattendrag. Majoriteten av lokaler var vidare lättillgängliga från väg, med undantag för lokalerna Hugreifsån övre (ID 17) och Gartarveå (ID 15), som krävde betydligt mer arbetsinsats för att provta. Lokalerna låg generellt aningen avsidet vilket gav arbetsro och med möjlighet att parkera bilen på en rimlig plats. Undantagen var primärt Bångån (ID 5), Hugreifsån (ID 16), Gothemsån (ID 10) och Burgviksån (ID 21). För dessa lokaler är det en god idé att notifiera närmaste markägare och eventuellt be om att få låna en yta för parkering då alternativen var begränsade. Bemötande var annars genomgående positivt när vi förklarade syftet med provtagningen. Vid Vikeå (ID 8) rekommenderas att ta vägen söderifrån, då vägen är för smal för mötande trafik från norra sidan mot lokalen.

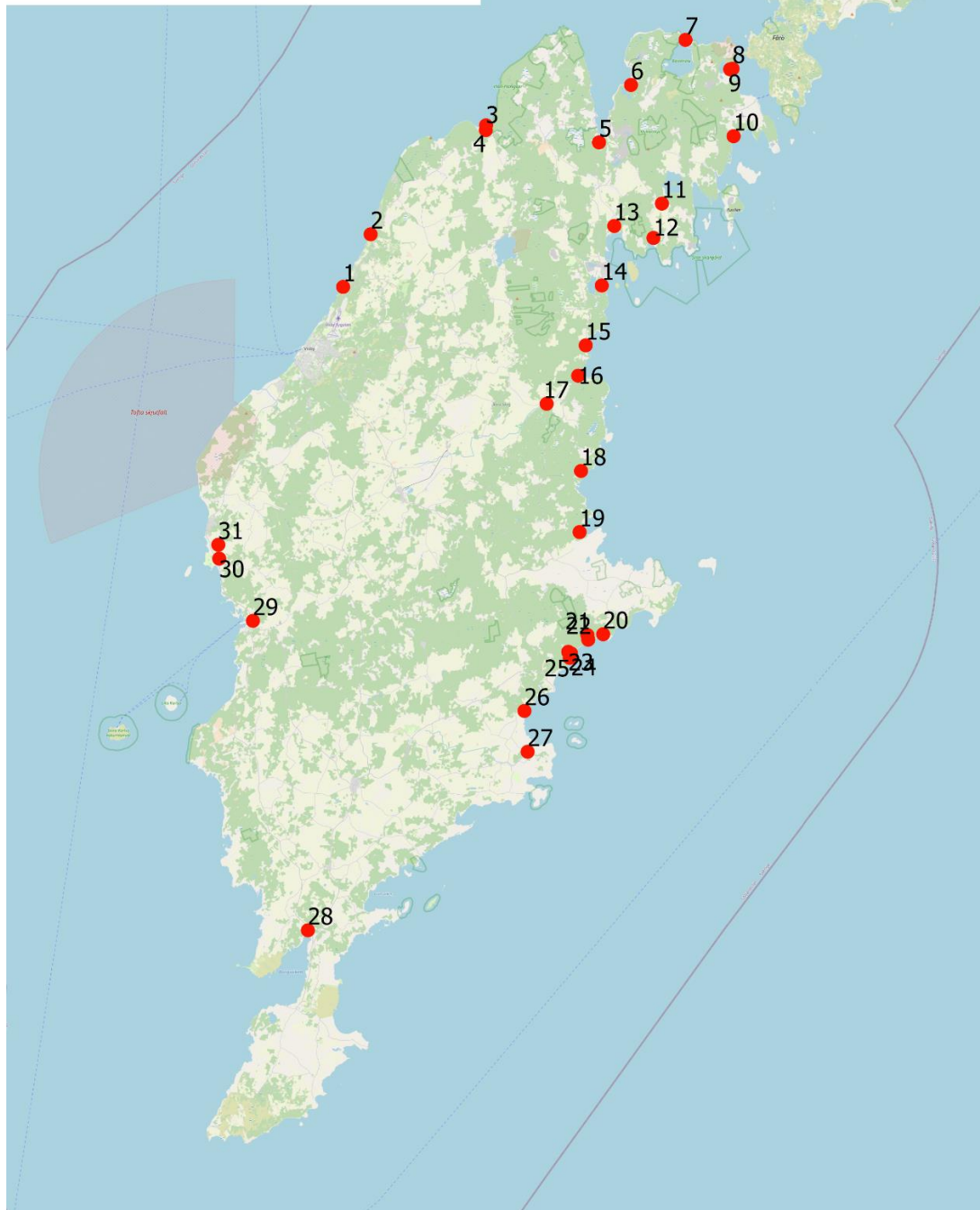
Vidare föreslår vi en justering av ID numrering för provtagning. Den nuvarande provtagningsnumreringen utgår sannolikt från Fårö och fortsätter mestadels medurs runt ön, men det finns även ett antal närliggande lokaler som har hopp i sin ID numrering. Vi föreslår att ändra numreringen för provtagningslokalerna så som de är beskrivna i nedanstående karta och tabell (figur 5, tabell 1). Den första lokalen norr om Visby blir då ID 1 och sen fortsätter numreringen medurs runt ön, således blir lokalen närmast söder om Visby den sista lokalen (ID 31).

Vattendrag	OldID	NewID	Vattendrag	OldID	NewID
Hauån/Hauträskbäck	1	8	Hugreifsån öv	17	21
Hauån/Hauträskbäck	2	9	Bane å	18	24
Hultungså	3	10	Djupå	19	18
Bångån	4	12	Närkä	20	27
Bångån	5	11	Burgsvikså	21	28
Vägumeån	6	13	Robbjänsån	22	29
Bogeviken	7	14	Västergarnsån	23	30
Vikeån	8	15	Västergarnsån/Id	24	31
Gothemsån	9	16	Själso	25	1
Gothemsån	10	17	Lummelundaå	26	2
Skarnviksån/Nygårds	11	19	Ireå	27	3
Tutenå	12	26	Ireå	28	4
Halsegårdåån	13	25	Kioskbäcke	29	5
Halsegårdåån	14	23	Vällesån	30	6
Gartarveå	15	20	Arå	31	7
Hugreifså	16	22			

**Tabell 1.** Tabell över förslagna ID ändringar.

## ID förslag för framtida provtagningar

● Provtagningslokaler



**Figur 5.** Förslag till ändrad ID-numrering av provtagningslokalerna för flodnejonöga och svartmunnad smörbult.

### 3.3 Återkoppling hydrologi

Det torra hydrologiska läget på Gotland under provtagningen hade en påverkan på eDNA-undersökningen. Totalt var 6 lokaler helt uttorkade: Hauå/Hauträskbäcken (ID 1–2), Halsegårdaån (ID 13–14), Djupå (ID 19) och Burgvikså (ID 21). Vidare var flera ytterligare vattendrag segmenterade i avskilda pooler (exempelvis Själsö, ID 25), eller hade ett mycket begränsat flöde (exempelvis Bane å, ID 18).

Detta är problematiskt i det avseendet att det uppstår en tveksamhet gällande provets rumsliga representation. I klarspråk så kommer provet antingen att representera vattendraget eller den lokala vattensamlingen, beroende på tiden som lokalen varit helt eller delvis isolerad från vattendraget. Det beror på att vattensamlingen bara representerar vattendraget så länge eDNA-partiklarna från vattendraget består i vattensamlingen. Förenklat visar experiment att eDNA tenderar att bestå mellan 2–14 dagar i mesocosm (avgränsade vattenbassänger) experiment som efterliknar naturliga sötvattenförhållanden (Dejean m.fl. 2011, Thomsen m.fl. 2012a, Thomsen m.fl. 2012b, Piaggio m.fl. 2014). Studier har även tittat specifikt på de fysikaliska parametrar som påverkar eDNA-nedbrytning (Strickler m.fl. 2015), främst temperatur, pH och UV-ljus. I de stagnerade vattendragen på Gotland under början av september kommer vattentemperaturen vara förhållandevis hög, UV-strålning markant och sannolikt penetrera hela vattenpelaren, samt att vatten är stillastående vilket gynnar bakteriell omsättning. Detta är faktorer som alla bidrar till snabbare nedbrytning av eDNA. Således kan vi förmoda att eDNA endast kommer bestå under ett fåtal dagar. Följden blir då att segmenterade vattendrag snabbt kommer sluta representera vattendraget, och detektion förutsätter att målarten finns i den faktiska vattenkroppen, vilket förstas sänker sannolikheten för detektion.

September beskrivs vidare ofta som det "hydrologiska nyåret" då minimiflöden ofta noteras, vilket gör perioden för provtagningen problematisk för gotländska vattendrag. Således föreslår vi att framtida inventeringar också väger in det hydrologiska läget i planeringen, vilket sannolikt skulle innebära en provtagning tidigare under sommarmånaderna.



## REFERENSER

- Agersnap, S., Larsen, W. B., Knudsen, S. W., Strand, D., Thomsen, P. F., Hesselsoe, M., ... Moller, P. R. (2017). Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS ONE*, 12, e0179261.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K. D., & Sayers, E. W. (2018). GenBank. *Nucleic acids research*, 46(D1), D41-D47.
- 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.
- Dejean T., Valentini, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., Miaud, C., 2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE* 6, e23398.
- Livet i Havet, 2021. <https://www.havet.nu/livet/art/svartmunnad-smorbult>
- 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.
- Nevers, Meredith B, Murulee N Byappanahalli, Charles C Morris, Dawn Shively, Kasia Przybyla-Kelly, Ashley M Spoljaric, Joshua Dickey, and Edward F Roseman. 2018. "Environmental Dna (eDNA): A Tool for Quantifying the Abundant but Elusive Round Goby (*Neogobius Melanostomus*)." *PLoS One* 13 (1): e0191720.
- Näslund, J., Didrikas, T., Hellström P., & Hellström M. AquaBiota Rapport 2019:15 Inventering av fisk vid Gåsefjärden i Karlskrona skärgård med nätprovfiske och eDNA.
- 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.
- Ostberg, Carl O, Dorothy M Chase, Michael C Hayes, and Jeffrey J Duda. 2018. "Distribution and Seasonal Differences in Pacific Lamprey and Lampetra Spp eDNA Across 18 Puget Sound Watersheds." *PeerJ* 6: e4496.
- 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.
- Piaggio, A.J., Engeman, R.M., Hopken, M.W., Humphrey, J.S., Keacher, K.L., Bruce, W.E., Avery, M.L., 2014. Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 374–380.

- Pilliod, D.S., Goldber, C.S., Arkle, R.S., Waits, L.P., 2013. Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Can. J. Fish. Aquat. Sci* 70, 1123-1130.
- Shaw, J. L. A., Clarke, L. J., Wedderburn, S. D., Barnes, T. C., Weyrich, L. S., & Cooper, A. (2016). Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biological Conservation*, 197, 131–138.
- Strand, D. A., Jussila, J., Johnsen, S. I., Viljamaa-Dirks, S., Edsman, L., Wiik-Nielsen, J., Vrålstad, T. (2014). Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *Journal of Applied Ecology*, 51, 544–553.
- Strickler, K. M., Fremier, A. K., & Goldberg, C. S. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85-92.
- 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., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E., 2012b. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21, 2565–2573.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M., Willerslev, E., 2012a. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE* 7, e41732.
- Vrålstad, T., Knutsen, A. K., Tengs, T., & Holst-Jensen, A. (2009). A quantitative TaqMan (R) MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology*, 137, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.022>.



[www.aquabiota.se](http://www.aquabiota.se)

