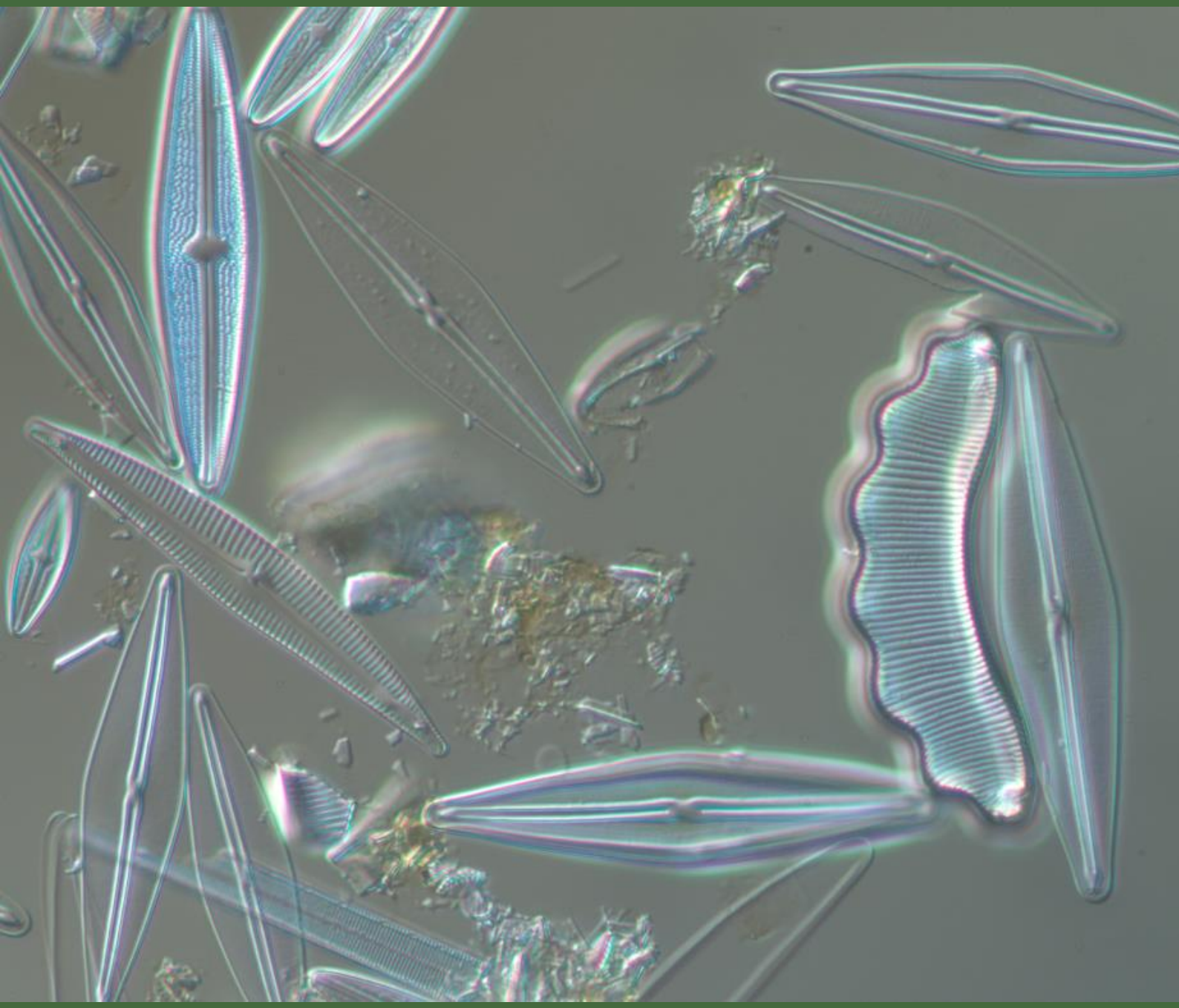
Länsstyrelserna



Kiselalger i svenska vattendrag och sjöar

Utvärdering av det gemensamma delprogrammet 2021

Förord

En femtedel av det syre som vi andas kommer från kiselalger, en grupp organismer som finns i stora mängder i världens oceaner men också i alla typer av sötvattensmiljöer. Kiselalger hittas i den fria vattenmassan men också som påväxt på stenar, växter eller andra föremål. Kiselalger är utmärkta indikatorer på vattenkvaliteten i rinnande vatten och sjöar och används i Europa och i många andra länder inom miljöövervakningen. Kiselalger ingår i de svenska bedömningsgrunderna för miljökvalitet och används vid bedömning av ekologisk status enligt Förordning (2004:660) om förvaltning om kvaliteten på vattenmiljön.

Det gemensamma delprogrammet ”Kiselalger i vattendrag” har existerat sedan 2009. Programmet har utgjort en förtätning av det nationella kiselalgsprogrammet och är tänkt att fylla de luckor som förekommer avseende representativitet hos vattendragen och olika miljöpåverkan. Tillsammans ska data bidra till att beskriva miljötillståndet i Sveriges sötvattensmiljöer med avseende på främst surhet och näringstillstånd. Sedan 2014 sköter Länsstyrelsen i Stockholms län samordningen inom programmet. Institutionen för vatten och miljö vid Sveriges lantbruksuniversitet har under alla år deltagit som utförare av utvärderingar samt gett förslag till förändringar av programmet.

Denna rapport utgör den tredje och sista utvärderingen av det gemensamma delprogrammet. From 2022 ingår undersökningar av kiselalger i de program som rör basövervakning inom varje vattendistrikt och som för närvarande är under utveckling.

Rapporten har skrivits av Maria Kahlert vid Institutionen för vatten och miljö, Sveriges lantbruksuniversitet i dialog med Joakim Pansar vid enheten för miljöanalys, Länsstyrelsen i Stockholm. Kommentarer och slutsatser i rapporten är författarens egna.

Uppdraget har utförts med stöd av statliga medel från Havs- och vattenmyndigheten.

Innehåll

Förord 4

Innehåll 5

Uppdragets syfte och omfattning 6
- Data hos nationell datavärd 7
- Tidsserieanalyser av insamlade data 8
  - Slutsatser databaser 14
- Kiselalger i sjöar 14
  - Samband mellan IPS och totalfosfor i ekoregioner och sjötyper 15
  - Pilotprojekt i Stockholms län 17
  - Slutsatser sjömetoden 19
- Litteraturlista 19

eDNA-teknik för kiselalgsanalys 21
- Vad är eDNA-metoder? 21
- eDNA i miljöövervakning av sjöar och vattendrag 22
- eDNA-metoder för olika organismgrupper – pågående utvecklingsarbete 25
  - Kiselalger 25
- Referenser streckkodning 28

Uppdragets syfte och omfattning

Rapporten redovisar den tredje gemensamma utvärderingen av regional och nationell miljöövervakning inom det gemensamma delprogrammet ”Kiselalger i vattendrag”. Delprogrammet startade 2009 och är ett frivilligt samarbete mellan ett stort antal länsstyrelser i Sverige. Ett syfte är att samordna den nationella, regionala och lokala miljöövervakningen så att undersökningar genomförs på ett likartat sätt. Inom delprogrammet genomförs även gemensamma utvärderingar och mer tillförlitliga bedömningar av miljötillståndet och därigenom få ut mer av insatta resurser. Programmet utgör en förtätning av det nationella kiselalgsprogrammet och är tänkt att fylla de luckor som förekommer med avseende på representativitet i vattendragsurval och miljöpåverkan. Arbetet samordnas av Länsstyrelsen i Stockholms län. Institutionen för vatten och miljö vid Sveriges lantbruksuniversitet har under alla år deltagit som utförare av utvärderingar samt gett förslag till program. Enligt projektets tidsplan ska regelbundna utvärderingar göras av delprogrammet. De tidigare utvärderingarna gjordes 2011 och 2015 (Kahlert, 2011; Kahlert and Pansar, 2015).

Det här uppdraget omfattar en utvärdering av tidsseriedata i vattendrag från 2007–2020 inom det gemensamma delprogrammet kiselalger. Vidare omfattar uppdraget en första utvärdering av kiselalger i sjöar och en kort lägesrapport om aktuella projekt kring eDNA-teknik för kiselalgsanalys. Uppdragsbeskrivningen anger att:

1. Utvärderingen ska verka för att all data framtaget inom GDP kiselalger finns inrapporterat och uppladdat hos nationell datavärd.
2. Tidsserieanalyser av insamlade data. För detta ändamål väljs i dialog med Länsstyrelsen ett urval stationer ut med hög provtagningsfrekvens och bra tillgång på attributdata. Förslagsvis väljs stationer som har årlig kiselalgsprovtagning och vattenkemisk provtagning motsvarande minst 6 prov per år. Endast data som finns inrapporterad till SLU-MVM behöver hanteras.
3. En första utvärdering av hur de nya bedömningsgrunderna för kiselalger i sjöar fungerat ska genomföras. Eventuella styrkor och svagheter hos bedömningsgrunderna ska kommenteras med förslag till förbättringar och/eller behov av vidare utveckling.
4. I första hand ska miljökvalitetsindex IPS och ACID ska utvärderas tillsammans med överenskomna bakgrundsdata.
5. Utvärderingen ska innehålla en kort lägesrapport om aktuella projekt kring eDNA-teknik för kiselalgsanalys.
6. Om det finns behov av att uppdatera en undersökningstyp ska detta meddelas i rapporten.

7. Uppdraget ska utföras i nära samarbete med uppdragsgivaren och med minst 2 avstämningar.

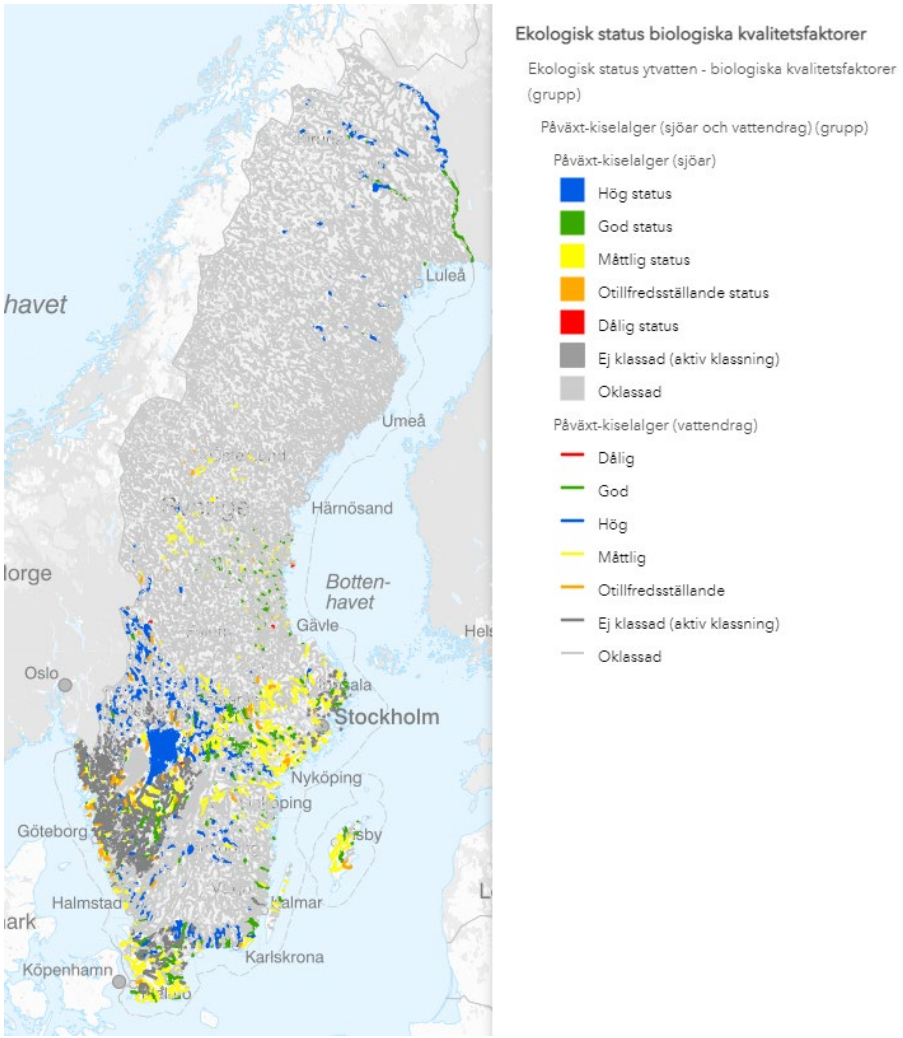
Data hos nationell datavärd

En stor ansträngning har gjorts för att alla kiselalgsstationer och mätdata ska vara tillgängliga via databasen ”Miljödata MVM” (Miljödata-MVM, 2021) från datavärden SLU (Sveriges lantbruksuniversitet) och i VISS (VISS (VattenInformationsSystem Sverige), 2021). Alla länsstyrelser har kontaktats för att förtydliga värdet av att mätdata sammanställs i en enda databas, just för att göra gemensamma utvärderingar och vidareutveckling av bedömningsgrunder möjliga. Länsstyrelser har även ombetts att kontrollera att alla deras stationer finns i Miljödata MVM. Det har upptäckts att vissa stationer saknas fast de borde varit inrapporterade och andra stationer har lagts in fast det var inte planerat för dessa från början. Havs- och vattenmyndigheten har stött arbetet med att lägga in äldre data, ett arbete som fortfarande pågår. Det betyder att inte alla data har kunnat användas som underlag för denna rapport men att de kommer att kunna nyttjas i framtiden. Institutionen för vatten och miljö (IVM-SLU) har utvecklat ett system där alla lokaler har fått ett unikt stationsidentifikationsnummer, MD-MVM Id, som gör det möjligt att automatiskt koppla data från flera miljöövervakningsprogram såsom vattenkemi och kiselalger. De flesta kiselalgsstationer borde numera vara inrapporterade och kunde användas i föreliggande rapport, med en sammanställning av deras kiselalgsdata, vattenkemi, avrinningsområdets bakgrundsfakta och statusklassning.

Det slutliga datasetet, framtaget i januari 2021, består av 821 vattendrag och 35 sjöar där både vattenkemi och kiselalger har provtagits åtminstone ett år. För utvärdering av trender användes de 177 vattendragslokaler som provtagits sex år eller mer under perioden 2000–2019. 41 av dessa ingår i det nationella programmet ”Trendvattendrag” med mer än 10 år av observationer och finns med i trendanalysen för ”Sveriges vattenmiljö” (se nedan). Observera att samkörningen med data för avrinningsområde och statusklassning fortfarande måste göras manuellt och att det därför inte är möjligt att snabbt utöka den sammanställda databasen med nya stationer. Så även om fler kiselalgsstationer med vattenkemiprovtagning har lagts till Miljödata MVM sedan januari 2021 så måste utvärderingen av dem vänta till nästa genomgång.

En geografisk översiktskarta av hur påväxt-kiselalger som biologisk kvalitetsfaktor används för bedömning av den ekologiska statusen visar tydligt att de flesta av Sveriges avrinningsområden saknar bedömning genom kiselalgsmetoden, även om en imponerande del av Sverige är täckt (Figur 1). Vid informella diskussioner med ansvariga på länsstyrelser har det framkommit att alla data som finns inte läggs in i VISS, mest på grund av tidsbrist. Ett test av några utvalda stationer i Miljödata MVM, som inte verkar finnas med på kartan, bekräftade detta. Det är synd, eftersom VISS är

ett bra verktyg att få en översikt om statusklassningar, riskbedömningar, påverkanskällor och åtgärder. Data som inte läggs in syns inte även om de finns.



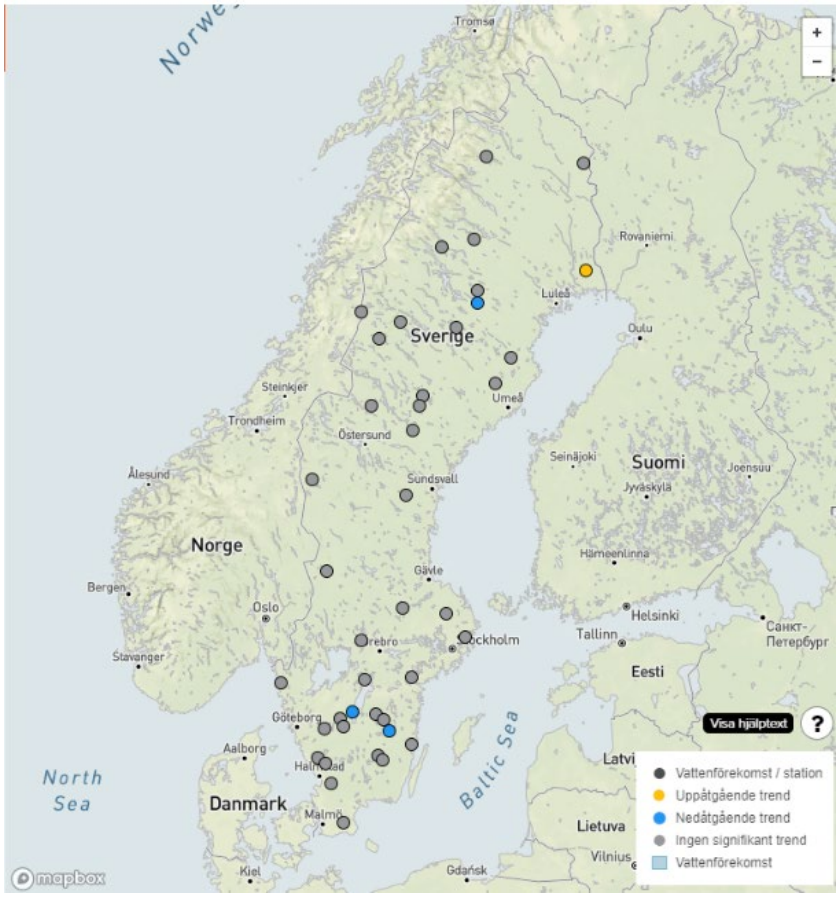
Figur 1. Bedömning av ekologisk status i avrinningsområden med hjälp av den biologiska kvalitetsfaktorn påväxt-kiselalger. Karta hämtad från VISS (Vatteninformationssystem Sverige) (november 2021).

Tidsserieanalyser av insamlade data

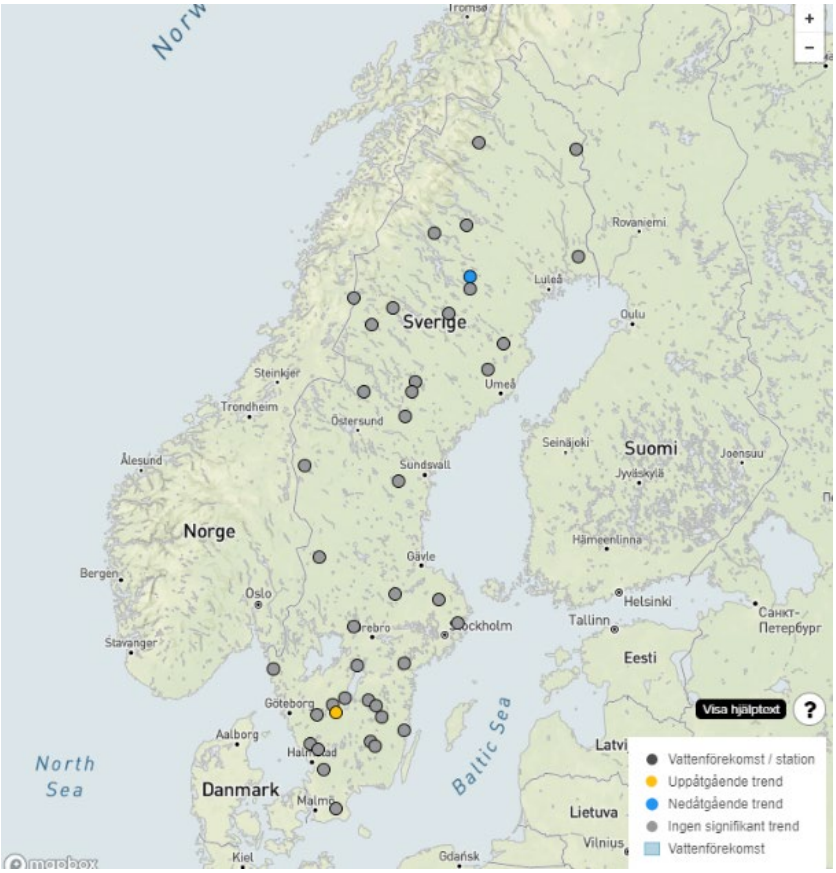
Institutionen för vatten och miljö vid Sveriges lantbruksuniversitet (IVM-SLU) medverkar i samverkansprojektet ”Sveriges vattenmiljö” som leds av Havsmiljöinstitutet och som finansieras av Havs- och vattenmyndigheten (HaV) och Naturvårdsverket (Sveriges vattenmiljö, 2021). Sveriges vattenmiljö strävar efter en bredare användning av miljöövervakningsdata och en mer heltäckande beskrivning av miljön. Målet är att den breda publiken ska kunna hitta aktuell information om tillståndet och trender i Sveriges olika vattenmiljöer, från källa till hav. Informationen har olika grad

av fördjupning och kan sorteras efter miljötema eller geografiskt område. Beskrivningarna baseras på resultaten från svensk akvatisk miljöövervakning, både nationell och regional. Sveriges vattenmiljö är även kopplat till VISS. Visionen är att tillsammans med vetenskapliga rapporter och samlad expertis ge en aktuell och nyanserad bild av miljötillståndet i grundvatten, sjöar och vattendrag samt kust och öppet hav.

Trendanalysen i Sveriges vattenmiljö (”Vattentrender - Karta och grafer”, filtrering för ”Bottenvegetation”) görs i samarbete med IVM-SLU, med en speciell metod och endast på data med observationer från 10 år eller mer. Kiselalger lades in på websidan under våren 2021, och arbetet med förtydligande information om kiselalgsindex och fastsittande kiselalger i sjöar och vattendrag som miljöövervakningsparameter är på gång, men har ännu inte publicerats. De resultat som visas just nu (Figur 2, Figur 3) är en första version. Dataunderlaget för kiselalger och vattenkemi är hämtat från den nationella databasen Miljödata MVM. Men eftersom statistiska trendanalyser endast utförs för tidsserier med data från minst 10 år visas bara den nationella miljöövervakningens 41 stationer. Målet är att lägga till fler program framöver. Trendanalyserna (Figur 2, Figur 3) visar att IPS och ACID inte har förändrats signifikant under de 10 senaste åren för de flesta av dessa stationer (metod: Mann-Kendalltest), samt att skillnaderna är små för de enstaka stationer där en signifikant förändring faktiskt har skett. Enda undantaget är Helgaboån som har bytt surhetsklass från *måttligt surt* till *nära neutralt*.

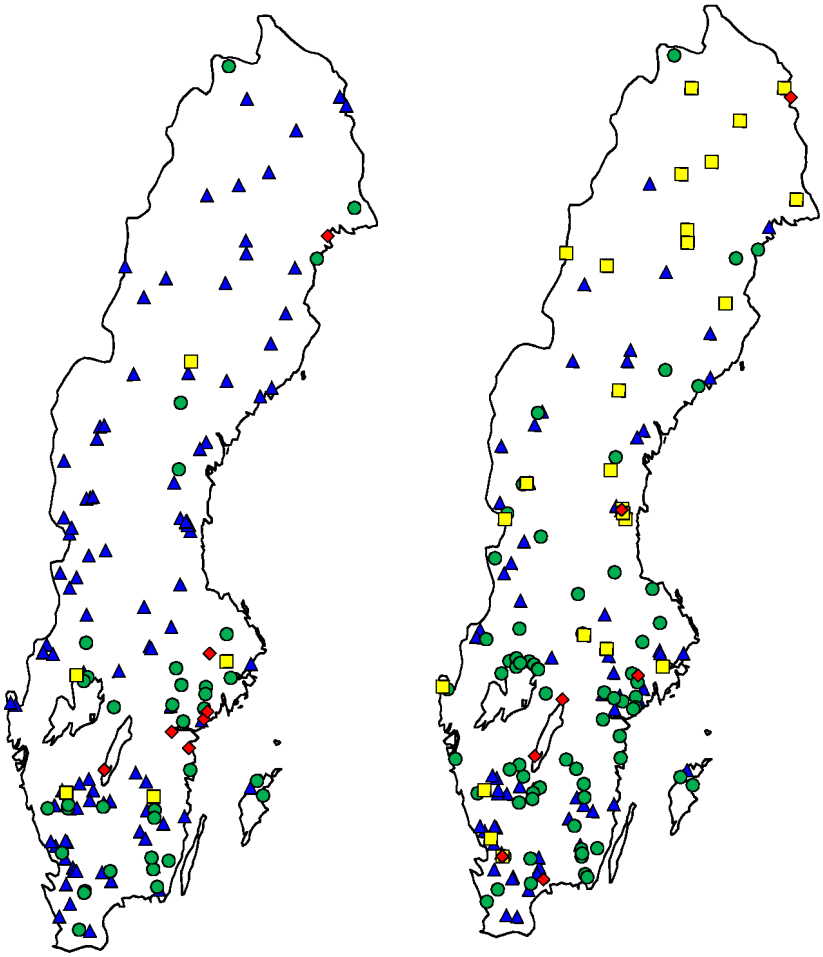


Figur 2. Trender i kiselalgsindex IPS för stationer inom nationell miljöövervakning (n=41 vattendrag, hämtad från Sveriges vattenmiljö (november 2021).



Figur 3. Trender i ACID för stationer inom nationell miljöövervakning (n=41 vattendrag, hämtad från Sveriges vattenmiljö (november 2021).

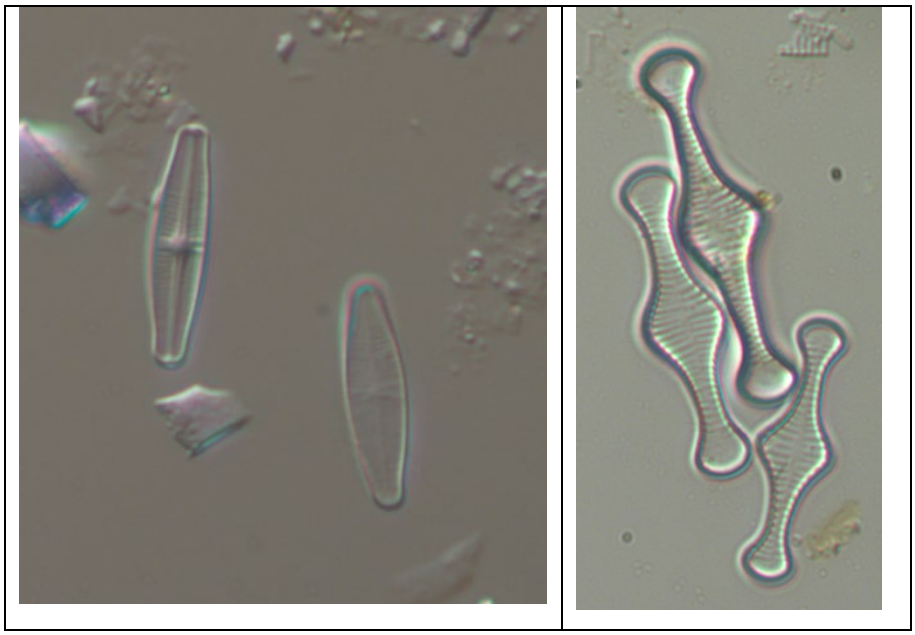
En mera komplett bild av trenderna av kiselalgsindexen IPS och ACID skapades genom att använda de 177 vattendragslokalerna med data för sex år eller mer under perioden 2000–2019 (Figur 4). En enkel metod för att beräkna tidstrenden som lutning under hela perioden (lineär regression) användes, ingen test för signifikans gjordes, så resultaten ska tolkas med försiktighet. Fördelen med att visa alla resultat ändå är att det möjliggör en visuell analys av alla trender på Sveriges karta för att se ifall vissa regioner har en tydlig gemensam trend.



Figur 4. Trender 2000–2019 i kiselalgsindex IPS (t.v.) och ACID (t.h.) för stationer inom nationell och regional miljöövervakningen. (n=177 vattendrag, data från Miljödata MVM). Blå: ingen förändring under tidsperioden 2000-2019 (Δ IPS eller ACID -0.05-0.05), gul: negativ trend (Δ IPS -0.05-(-0.1), Δ ACID -0.05-(-0.15)), röd: stark negativ trend (Δ IPS < -0.1, Δ ACID < -0.15): grön: positiv trend (Δ IPS > 0.05, Δ ACID >0.05).

Kiselalgsindexet IPS som visar påverkan av närsalter och organiska föroreningar är ganska stabilt i de flesta analyserade vattendragen. Några stationer har en uppåt- eller nedåtgående trend och det verka finnas relativt många stationer med en positiv trend i södra halvan av Sverige. En ökning av IPS kan betyda både en minskning av närsalter och en förbättring av andra miljöfaktorer eftersom IPS indikerar en allmän påverkan av vattnet. Troligtvis kan den positiva IPS-trenden kopplas till trenden av minskad fosforbelastning i svenska vatten (se t.ex. Fölster, 2021; Sveriges vattenmiljö, 2021). Det är lite oklart varför stationer särskilt i södra halvan av Sverige har en positiv IPS-trend eftersom fosforbelastningen minskar i hela Sverige. Möjligtvis täcker analyserna olika tidsramar.

Även surhetsindexet ACID visar över lag en positiv trend i många vattendrag i södra halvan av Sverige (Figur 4). I norra Sverige har i stället många vattendrag en nedåtgående trend (Figur 4). Trenden i ACID-ökning under 2000–2019 i södra halvan av Sverige stämmer överens med den allmänna trenden att sulfat har minskat och pH ökat tydligt sedan millennieskiftet. Det är en trend som särskilt gäller södra Sveriges vattendrag och sjöar till följd av den minskande sulfatdepositionen under 1990-talet (Fölster, 2021). Det finns ingen känd motsatt kemisk trend i norra Sverige som kiselalgerna verkar indikera. Jag undersökte också ifall trenden mot brunare vatten (”brunifieringen”) kanske skulle kunna förklara den negativa ACID-trenden i norra Sverige, eftersom släktet *Eunotia*, som ofta drar ner ACID-värden, oftare förekommer i bruna vatten än vad andra släkten gör (Kahlert and Gottschalk, 2014). Brunifieringen har dock varit mycket större i södra Sverige än i norra (de Wit et al., 2016), vilket inte stödjer den hypotesen. En närmare analys av kiselalgssamhällen i de vattendragen i norr med nedåtgående ACID-trend visar att den relativa andelen av det dominerade taxonet, kiselalgskomplexet *Achnanthidium minutissimum,* minskar i genomsnitt, medan andelen av arten *Tabellaria flocculosa*, det tredje viktigaste taxonet, ökar. Det finns olika hypoteser om vilka faktorer som leder till dominans av det ena eller andra taxonet, och möjliga kandidater är bland annat störningsfrekvens samt närings- och ljustillgång. Det vore väldigt intressant att följa upp dessa trender och förstå orsaken. För en detaljerad analys måste dock data finnas för alla dessa faktorer och varje vattendrag, vilket är inte fallet i nuläget. Observera dock att dessa trendanalysresultat är än så länge preliminära, och därför osäkra.



Achnanthidium minutissimum (vänster) och *Tabellaria flocculosa* (höger), två vanliga kiselalgstaxa som minskar, respektive ökar, i vattendrag i norra Sveruge.

Slutsatser databaser

De senaste årens ansträngningar av såväl nationell datavärd SLU som länsstyrelser och enskilda andra vattenförvaltare att lägga in alla kiselalgsdata i Miljödata MVM verkar ha lett till en ganska komplett datasamling av alla tagna kiselalgsprover i Sverige, även om det fortfarande kompletteras och äldre data kvalitetssäkras. Detta är bra eftersom det möjliggör större analyser av hela Sverige. Dessutom tycker jag att både VISS och Sveriges vattenmiljö är värdefulla webbplatser som samlar och tillgängliggör data som finns i Miljödata MVM. VISS fokuserar på att visa tillstånd och status, medan Sveriges vattenmiljö fokuserar på trender. Genom expertis som arbetar med dessa webbplatser görs miljöövervakningen i Sverige både offentlig och tillgänglig. Dessutom kvalitetssäkras resultaten på bästa sätt.

Tyvärr finns inte alla framtagna data på dessa webbplatser och användaren har ingen chans att förstå att urvalet hen ser inte är fullständigt, eller varför och vilka data som fattas. Jag tycker fortsatta ansträngningar bör göras för att synliggöra fler påväxt-kiselalgsdata på dessa webbplatser. Framför allt borde provtagningen i de långa tidsserierna fortsätta för att möjliggöra bättre tidsserieanalyser i Sveriges vattenmiljö, där är dataunderlaget särskild klent, och många provtagningar har redan lagts ner i brist på finansiering. Till exempel har provtagningen inom IKEU krympt (Integrerad kalkningseffektuppföljning). Det vore verkligen intressant att kunna följa trenden i de vattendrag i norra Sverige som visar en tydlig förändring i kiselalgsstruktur utan att en tydlig orsak kan hittas i nuläget. Kanske kan klimatförändringen spela en roll? Sist men inte minst är dataunderlaget för organismgruppen kiselalger liten i jämförelse med fisk, bottenfauna och växtplankton. Kiselalgssamhället är minst lika artrikt som växtplanktonsamhället och skulle kunna användas mycket mera vid modellering av förändringar i mångfald, till exempel i vattendrag där växtplankton inte kan användas.

Kiselalger i sjöar

Kiselalgsmetoden och klassificeringssystemet för ekologisk status har utvecklats för vattendrag. Under senare år har det undersökts om och hur metoden kan användas även i sjöar. Vi har i Sverige visat att samma metod och klassificering kan användas i både sjöar och vattendrag (Kahlert and Gottschalk, 2014), och sedan 2018 är metoden fullt implementerad som standardmetod i miljöövervakningen (Havs- och vattenmyndigheten, 2018). Sedan många år har växtplankton varit den primärproducent som har studerats i sjöar. En generell styrka som påväxt-kiselalgsmetoden har gentemot växtplankton är att provtagningen är enklare eftersom det inte behövs någon båt och att det räcker med en insamling per år. Analyskostnaden för ett prov är ungefär densamma, men totalkostnader kan också bli mindre när växtplankton måste tas flera gånger per år för att upptäcka algblomningar, medan kiselalger alltid bara tas en gång per år.

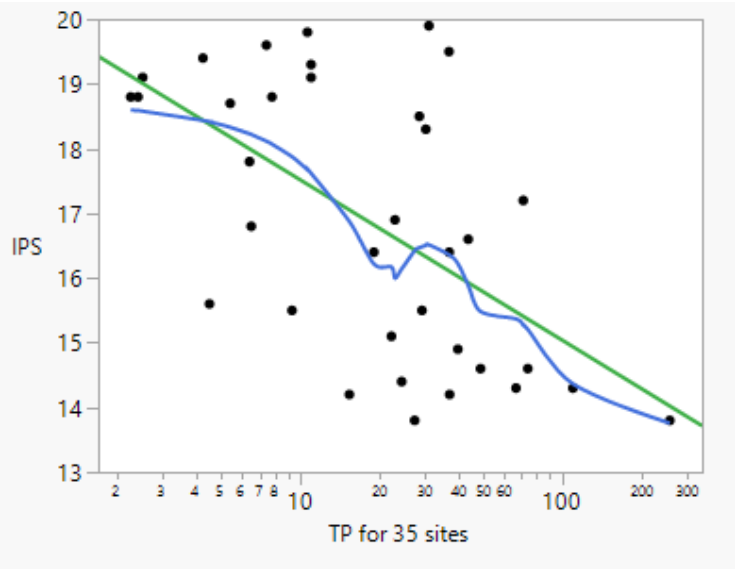
Nackdelen med att bara analysera påväxt-kiselalger är att man inte får någon bild av eventuella algblomningar.

Denna rapport undersöker för första gången hur bedömningsgrunderna för kiselalger fungerar i svenska sjöar och var förbättringsbehov finns. För att få ett objektivt mått undersökte jag responsen av IPS-indexet enbart på totalfosfor eftersom det inte finns några sammanställda data för annan påverkan som IPS kan indikera, främst organisk belastning.

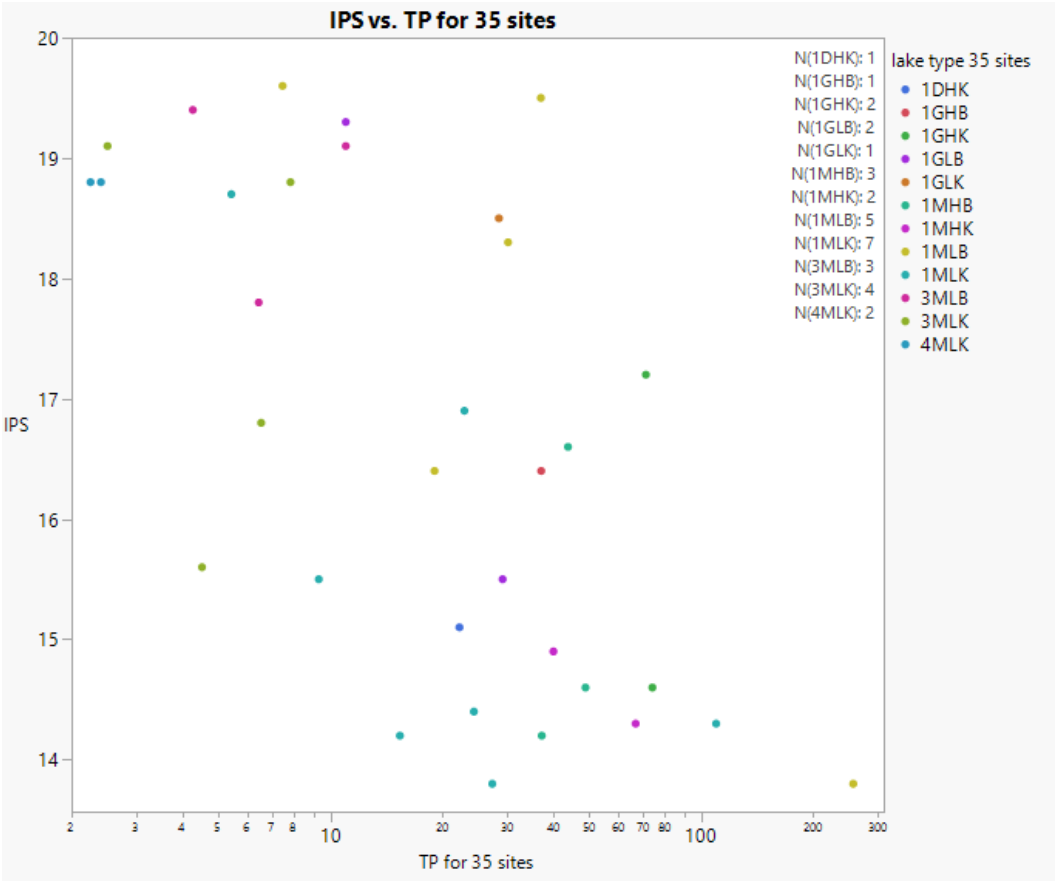
35 sjöar fanns inlagda i Miljödata MVM med data för både kiselalger och vattenkemi. Vi tog fram sjötyp ur VISS där typindelningen följer HVMS 2017:20 (Havs- och vattenmyndigheten, 2017) och omfattar fyra ekoregioner, tre djupklasser, två alkalinitetsklasser och två färgklasser. För varje station togs även avrinningsområdets markanvändning fram. För vattenkemi beräknades årsmedelvärden och i de fall det fanns data från flera år valdes år 2016 eller närmaste året. I de flesta fall togs vattenkemin samma år som kiselalgerna. I de fall där olika år har tagits valdes de åren som hade minst tidsavstånd mellan vattenkemi och kiselalgsprovtagning. Vi testade även hur många av sjöarna som kunde räknas som referensvatten genom att använda samma referensfilter som i tidigare undersökningar (Lindegarth et al., 2016, Table 5.1), det vill säga med andel jordbruksmark i avrinningsområdet < 10%, < 1% artificiell markanvändning (t.ex. stadsmiljö, vägar, järnvägar), och ingen försurning. Bara 5 sjöar klassades som referens med denna metod. Vi beräknade även övergödningen av sjöarna enligt nuvarande bedömningsgrunder (Bedömningsgrunder för ytvattenförekomster HVMFS 2019:25, ekvation2 utan turbiditet) och det nya förslaget till regressionsformel och klassning (Fölster et al., 2021). Näringspåverkan klassades sedan utifrån kvoten mellan dessa referensvärden och uppmätta värden av totalfosfor.

Samband mellan IPS och totalfosfor i ekoregioner och sjötyper

IPS sjunker som förväntat med totalfosforhalten (Figur 5) och följer samma responskurva (logaritmiskt samband) som hittats tidigare (Kahlert & Gottschalk 2014). Sambandet är dock svagare än i den tidigare studien, där fler sjöar ingick (n=100), vilka även var fördelade mera jämnt över hela Sverige. Vi hittar ingen tydlig skillnad i IPS-respons mellan olika ekoregioner och sjötyper (Figur 6) men dataunderlaget är för tunt för en sådan analys. Angående ekotyper så ligger hela 24 av de 35 sjöarna i region 1 (södra Sverige), ingen i region 2, sju i region 3 (norra Sverige inland) och två i region 4 (fjäll). Höga IPS-värden som indikerar hög ekologisk status återfanns i alla tre tillgängliga ekoregioner (Figur 6). De undersökta sjöarna tillhörde 12 olika av de potentiellt 48 sjötyperna. Typ MLK (medeldjup, låg alkalinitet, klar) i region 1 är vanligast (7 sjöar), näst vanligast är MLB (medeldjup, låg alkalinitet, brun) i samma region (5 sjöar). På grund av det låga antalet sjöar i studien är det inte meningsfullt att analysera skillnader i sambandet mellan IPS och totalfosforhalt mellan sjötyperna men både höga IPS-värden (> 18,5) och låga (< 14) hittades i båda sjötyperna (Fig. 6).



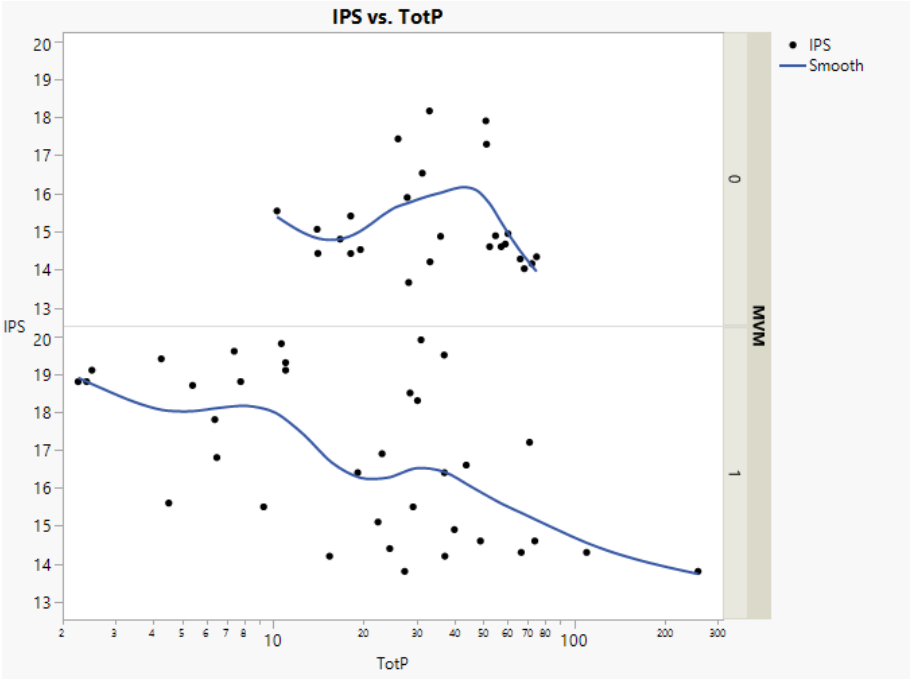
Figur 5. IPS mot totalfosforhalt (TP) i 35 svenska sjöar. Blått: flexibel (smooth) kurvanpassning, grönt: logaritmisk kurvanpassning (IPS = 20 – 1,1*Log(PT µg/l), r^2 = 0,34).



Figur 6. IPS mot totalfosforhalt (TP) i 35 svenska sjöar indelade i sjötyper, som inkluderar ekoregionerna (enligt HVMS 2017:20).

Pilotprojekt i Stockholms län

Merparten av de 35 sjöarna kom från ett pilotprojekt i Stockholms län. Jag använde deras väldokumenterade resultat för att leta efter orsaker till den relativt stora variationen av IPS-responsen till totalfosforhalten (Figur 7). Utföraren (Medins AB) har i sina rapporter föreslagit att detta kunde bero på att artsammansättningen var lite annorlunda än för vattendrag (Sundberg, 2017a, b). Eftersom kiselalgsindex traditionellt har utvecklats och använts i vattendrag har där de flesta stora osäkerheter redan fått uppmärksamhet och på något sätt blivit lösta, medan detta arbete först måste göras för sjöar. Utföraren anmärkte att dels var vissa arter svåra att identifiera och därför identifierades de på släktesnivå vilket ger något osäkra värden på ekologi och index. Vidare anmärktes att man borde undersöka ifall indexvärden för vissa arter behöver revideras, arter som kan vara vanliga i sjöar men som inte är vanliga i vattendrag och därför hittills inte fått uppmärksamhet.



Figur 7. Samband mellan IPS (1–20) och totalfosfor (µg/l) i Stockholms sjöar (övre panel) och hela landets sjöar (nedre panel), det senare inkluderar 14 av sjöarna från övre panel. (Linjen visar en utjämnad kurvanpassning" baserad på flytande medelvärde).

En genomgång av Stockholms läns kiselalgsrapporter och bakgrundsmaterial visade utöver kiselalgsidentifieringen flera andra faktorer som borde undersökas närmare angående deras inverkan på IPS-responsen till totalfosfor. Lokala faktorer, både vattenkemi och fysikaliska störningar, men också kalkhalten skulle kunna vara orsaken till den observerade stora variationen kring medelvärdet av IPS-responsen. Just kalkhalten har nämnts tidigare av flera länsstyrelser som möjlig orsak till att klassningen av den

ekologiska statusen inte stämde överens med deras analyser av övergödningen. Det är nog också av stor vikt att välja en provtagningsplats som är representativ för hela sjön, framförallt när man jämför med kemiprovtagningen som oftast tas i sjöns centrala del. Alternativt, om man är intresserad av vattenkvaliteten hos en viss lokal, att man då även tar vattenkemiprov på samma ställe för att säkerställa att man även har kemidata för lokalen. Det är ju möjligt att det finns lokala skillnader beroende på påverkan. Badplatser till exempel, kan vara direkt olämpliga som provtagningslokal.

Vid en närmare granskning av de olika sjöar i Stockholms län fanns det vissa där den ekologiska statusklassningen med IPS stämde bra överens med den kemiska klassningen av övergödningen, och andra där IPS-klassningen inte matchade. Som tidigare nämnd så ska detta inte heller vara fallet fullt ut, eftersom IPS inte bara speglar övergödning. Men frågan uppstår ändå varför IPS i vissa sjöar inte speglade den genomsnittlig förväntade fosforhalten. Jag har gått igenom artsammansättningen av dessa sjöar, jämfört med tidigare undersökningar samt granskat kartmaterialet för att hitta möjliga förklaringar. Jag kunde i de flesta fall inte hitta en förklaring i artsammansättningen. De arter som förekom i något högre tal, och därmed hade största betydelse på IPS-värdet, hade i de flesta fall inte en osäker ekologi eller var svårbestämbara. När sådana arter ändå fanns vid en provtagning ena året så fanns dock en annan artsammansättning ett annat år på samma plats, utan arter med osäker ekologi, som bekräftade IPS-värdet som robust båda år. Möjligtvis var problemet provtagningsplatsen, som kanske inte i alla fall var representativt för hela sjön, och därav inte speglade vattenkemin, där provet alltid togs i centrala delar av sjön. Det kan finnas lokal påverkan som kiselalgerna reagerade på. Till exempel har det visat sig att det alltid finns flera/andra makrofytarter där än i resten av sjön (Eva Herlitz, personligt meddelande), vilket tyder på att badplatser, som användes som provtagningslokaler i några av fallen, är olämpliga för kiselalger. I ett annat fall fanns ett minikraftverk i närheten som reglerade nivån i sjön.

I något fall så fanns det dock arter med osäker ekologi eller var svårbestämda, och där indexvärden därav troligtvis är något osäkert. En osäkerhetsfaktor är nog när artkomplexet *Achnanthidium minutissimum* dominerar. Denna komplexet har visat sig innehåller många olika arter och deras olika ekologiska preferenser är fortfarande under utredning. Möjligtvis innehåller komplexet okända arter som inte passar vår indelning av komplexet i olika grupper indelade efter medelbredd. Andra kandidater för en närmare undersökning av ekologiska preferenser och taxonomin är arter inom släktena *Encyonopsis*, *Staurosira*, samt *Aulacoseira ambigua* och taxonkomplexet *Gomphonema pumilum*.

En återkommande kommentar för Stockholms sjöar var att de alla är mer eller mindre kalkrika och kan jämföras med vatten på Gotland. Det vore angeläget att utvärdera sambandet mellan IPS och totalfosfor på ett större dataurval där många fler kalkrika vatten ingår än när IPS kalibrerades för

Sverige. Då kunde man även utreda ifall artspecifika indexvärden ska revideras, eller om kalkrika vatten borde ha andra referens- och tröskelvärden.

Slutsatser sjömetoden

Undersökningen visar att metoden för påväxt-kiselalger som förväntat visar ungefär samma IPS-respons till totalfosforhalter i sjöar som i vattendrag, om än med ganska stor variation. Underlaget för undersökningen, 35 sjöar, var dock litet och med en skev geografisk fördelning. En större undersökning där även lokala förhållanden ingår borde göras för att förstå om sambandet mellan IPS och näringsämnen är annorlunda i sjöar i kalkrika områden, eller om andra faktorer som lokal vattenkemi eller störningar, eller osäkra taxonomiska analyser och indexvärden är orsaken till det sämre sambandet än vad man hittar i vattendrag. För en sådan undersökning krävs inte bara välfyllda och digitalt inmatade och sammanställda lokalprotokoll, vilket tyvärr inte ingår i dagens datavärdskap. Utan det behövs även en vilja från vattenförvaltare i hela landet att bidra med provtagningar i sjöar från hela landet, en bedrift som måste uppmuntras med finansiering. En möjlighet är att knyta kiselalgsprovtagning till redan existerade provtagning av andra organismer, vilket skulle sänka provtagningskostnaderna rejält. Kiselalgstaxa vars ekologi i sjöar borde undersökas närmare är framför allt *A. minutissimum, Psammothidium oblongella* och arter inom släktena *Encyonopsis* och *Eunotia*.

Litteraturlista

de Wit, H.A., Valinia, S., Weyhenmeyer, G.A., Futter, M.N., Kortelainen, P., Austnes, K., Hessen, D.O., Räike, A., Laudon, H., Vuorenmaa, J., 2016. Current Browning of Surface Waters Will Be Further Promoted by Wetter Climate. Environmental Science & Technology Letters 3, 430-435.

Fölster et al., 2021. Förslag till bedömningsgrunder för totalfosfor i sjöar och vattendrag. SLU, Vatten och miljö: Rapport In Prep.

Fölster, J., 2021. Underlag till fördjupad utvärdering av miljömålet Bara naturlig försurning 2022: Tillstånd och trender i sjöar och vattendrag. Rapportering till Naturvårdsverket enligt överenskommelse 252-21-002. Institutionen för vatten och miljö, SLU, p. 10.

Havs- och vattenmyndigheten, 2017. Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter om kartläggning och analys av ytvatten enligt förordningen (2004:660) om förvaltning av kvaliteten på vattenmiljön, Havs- och vattenmyndighetens författningssamling, Göteborg, p. 16.

Havs- och vattenmyndigheten, 2018. Kiselalger i sjöar och vattendrag. Vägledning för statusklassificering, Havs- och vattenmyndighetens rapport, Göteborg, p. 18.
Kahlert, M., 2011. Framtagande av gemensamt delprogram ”Kiselalger i vattendrag” : Underlag för utformning av övervakningsprogram och verifiering av kiselalgsindex, Länsstyrelsens rapporter, Karlskrona, p. 62.
Kahlert, M., Gottschalk, S., 2014. Differences in benthic diatom assemblages between streams and lakes in Sweden and implications for ecological assessment. Freshwater Science 33, 655-669.
Kahlert, M., Pansar, J., 2015. Kiselalger i vattendrag : Utvärdering av det gemensamma delprogrammet, Länsstyrelsegemensamma rapporter, p. 26.
Lindegarth, M., Carstensen, J., Drakare, S., Johnson, R., Nyström Sandman, A., Söderpalm, A., Wikström, S.A., 2016. Ecological Assessment of Swedish Water Bodies; development, harmonisation and integration of biological indicators. Final report of the research programme WATERS., in: M, L., J, C., S, D., RK, J., A, N.S., A, S., A, W.S. (Eds.), WATERS report. Havsmiljöinstitutet, Sweden.
Miljödata-MVM, 2021. Sveriges lantbruksuniversitet (SLU). Datavärdskap sjöar och vattendrag, samt Datavärdskap jordbruksmark,.
Sundberg, I., 2017a. Kiselalger i Stockholms län 2017. En undersökning av 13 sjöar.
Sundberg, I., 2017b. Kiselalger i Stockholms län 2017. En undersökning av 13 vattendragslokaler.
Sveriges vattenmiljö, 2021. Från källa till hav. .
VISS (VattenInformationsSystem Sverige), 2021. En databas som har utvecklats av vattenmyndigheterna, länsstyrelserna och Havs och vattenmyndigheten. VISS förvaltas idag av Länsstyrelsen i Jönköping.

eDNA-teknik för kiselalgsanalys

Vad är eDNA-metoder?

eDNA kommer från engelskans ”environmental DNA”, och kan översättas till ”miljö-DNA” på svenska. Begreppet ”eDNA” beskriver den cocktail av olika organismers ”genetiska material som erhålls direkt från miljöprover (vatten, mark, luft etc.) utan några uppenbara tecken på biologiskt källmaterial” (definition enligt Taberlet et al. (2012)). eDNA är alltså en blandning av både dött material (som urin, avföring, slem, fiskfjäll eller fritt flytande DNA) och levande mikroorganismer (som alger, bakterier eller småkryp), och kan tas som vattenprov (som innehåller låga koncentrationer eDNA) eller som t.ex. sediment- eller biofilmprov (med vanligtvis högre eDNA-koncentration).

2003 publicerades nyckelstudien som använder en del av DNA, en så kallad markör, för att identifiera arter molekylärt, detta kallas för streckkodning, på engelska barcoding (Hebert et al., 2003). Sedan dess har metoden utvecklats snabbt, och gör det fortfarande. Man skiljer i princip mellan två metoder: Man kan använda en enda artspecifik markör för att söka efter en specifik målart, eller så analyserar man alla streckkoder av en organismgrupp (t.ex. fisk) i ett prov för att få gruppens artsammansättning, så kallad metabarcoding. Den största fördelen med den första metoden är att den vanligtvis är mera känslig, och även kan göras kvantitativt, medan den andra metoden är mindre känslig för att upptäcka enskilda arter och bara är semikvantitativ. Å andra sidan kan den metoden upptäcka många arter på en gång.

Metoden går till så att man först extraherar all DNA ur provet, och sedan fäster en så kallad primer, en kort enkelsträngad DNA-sekvens, som primer-par precis innan och precis efter markören för att bestämma att just detta avsnitt ska multipliceras (= amplifieras) med en teknik som heter PCR (Polymerase chain reaction. En metod som använder temperatur och enzymer i repeterbara cykler för att masskopiera specifika delar av DNA). Eftersom man inte använder all DNA för identifiering, utan bara korta och helst artspecifika avsnitt, markörer, är urvalet av dessa essentiellt: Markörerna ska helst vara artspecifika, alltså skilja mellan arter och därför vara variabla, men å andra sidan måste primers också kunna fästa vid dem för att de alls ska kunna användas, vilket kräver att det finns ganska konservativa, alltså lika, DNA-avsnitt precis före och efter markören. Denna ekvation är inte helt lätt att få ihop, och är orsaken till att det idag finns ganska många markörer, och även primers, att välja emellan. Vanligtvis måste man välja mellan metoder som kan hitta många taxa samtidigt, men till kostnad av en sämre separation mellan arter (generella primers/metoder), och metoder som har bättre upplösning mellan arter, men där å andra sidan

många taxa inte alls hittas eftersom primerparen inte fäster vid deras markörer. Olika markörer och primers skiljer alltså olika bra mellan arter och det är därför mycket viktigt att ange vilken metod som använts vid en eDNA-studie. Efter PCR bereds proverna för sekvensering, vilket idag vanligtvis görs på en pool av flera prover samtidigt för en snabbare analys.

Resultaten från sekvenseringen måste först rensas för att få fram en kvalitetsgranskad lista av markörsekvenser, vilka i sin tur sedan kan matchas mot referenssekvenser från databaser för att få fram artnamn. Hela den processen kallas också bioinformatik-pipeline, en serie av algoritmer för att sortera korrektsekvenserade markörer till de olika proverna inom en pool, och för att få fram artnamn. Även dessa pipelines och de använda referensdatabaserna har ett stort inflytande på resultaten, alltså artlistorna, så det är mycket viktigt att ange vilken pipeline och vilken referensdatabas samt vilka versioner av dessa, som har använts vid en undersökning för att kunna förstå vilka steg som har tagits för att nå slutresultatet.

Den föreliggande rapporten fokuserar på denna identifiering av arter genom (meta)barcoding. Det finns i dagsläget en uppsjö av andra molekylära metoder, och många fler är under utveckling, men en beskrivning av alla skulle spränga ramarna för denna rapport. Streckkodning är i nuläget den metod som har utvecklats längst för att identifiera arter, genom att utveckla och testa fungerande DNA-markörer och primers, genom att fylla på med referenssekvenser i referensdatabaser, genom att utveckla bioinformatik-pipelines, och på senare tid även genom analyser om metodernas osäkerhet, t.ex. av olika provtagningsmetoder och -strategier. Molekylära metoder kan dock användas för mycket mer än bara artidentifiering. Man kan t.ex. utveckla bedömningssystem helt utan artnamn eller leta efter funktionella gener. Man kan leta efter genetisk variation inom och mellan populationer och även skilja ut individer. Men eftersom rapportens fokus ligger på art- och habitatdirektivet är det identifiering av den biologiska mångfalden som är fokus, och där är streckkodning den molekylära metod som i det närmaste har kommit att bli en rutinmetod.

eDNA i miljöövervakning av sjöar och vattendrag

För att uppfylla kraven inom vattendirektivet (WFD) har mycket utvecklingsarbete av eDNA-metoder för akvatisk miljöövervakning utförts inom ramen för COST-projektet DNAqua-Net CA15219 (Leese et al., 2016). Syftet med WFD är att uppnå god ekologisk status i bland annat vattendrag och sjöar. WFD baseras på idén att en god ekologisk status betyder att vattenlevande organismer är relativt ostörda av människans påverkan, och för att analysera detta kräver WFD att vissa taxonomiska organismgrupper (fisk, makroinvertebrater, makrofyter, påväxtalger och växtplankton) ska övervakas (European Parliament and Council, 2000). En uppsjö av metoder har utvecklats och interkalibrerats inom Europa för att möta detta krav, och dessa metoder är alla baserade på förekomst och/eller abundans av utvalda

taxonomiska grupper (Birk et al., 2012). Om man utgår från idén att eDNA i princip bara ska ersätta morfologisk identifiering av akvatiska taxa med en molekylär identifiering är huvudfrågan hur jämförbara de resulterande artlistorna är. Man behöver identifiera orsaker till skillnaderna samt eliminera dem om man ska kunna använda sig av befintliga index och bedömningar. Eftersom streckkodningens essens från början är just att identifiera arter har mycket arbete redan lagts ner för att utveckla metoder som hittar specifika arter, samt att jämföra morfologisk med molekylär artidentifiering inom metabarcoding. Resultaten av dessa jämförelsestudier beror dels på organismgrupp i fråga, dels på utvecklingen av tekniken (Bohman, 2018; Pawlowski et al., 2018). Fisk har pekats ut som en särskilt lämplig organismgrupp att använda eDNA-tekniken för, eftersom eDNA kan ersätta dyra och dödande metoder och det dessutom finns ganska fullständiga referensdatabaser (Hering et al., 2018). Den främsta nackdelen är att eDNA-tekniken inte återger fiskabundans, så man måste anpassa index till enbart förekomstdata. Fiskålder kan inte heller mätas med eDNA. Även kiselalger och makroinvertebrater har pekats ut som lämpliga för eDNA-metoder. Här är främsta utmaningen att komplettera referensdatabaser samt eventuellt anpassa index (Hering et al., 2018). Kiselalgsindex har dock visat god överenstämmelse mellan eDNA och morfologiska data (Pawlowski et al., 2018). För plankton är identifiering till art en större utmaning eftersom plankton innehåller många olika taxonomiska grupper, och många index är dessutom baserade på abundans, vilket inte bara betyder att många fler referensbibliotek måste kompletteras och index anpassas, utan att det även är osäkert vilken eDNA-analys som ska användas, det vill säga på vilken taxonomisk nivå för att uppnå bästa resultat (Hering et al., 2018). För makrofyter verkar eDNA-metoder vara olämpliga (Hering et al., 2018).

Själva idén med att införa eDNA i miljöövervakning baseras på antagandet att dessa metoder är snabbare, kostnadseffektivare, genererar bättre jämförbarhet av resultat mellan olika studier och öppnar nya möjligheter för miljöövervakning till exempel genom att identifiera taxa där det tidigare inte varit möjligt (Hering et al., 2018; Leese et al., 2016). Att vidareutveckla nuvarande metoder involverar dock politiska frågor utöver de praktiska, t.ex. om det alls är möjligt att anpassa vattendirektivets krav till eDNA-resultat, eller hur jämförbara eventuellt nya index och bedömningar är med de redan interkalibrerade metoderna inom Europa, och hur en europeisk interkalibrering av nya eDNA-metoder skulle gå till (Hering et al., 2018; Pawlowski et al., 2018). Denna option innehåller dessutom den mera filosofiska frågan ifall det är viktigt eller nödvändigt att man kommer fram till artnamn, eller om man kan nöja sig med en lista av siffror som representerar olika taxa utan att man vet deras specifika namn (kombinationer av listor med artnamn och siffra för okända sekvenser, kanske identifierad till en högre hierarki, är såklart möjliga). Det är potentiellt enklare att införa eDNA för miljöövervakning där metoderna

ännu inte är etablerade, men det kräver i stället mera utvecklingsinsatser eftersom allting måste göras från grunden.

Även i Sverige är många parallella aktiviteter på gång för att testa och utvärdera eDNA-metoder för miljöövervakningen, men det är inte lätt att få en överblick över vad som pågår eller har rapporterats. Det är en fördel om det finns plattformar där öppet kunskapsutbyte kan ske så att tiden för misstag minimeras och möjligheten att lära sig från andra projekt maximeras. Till exempel ger Bohmans (2018) rapport en bra överblick över möjligheter att spåra fisk, kräftor och musslor i sötvatten med hjälp av vattenprover, och den skrevs just för att sprida kunskap om eDNA, med ett pilotprojekt om dessa organismer. Hovmöller et al. (2017) redovisar resultaten från ett utredningsuppdrag finansierat av Naturvårdsverket gällande förutsättningarna för DNA-streckkodning av svensk fauna och flora inom miljöövervakning. Rapporten har fokus på uppbyggande av referensbibliotek genom användning av organismmaterial som finns sparat på museer. Nätverket Swebol (SweBOL, n.d.) skulle kunna koordinera nationella initiativ när det gäller DNA-streckkodning och olika tillämpningar, och fokuserar i nuläget på informationsspridning om potentialen i DNA-streckkoder för att inspirera till användning av dessa. Mycket praktiskt arbete att organisera workshops där informationsspridningen och möten mellan forskare och förvaltare samt användare inom miljöövervakningen kan ske har gjorts av EDNA, ett öppet forum där forskare och avnämare kan diskutera hur metoderna kan användas inom miljöövervakning och forskning, med fokus på fördelarna av samarbete (EDNA, 2019). Konkreta eDNA-projekt finansieras under perioden 2019–2021 av Naturvårdsverket, åtta forskningsprojekt pågår som ska bidra till att utveckla DNA-metoder som kan användas inom den nationella miljöövervakningen (Naturvårdsverket 2020b). Bland annat är flera universitet, företag och institutioner som Naturhistoriska riksmuseet och SMHI aktiva i projekten. Även Havs- och vattenmyndigheten är involverat i denna satsning. Översikten som HaV presenterar om eDNA (Havs- och Vattenmyndigheten, 2019) visar att intresset främst ligger på övervakningsmetoder för främmande arter. En stor nordisk konferens organiserades 2020 av Naturvårdsverket och Havs- och vattenmyndigheten med målet att utbyta information om pågående satsningar inom eDNA för miljöövervakning inom de nordiska länderna (Naturvårdsverket 2020a). Nästa workshop där forskare och användarna kan lära av varandra är redan planerad inom ramen för avslutningskonferensen av DNAqua-net. Fler projekt och även rapporter som ska hjälpa till att praktiskt komma närmare målet om harmoniserade metoder och rutiner är på gång, se även avsnitt ”eDNA-metoder för olika organismgrupper – pågående utvecklingsarbete”.

eDNA-metoder för olika organismgrupper – pågående utvecklingsarbete

Kiselalger

För organismgruppen kiselalger finns ett informellt europeiskt samarbete mellan flera forskargrupper som strävar efter att utveckla en enda harmoniserad metod för användning av eDNA i akvatisk miljöövervakning, och Sverige är ett av de medverkande länderna som bidrar med utveckling av metoden för sötvatten med Maria Kahlert som aktör. Ingen svensk marin kiselalgsforskare inom eDNA-forskning medverkar, varken i detta arbete eller i COST-nätverket DNAqua-Net. Forskargruppen eftersträvar ett tätt samarbete med myndigheterna och miljöövervakarna, och att metoden ska vara så praktisk och kostnadseffektiv som möjligt.

Provtagning

I denna anda har vi enats om att använda oss av den väletablerade CEN-standarden för provtagning av kiselalger som redan existerar, är mycket beprövad och används i de flesta europeiska länderna (CEN, 2014). Vi har begärt att få standarden anpassad så den även inkluderar eDNA-provtagning, och kommer att hjälpa till som nationella CEN-experter med omformuleringen. Dessutom kommer vi att inkludera resultat från ett pågående projekt som testar om standardkonserveringsmedlet alkohol är lämpligt även för eDNA-provtagning. Sverige är med i projektet, och ett nordiskt prov (från Finland) är del av studien. De första resultaten visar att andra konserveringsmetoder är bättre för att bevara DNA än alkohol, men att DNA-degraderingen är försumbar när alkohol med en hög koncentration används och provet inte sparas längre än tre månader (Anges Bouchez, pers. med.). Tidigare projekt i flera länder, bland annat Sverige (Bailet et al., 2019), har dock redan visat att mängden och kvaliteten av DNA i ett rutinmässigt taget prov är tillräcklig för att streckkodning ska kunna utföras med bra resultat (Pawlowski et al., 2018), även om det är möjligt att mängden och kvaliteten av DNA kan vara ännu bättre med andra konserveringsmetoder.

Arbetsflöde i laboratoriet (från råprovet till sekvenser)

DNA-extraktion

DNA-extraktion från kiselalgsprover kan göras med många olika metoder, och det finns test om vilka som fungerar bäst eller är kostnadseffektivast. Svaret är inte helt självklart, och extraktionsmetoderna har visat sig ha betydelse för resultaten av artlistorna (Vasselon et al., 2017). För Sveriges del bör det övervägas att alltid använda en metod som är anpassad för förekomst av humusämnen eftersom humusämnen är vanliga i svenska vatten och de stör DNA-extraktionen och PCR när andra extraktionsmetoder används.

Markörer & PCR

Kiselalgssamarbetsgruppen har enats om att arbeta parallellt med två olika DNA-markörer för streckkodning: rbcL, som finns i kloroplasten och mitokondriernas 18S. Dessa markörer har visat sig kunna separera sötvattnets fastsittande kiselalger som används i miljöövervakning på artnivå (Kermarrec et al., 2013; Zimmermann et al., 2011). I arbetet med att komplettera referensdatabaser tas oftast hela rbcL-sekvensen på 1440 bp (baspar) fram. För 18S (~1800 bp) har dock på senare tid ofta bara V4 regionen (~400 bp) tagits fram, eftersom det är den regionen som används i metabarcodinganalyser. För rbcL används inte heller hela sekvensen, utan bara en markör som är av ungefär samma längd som V4 i 18S. Metoden har utvecklats parallellt i Frankrike och i Storbritannien, men metoderna är inte är helt jämförbara eftersom länderna använder olika primers som fäster på lite olika ställen. Det pågår en diskussion om att enas om den franska markören och de tre primerpar som används för att få fram det bästa resultatet av denna. Schweiz, som är ett av de länderna som har kommit längst, har nyligen gått över till denna metod eftersom deras nationella jämförelse visade att de resultaten blev bättre (J. Pawlowski, pers. med.). Flera europeiska länder har dessutom använt lite olika sätt att analysera (kemikalier, PCR-inställningar mm.), och i nuläget pågår ett europeiskt ringtest för att testa vilken av alla använda primers och laboratoriemetoder som ger det bästa resultatet. Sverige deltar i ringtestet. Parallellt med detta arbete pågår ansträngningar för att upprätta en CEN-standard, alternativt en teknisk rapport för att få till en harmoniserad beskrivning av laboratoriemetoden. Som underlag för detta arbete, som leds av Frankrike, har en sammanfattning av resultat och erfarenheter gjorts. Tyvärr har Corona-pandemin fördröjt arbetet och publiceringen är inte klar.

Sekvensering

I nuläget är standardsekvenseringsinstrumentet för kiselalger Illuminas MiSeq, men även HiSeq-metoden har börjat användas. Proverna som är resultaten från PCR måste först förberedas och poolas för sekvensering, detta kallas att bygga bibliotek. Även för detta finns olika metoder. De flesta forskargrupper sekvenserar inte längre själva utan skickar i väg resultaten från PCR-analyserna till externa sekvenseringslaboratorier. I samband med att nya sekvenseringstekniker tas fram ändras även möjligheter för sekvenseringen. Man kan till exempel med en ny teknik från PacBio Sciences sekvensera längre fragment än med Illuminas tekniker, bland annat hela rbcL-markören och inte bara en kortare del. Detta ökar möjligheten att skilja mellan arter men metoden är ännu inte tillräckligt färdigutvecklad för kiselalger för att den ska kunna tas i bruk i streckkodningssyfte.

Arbetsflöde bioinformatik (från sekvenser till artlistor)

Referensbibliotek

Komplettering av referensbibliotek för kiselalger pågår, bland annat inom FRESHBAR, ett av de åtta nationella streckkodningsprojekt som stöds av NV och Havs- och vattenmyndigheten (Kahlert, 2020). FRESHBAR har som långsiktigt mål att främja implementering av metoden för nationell miljöövervakning. Framtagna referenssekvenser kommer att läggas till i referensdatabasen Diat.barcode som den europeiska kiselalgsarbetsgruppen har enats om att samarbeta kring (=kurera, kvalitetssäkra) (Rimet et al., 2019). Referensbibliotek som innehåller artnamn och tillhöriga sekvenser är bara så bra som artidentifieringen varit när arten infogades i biblioteket, därför är det mycket viktigt att kiselalgsforskare med kunskap om taxonomi samarbetar för att kurera en databas, så att artnamn stämmer. Förutom att det finns många problematiska taxakomplex där identifieringen är komplicerad, pågår två parallella revideringar av kiselalgstaxonomin: En där museer går igenom gamla preparat och beskrivningar och korrigerar artnamn (dåtidens mikroskop och metoder för artbeskrivningar matchar inte dagens standard, och ger upphov till många svårtolkade artbeskrivningar), och en där man använder DNA för att upptäcka helt nya taxonomiska samband mellan arter och släkten som tidigare varit okända, och också ofta leder till nya och reviderade arter. Tyvärr samarbetar dessa två forskargrupper inte alltid, vilket ger upphov till nya osäkerheter och diskussioner inom kiselalgstaxonomin. Därför har vi i den europeiska forskargruppen enats om att utveckla Diat.barcode. Till att börja med fokuserar vi på rbcL-markören, och ger varje sekvens ett så korrekt och uppdaterat namn som möjligt med dagens kunskap och med fokus på att kunna använda referensdatabasen i miljöövervakningens syfte. Vi har valt att starta med en egen referensdatabas eftersom andra redan etablerade databaser inte är anpassade för kiselalger, och inte heller är kurerade, eller där vår idé av en öppen, enkel och praktisk kurering inte har varit möjlig. Vi är medvetna om att det inte alltid går att särskilja arter med den korta versionen av rbcL-markören, och i detta fall får beställaren av en matchningsanalys flera artnamn som urval. Vi har en förhoppning om att PacBio-tekniken kommer att göra det möjligt att använda hela rbcL-sekvenserna i metabarcodingen, och därmed kunna skilja mellan de flesta kiselalgsarterna.

Bioinformatik arbetsflöden, och från artlistor till index

Flera forskargrupper har utvecklat pipelines, och tyvärr så påverkar valet av pipeline även slutresultatet, dvs. artlistorna (Bailet et al. 2019). Det är inte heller möjligt att utan vidare använda alla pipelines med vilken referensdatabas som helst, utan de är oftast anpassade till en egen referensdatabas. För användning av Diat.barcode har ett open source-skript (serie av algoritmer) publicerats baserat på open source-mjukvarupaket Mothur (Rimet, 2020), som i nuläget håller på att uppdateras till open

source-mjukvarupaketet DADA2 (Callahan et al., 2016). Hittills har den mesta forskningen ägnats åt att återskapa artlistor och använda dem i redan existerade index (Pawlowski et al., 2018). I Schweiz pågår ansträngningar för att utveckla ett system där man arbetar helt utan artnamn, och i stället använder maskininlärning (artificiell intelligens) för att kalibrera anonyma kiselalgssekvenser till miljödata, t.ex. närsaltshalt i vattnet. Slutresultatet är en ekologisk statusklassning.

eDNA-metod kiselalger– fortsatt arbete

Sammanfattningsvis är harmonisering och standardisering av provtagning, laboratorie- och bioinformatikflöden, samt kurering av referenser pågående, och Sverige borde i möjligaste mån fortsätta att delta i dessa aktiviteter för att säkerställa att svenska behov täcks. Det finns även förslag om hur kiselalgsresultat skulle kunna användas vid bedömning av mindre vattendrag. Det som fattas idag för att kunna använda eDNA från kiselalger i övervakningen rutinmässigt är å ena sidan referensstreckkoder för många arter som är typiska i näringsfattiga respektive sura vatten, alternativt metoder som ger okända streckkoder ett taxonomiskt samband (så att de identifieras till ett taxon med känt indexvärde) eller kalibrerar dem till miljövariabler (så att de får ett direkt indexvärde) för att kunna använda dem i stället. Sverige har börjat stödja detta arbete genom projektet FRESHBAR, genom ett samarbete med andra länder inom Diat.barcode, och även genom att testa en metod som ger okända streckkoder ett taxonomiskt samband (Keck et al., 2018). Detta arbete borde fortsätta.

Å andra sidan är dagens infrastruktur för DNA-extraktion, PCR, sekvensering och bioinformatik inte anpassad till att möta krav från miljöövervakningen. Miljöövervakning har nämligen ingen prioritet i de existerande strukturerna, utan skulle komma att ställas i kö precis som alla andra prover, och i värsta fall bli nedprioriterade när prover av exempelvis humanmedicinska skäl prioriteras upp politiskt (som i dagens Coronapandemi-tester för viruset). Ett ofta förbisett problem är att stora datorkapaciteter krävs för bioinformatiken, men dagens datorkluster är inte anpassade för miljöövervakningen. Dessutom saknas ett system där DNA-data, och DNA-prover sparas rutinmässigt i databaser och provbanker. Själva artlistorna kräver inte mycket datakapacitet, men rådata gör det, eftersom dessa kan innehålla massor med ofiltrerade sekvenser. Råprover för eDNA-analyser av kiselalger kräver plats, och dessutom ventilerade utrymmen eftersom konserveringsmedlet är etanol. Det finns studier på gång som testar att spara proverna på annat sätt, t.ex. genom torkning, men detta kräver behandling av råproverna vilket kostar pengar.

Referenser streckkodning

Bailet, B., Bouchez, A., Franc, A., Frigerio, J.-M., Keck, F., Karjalainen, S.-M., Rimet, F., Schneider, S., Kahlert, M., 2019. Molecular versus morphological data for benthic diatoms biomonitoring in Northern Europe

freshwater and consequences for ecological status. Metabarcoding and Metagenomics 3: e34002.

Birk, S., Bonne, W., Borja, A., Brucet, S., Courrat, A., Poikane, S., Solimini, A., van de Bund, W., Zampoukas, N., Hering, D., 2012. Three hundred ways to assess Europe's surface waters: An almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. Ecological Indicators 18, 31-41.

Bohman, P., 2018. eDNA i en droppe vatten. Vattenprovtagning av DNA från fisk, kräftor och musslor – en kunskapssammanställning. Aqua reports 2018:18. Institutionen för akvatiska resurser, Sveriges lantbruksuniversitet, Drottningholm Lysekil Öregrund. 184 s. .

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature Methods 13, 581-583.

CEN, 2014. EN 13946:2014 Water quality – Guidance for the routine sampling and preparation of benthic diatoms from rivers and lakes CEN.

EDNA, 2019. NÄTVERK ”EDNA”. Swebol.

Elbrecht, V., Taberlet, P., Dejean, T., Valentini, A., Usseglio-Polatera, P., Beisel, J., Coissac, E., Boyer, F., Leese, F., 2016. Testing the potential of a ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects. . PeerJ 4:e1966. https://doi.org/10.7717/peerj.1966.

European Parliament, Council, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Union L327, pp. 1-73.

Havs- och Vattenmyndigheten, 2019. Miljö-dna – övervakningsmetoder för främmande arter i vattenmiljöer. Havs- och Vattenmyndigheten.

Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B Biol Sci 270, 313 - 321.

Hering, D., Borja, A., Jones, J.I., Pont, D., Boets, P., Bouchez, A., Bruce, K., Drakare, S., Hänfling, B., Kahlert, M., Leese, F., Meissner, K., Mergen, P., Reyjol, Y., Segurado, P., Vogler, A., Kelly, M., 2018. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. Water Research 138, 192-205.

Hovmöller, R., Forshage, M., Ronquist, F., 2017. Streckkodning av den svenska floran och faunan – förutsättningar och utmaningar. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2017:1. Naturhistoriska riksmuseets småskriftserie.

Kahlert, M., 2020. FRESHBAR – Barcoding of freshwater organisms for improved assessment of biodiversity. Department of Aquatic Sciences and Assessment SLU, .

Keck, F., Vasselon, V., Rimet, F., Bouchez, A., Kahlert, M., 2018. Boosting DNA metabarcoding for biomonitoring with phylogenetic estimation of operational taxonomic units' ecological profiles. Molecular Ecology Resources 0.

Kermarrec, L., Franc, A., Rimet, F., Chaumeil, P., Humbert, J.F., Bouchez, A., 2013. Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: a test for freshwater diatoms. Molecular Ecology Resources 13, 607-619.

Leese, F., Altermatt, F., Bouchez, A., Ekrem, T., Hering, D., Meissner, K., Mergen, P., Pawlowski, J., Piggott, J.J., Rimet, F., Steinke, D., Taberlet, P., Weigand, A.M., Abarenkov, K., Beja, P., Bervoets, L., Björnsdóttir, S., Boets, P., Boggero, A., Bones, A.M., Borja, Á., Bruce, K., Bursić, V., Carlsson, J., Čiampor, F., Čiamporová-Zatovičová, Z., Coissac, E., Costa, F., Costache, M., Creer, S., Csabai, Z., Deiner, K., DelValls, Á., Drakare, S., Duarte, S., Eleršek, T., Fazi, S., Fišer, C., Flot, J.-F., Fonseca, V., Fontaneto, D., Grabowski, M., Graf, W., Guðbrandsson, J., Hellström, M., Hershkovitz, Y., Hollingsworth, P., Japoshvili, B., Jones, J.I., Kahlert, M., Kalamujic Stroil, B., Kasapidis, P., Kelly, M.G., Kelly-Quinn, M., Keskin, E., Kõljalg, U., Ljubešić, Z., Maček, I., Mächler, E., Mahon, A., Marečková, M., Mejdandzic, M., Mircheva, G., Montagna, M., Moritz, C., Mulk, V., Naumoski, A., Navodaru, I., Padisák, J., Pálsson, S., Panksep, K., Penev, L., Petrusek, A., Pfannkuchen, M.A., Primmer, C.R., Rinkevich, B., Rotter, A., Schmidt-Kloiber, A., Segurado, P., Speksnijder, A., Stoev, P., Strand, M., Šulčius, S., Sundberg, P., Traugott, M., Tsigenopoulos, C., Turon, X., Valentini, A., van der Hoorn, B., Várbíró, G., Vasquez Hadjilyra, M.I., Viguri, J., Vitonytė, I., Vogler, A., Vrålstad, T., Wägele, W., Wenne, R., Winding, A., Woodward, G., Zegura, B., Zimmermann, J., 2016. DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. Research Ideas and Outcomes 2.

Martins, F.M.S., Porto, M., Feio, M.J., Egeter, B., Bonin, A., Serra, S.R.Q., Taberlet, P., Beja, P., 2020. Modelling technical and biological biases in macroinvertebrate community assessment from bulk preservative using multiple metabarcoding markers. n/a.

Meissner, K., J., A., Baattrup-Pedersen, A., Buchner, D., Ekrem, T., Friberg, N., Johnson, R.K., Leese, F., Majaneva, M., Ólafsson, J.S., Schartau, A.K., Elbrecht, V., 2020. Metabarcoding for use in Nordic routine aquatic biomonitoring – a validation study. TemaNord 2020:538 ISBN 978-92-893-6808-0, doi.org/10.6027/temanord2020-538.

Naturvårdsverket 2020a. Documentation – Conference on DNA methods in environmental monitoring and management 8-9 december 2020. Naturvårdsverket.

Naturvårdsverket 2020b. Forskning om DNA-metoder inom miljöövervakning. Naturvårdsverket.

Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apotheloz-Perret-Gentil, L., Beja, P., Boggero, A., Borja, A., Bouchez, A., Cordier, T., Domaizon, I., Feio, M.J., Filipe, A.F., Fornaroli, R., Graf, W., Herder, J., van der Hoorn, B., Iwan Jones, J., Sagova-Mareckova, M., Moritz, C., Barquin, J., Piggott, J.J., Pinna, M., Rimet, F., Rinkevich, B., Sousa-Santos, C., Specchia, V., Trobajo, R., Vasselon, V., Vitecek, S., Zimmerman, J., Weigand, A., Leese, F., Kahlert, M., 2018. The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. Sci Total Environ 637-638, 1295-1310.

Rimet, F., 2020. Diat.barcode: a curated barcoding database. INRAE.

Rimet, F., Gusev, E., Kahlert, M., Kelly, M.G., Kulikovskiy, M., Maltsev, Y., Mann, D.G., Pfannkuchen, M., Trobajo, R., Vasselon, V., Zimmermann, J., Bouchez, A., 2019. Diat.barcode, an open-access curated barcode library for diatoms. Scientific Reports 9, 15116.

SweBOL, n.d. SweBOLs uppdrag. Swebol.

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L., 2012. Environmental DNA. Mol Ecol 21, 1789 - 1793.

Vasselon, V., Domaizon, I., Rimet, F., Kahlert, M., Bouchez, A., 2017. Application of high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding to diatom biomonitoring: Do DNA extraction methods matter? Freshwater Science 36, 162-177.

Zimmermann, J., Jahn, R., Gemeinholzer, B., 2011. Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. Organisms Diversity & Evolution 11, 173-192.

Länsstyrelsen i Stockholm
Rapport 2022:2
Omslag: Kiselalg. Foto: Eva Herlitz.
Utgivningsår: 2022
ISBN: 978-91-7937-138-8