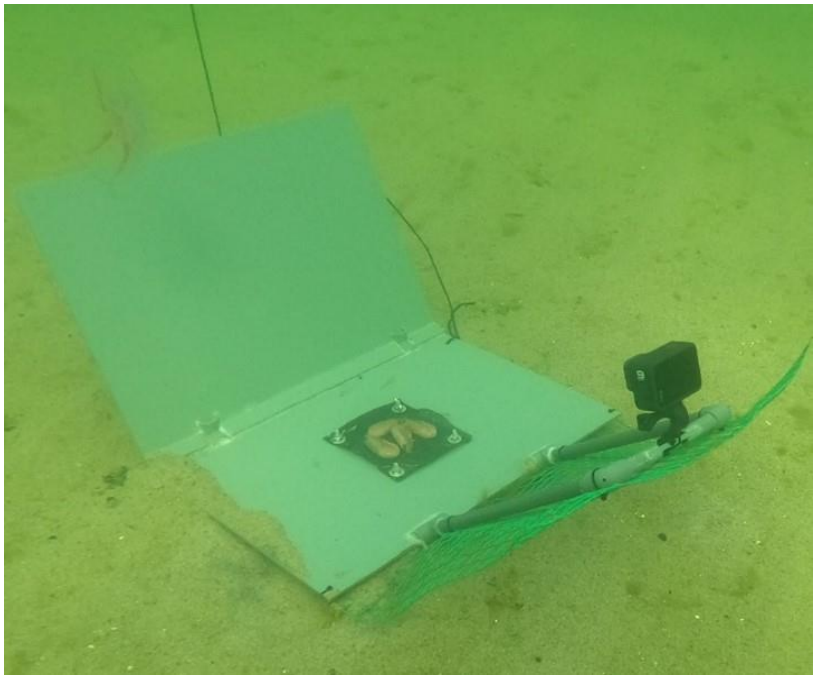
Inventering av svartmunnad smörbult med betade kameror och eDNA runt Gotland



GÖTEBORGS UNIVERSITET

Länsstyrelsen Gotlands län

Titel:	Inventering av svartmunnad smörbult med betade kameror och eDNA
Författare:	Linnéa Svensson, Leon Green och Elida Lundgren
Rapportnummer:	2024:11
Utgivningsår:	2024
Omslagsbild:	Bilder: Linnéa Svensson Illustration svartmunnad smörbult: Jakob Robertsson

Sammanfattning

Den svartmunnade smörbulten (*Neogobius melanostomus*) är en invasiv fiskart som i artdatabankens klassificering av Sveriges främmande arter har tilldelats den högsta riskklassen, klass 5. Arten är (fram tills idag) Sveriges enda marina invasiva fisk och dess utbredning kan påverka både inhemska fiskarter och ryggradslösa djur så som musslor och kräftdjur. Inventering av svartmunnad smörbult är därför önskvärt ur naturvårdssynpunkt, speciellt i miljöer med höga naturvärden, såsom områden med utpekade eller framtida planerade naturreservat. I Gotlands kustmiljöer finns det gott om sådana områden, där även svartmunnad smörbult idag förekommer runt hela ön. Inventering med betade videokameror har visat sig korrelera starkt med både eDNA och provfiske av arten på svenska västkusten.

Både videokameror och eDNA är förhållandevis kostnadseffektiva och skonsamma metoder som kan användas i varierande miljöer, både från land och från båt. Under september 2023 inventerades 11 lokaler i Gotlands län för att undersöka utbredningen av svartmunnad smörbult med betade kameror och eDNA. Undersökningen begränsades till grunda, lättåtkomliga vattenmiljöer i fritidshamnar och badvikar. Det gjordes en jämförelse av de två provtagningsmetoderna, för att undersöka deras förhållanden för artdetektion och relativ abundans. Även övriga förekommande fiskarter registrerades med båda metoder och användes i jämförelsen.

Videokamerorna påträffade svartmunnad smörbult runt hela ön, på 8 av de 11 undersökta lokalerna, med det största antalet individer registrerade på nordöstra Gotland. I Visby hamn, där det tidigare rapporterats mycket hög täthet av arten, registrerades inga svartmunnade smörbultar på videokamerorna. I eDNA-analysen påträffades svartmunnad smörbult på 10 av de 11 provtagna lokalerna. Den lokal som var negativ i eDNA-analysen, Burgsvik, var även negativ i videoprovtagningen. eDNA och betade kameror påvisade liknande artrikedom, men sällan liknande artsammansättning vid respektive lokal. Istället kompletterade metoderna varandra för många arter i undersökningen, då vissa endast påträffades med antingen kamera, eller eDNA.

Innehåll

INVENTERING AV SVARTMUNNAD SMÖRBULT MED BETADE KAMEROR OCH EDNA RUNT GOTLAND 1

SAMMANFATTNING 3

INTRODUKTION 5

Inventering med betade videokameror 6

Inventering med eDNA 7

METODBESKRIVNING 8

Filmning 8

Videoanalys 9

eDNA 9

Lokaler 10

RESULTAT 12

Förekomst av svartmunnad smörbult 12

Betade videokameror 12

Analys av eDNA 12

Observerad artrikedom 14

Resultat från betade videokameror 14

Resultat från eDNA 15

Jämförelse av videoprovtagning och eDNA 17

Svartmunnad smörbult i relation till artrikedom och miljövariabler 18

DISKUSSION OCH SLUTSATSER 18

REFERENSER 21

INVENTERING AV SVARTMUNNAD SMÖRBULT MED BETADE KAMEROR OCH EDNA RUNT GOTLAND 24

Introduktion

Den svartmunnade smörbulten är i dagsläget Sveriges enda främmande art av fisk i marin miljö (d.v.s. den förökar sig och sprider sig i första hand i våra havsmiljöer). Den har sitt ursprung i svarta- och kaspiska havet, och eftersom den är anpassad till brackvatten så trivs den även i Östersjön och intilliggande miljöer, dit den först spridit sig via fartygstrafikens ballastvatten (Kotta et al., 2016). Nyligen har det även hittats bevis för att arten kan spridas med fritidsbåtar (Bussmann, Hirsch & Burkhardt-Holm, 2022). Svartmunnad smörbult betraktas ha både en hög spridningspotential samt stark påverkan på havsmiljön och dess biologiska mångfald, med den högsta riskklassen (5 – ”mycket hög”) tilldelad i Artdatabankens klassificering av Sveriges främmande arter (Strand et al., 2018). Den har även börjat sprida sig till sötvattensystem runt Östersjön (Verliin et al. 2017; Florin et al. 2021; Staehr et al. 2022). På grund av dess höga invasionspotential är inventering av arten önskvärd ur naturvårdssynpunkt. Arten har observerats i hamnmiljöer sedan 2010-talets början, och en inventering med burfiske från 2014 bekräftade förekomst i 5 hamnar runt Gotland där ”den gemensamma nämnaren för de hamnar där svartmunnad smörbult förekommer är hamnar med flera anlöp av lastfartyg årligen” (Andersson, 2015). På senare år har svartmunnad smörbult dock även rapporterats från mer naturliga kustpartier och vikar runt Gotland, och den förekom regelbundet i provfisken på ålgräsängar under 2021 (Artdatabanken, 2023: Artportalen.se; Bergh & Forssén, 2022). Den har nyligen även registrerats med eDNA-provtagning i tre vattendrag på Gotlands östra sida (Andersson-Li, 2023). Den svartmunnade smörbulten föredrar miljöer där hanar kan finna bohålor för att skydda och vårda om äggen under lektiden, vilket sker under sommarhalvåret (Charlebois et al, 1997). Detta innebär att de ofta kan påträffas bland artificiella strukturer såsom vågbrytare, stenpirar, samt runt bryggor. Det finns därför ett stort värde i att följa artens spridning längs med till exempel småbåtshamnar och bryggor, även ur ett logistiskt perspektiv då dessa miljöer är enkla att nå med fordon och utrustning.

De senaste åren har ett forskningsprojekt vid Göteborgs Universitet utvecklat och använt sig av betade kamerasystem för att undersöka förekomst och abundans av svartmunnad smörbult längs västkusten. Data från provfiske och eDNA-provtagning i en pilotstudie från Länsstyrelsen Västra Götaland (se Sundberg et al., 2021) har visat sig korrelera starkt med videoprovtagning av samma lokaler (Green et al., 2024). Videoprovtagning har likt eDNA fördelen att metoden är kostnadseffektiv, icke-invasiv (dvs den varken stressar eller skadar fisk) och kan ge data från små individer som sällan fastnar i nät eller burar. Ännu en fördel med videoprovtagning är den direkta observationen av

individer, vilket ger en möjlighet att skilja på exempelvis adulter, juveniler och reproduktiva hanar, samt observation av beteenden både mot artfränder och andra arter. Vidare så är bild- och videomaterial värdefullt för utbildning och informationskampanjer om hur svartmunnad smörbult identifieras, inte minst eftersom den delar många likheter med den inhemska arten svart smörbult (*Gobius niger*) och därmed riskerar att blandas ihop med denna. Detta innebär också att det finns en viss osäkerhet kring enskilda, icke validerade fynd i artportalen och ökar värdet av riktade inventeringar för att följa utbredningen av svartmunnad smörbult runt Gotland. Länsstyrelsen Gotland beställde våren 2023 en inventering av ett antal lokaler spridda runt ön av forskargruppen som studerar svartmunnad smörbult vid Göteborgs Universitet. Målet var att få en ögonblicksbild över artens spridning och täthet, framför allt i nära anslutning till nuvarande och framtida skyddade områden. Målet var även att jämföra videoprovtagning med eDNA-analys, både för observerad och relativ förekomst av svartmunnad smörbult, men även förekomsten av andra fiskarter, och på sätt utvärdera metodernas användbarhet i framtida undersökningar.

Inventering med betade videokameror

Provtagning med videokamera är en relativt vanlig metod för att undersöka flora och fauna i marina miljöer. När det gäller inventering av fisk används ofta betade kamerasystem (förkortat BRUV efter engelskans ”Baited Remote Underwater Video”) som kan placeras på botten eller fritt hängande i vattenpelaren med hjälp av en boj på ytan (se t.ex. Sherman et al., 2020 och Cambra et al., 2021). En fördel med dessa system gentemot till exempel ROV (fjärrstyrd undervattensfarkost) eller drop-video (en typ av kamerasläde som släpas över botten) är att de är stillastående och inte skrämmer bort fisken genom rörelser och ljud. Detta medför dock att kameran täcker ett mindre vattenområde, och därmed används bete för att locka den fisk som befinner sig i närheten att röra sig framför kameran. Lockbetet är ofta doftande såsom fiskrens och räkor. Fram tills idag har BRUV-metoden framför allt använts för inventering av större fisk som rovfisk och hajar (Sherman et al., 2020), men har också påvisats effektiv för mer övergripande inventeringar av arter runt korallrev, sjögräsängar, samt i sötvattensmiljöer såsom lugnflytande vattendrag (Andradi-Brown et al., 2016; French et al., 2021; Schmid et al., 2016), med det grundläggande kravet att miljöerna har tillräckligt bra sikt.

För detektion av kryptobentiska fiskar, d.v.s. små, bottenlevande arter som ofta gömmer sig i håligheter eller bland vegetation, så är BRUV-metoden fortfarande i utvecklingsstadiet. Eftersom sådana små fiskar (i Sverige speciellt smörbultar) kan vara svåra att skilja och artbestämma på video så är det värdefullt att designa kamerasystem som synliggör

deras karaktärer så bra som möjligt. I den här studien har ett system med neutrala bakgrundsskivor använts (se omslagsbild), som fisken behöver simma framför för att ta sig till betet. På så vis synliggörs karaktärer såsom färg, mönster och fenornas form, vilket förbättrar möjligheten till artidentifiering.

Inventering med eDNA

eDNA kommer från engelskans ”environmental-DNA” (miljö-DNA på svenska) och är den blandning av organismers DNA-fragment som förekommer i omgivningen. I vattenmiljön kan det vara allt ifrån levande djur eller djurdelar, till exempel ägg, spermier och larver, till dött material som avföring, slem, fiskfjäll eller fritt flytande DNA-molekyler som utgör eDNA. Genom att samla in vattenprover och utföra analyser av DNA kan arter som nyligen rört sig i vattenmassan identifieras. Tekniken att kunna matcha rätt organismer med DNA i ett vattenprov har utvecklats snabbt under de senaste åren. eDNA har visat sig effektivt för artidentifikation bland fiskar eftersom de lätt släpper ifrån sig DNA till vattenmassan.

Vid analys använder man markörer för artspecifika DNA-sekvenser, och förstärker mängden prov-DNA med hjälp av PCR. Slutligen matchas resultatet mot existerande bibliotek av arters DNA-sekvenser, vilket gör det möjligt att finna olika arter i vattenprovet. Metoden i sig möjliggör en mer kostnadseffektiv och icke-invasiv inventering eftersom varken fiskar eller miljön påverkas av provtagningen. Man behöver alltså inte provfiska och ta upp fisken för att kunna göra en enklare biodiversitetsundersökning eller för att upptäcka invasiva, främmande arter i ett vatten. Metodiken passar därmed bra i svårinventerade och känsliga miljöer.

Användningen av eDNA i vatten innebär däremot vissa begränsningar. Provet måste tas i närtid av att en art befunnit sig på provplatsen, eftersom DNA bryts ner med tiden. Det finns även risk att DNA sprids nedströms i rinnande vatten och ger falska positiva, alltså utslag på arter som egentligen inte finns på provplatsen. Metoden kan inte svara på alla frågor, vilket man behöver vara medveten om när man planerar en eDNA-undersökning. eDNA säger till exempel inte någonting om storleks- eller könsfördelning i ett fiskbestånd, och den ger inga indikationer på skador eller hälsostatus. Det är också svårt att beräkna hur stora bestånden är, något som är mycket viktigt inom miljöövervakningen. Möjligheten att få svar på antalet individer genom eDNA är därför fortfarande begränsad men forskning visar att mängden biomassa av fiskar kan beräknas, vilket kan ge en indikation på det relativa antalet av en art mellan lokaler.

På Gotland är inventering med hjälp av eDNA relativt nytt och bara ett fåtal undersökningar har utförts. Under 2021 undersöktes vattendrag på Gotland för att bedöma förekomst av svartmunnad smörbult i limniska system (Andersson-Li, 2023). Där fann man DNA-spår av svartmunnad smörbult på 3 lokaler, vilka ligger på Gotlands östra kust. Under sommaren 2023 har en metodutveckling för eDNA-analys gjorts avseende tillsyn av signalkräfta och kräftpest, prover togs även i vissa utvalda mynningar för svartmunnad smörbult för förekomst i vattendragen. Inom projektet som denna rapport avser används eDNA-provtagningen som ett komplement för att jämföra data med resultaten av videokamera-metoden. Analysen innehåller en flerartsanalys för fiskfauna för att undersöka artrikedomen på lokalerna. Sedan görs en kvantitativ analys av svartmunnad smörbult som kommer visa den relativa mängden biomassa av svartmunnad smörbult mellan de olika lokalerna. Dessa analysresultat kan sedan jämföras med resultaten från videoanalysen, både med avseende på individantal och observerad förekomst av olika arter med de båda metoderna.

Metodbeskrivning

Mellan den 4–8 september 2023 undersöktes 11 lokaler på Gotland för förekomst av den främmande arten svartmunnad smörbult med betade videokameror och eDNA-analys. I samband med provtagningen togs koordinater för kamerans placering (och korresponderande eDNA-delprov), samt mätningar av djup, salthalt och vattentemperatur. Det gjordes även en visuell bedömning av vilken typ av bottensubstrat kameran placerades på och förekomsten av ålgräs, tång och fintrådiga alger i direkt anslutning (ca 10m) till utrustningen.

Filmning

Videokameror betades med frysta räkor (4 st per kamera. Ca 45 gram våtvikt) och placerades på bottnen antingen direkt ifrån en brygga/pir då detta var möjligt, eller med hjälp av snorkling. Varje kamerasystem placerades med ett avstånd om minst 30 meter från varandra för att undvika att smörbultar skulle röra sig mellan kamerorna under filmningens tid. Djupet kamerorna placerades på varierade mellan 0.6 – 3.2 meter. För att kontrollera för ljusförhållanden riktades alltid videoriggen så att kameran filmade norrut (och i regel då fick gott om ljus mot bakgrunden). Vid varje lokal skedde i genomsnitt 4 filmningar, varje kamera spelade in video under 1 timme, med en total inspelningstid på 4 timmar per lokal.

Videoanalys

Videofilmerna analyserades genom att en expert på artbestämning tittade på varje film och dokumenterade de arter av fisk som kunde observeras. Om fler än en individ av en art sågs samtidigt i bild, räknades dessa ihop till ett så kallat ”Max N”-värde. Den slutgiltiga datan var:

- Förekomst av arter vid varje lokal
- Max N av respektive art per videofilm och sammanlagt för lokalen

Vissa fiskar är svåra att bestämma till art med enbart visuella medel, till exempel om de rör sig på stort avstånd från kameran eller om de är juvenila individer som saknar karaktärer för säker artbestämning. I sådana fall angavs dessa som grupp (till exempel sillfiskar, plattfiskar eller stubbar). Den svartmunnade smörbulten är däremot förhållandevis enkel att bestämma som juvenil. I analysen av videodatan togs hänsyn till dubbletter, d.v.s. om en art även representerades av en högre taxonomisk grupp så slogs dessa samman till den högre gruppen vid beräkning av artrikedom. Ett exempel är storspigg och spiggfiskar, som i analysen slogs ihop till spiggfiskar, samt sand- och lerstubb som i analysen slogs ihop till stubbar. Undantag gjordes dock om den/de arter som identifierades bedömdes vara uppenbart skilda från de individer som inte gick att identifiera närmare än till familj, vilket var fallet för gruppen karpfiskar.

eDNA

Provtagningen för eDNA följde instruktionerna från centrum för genetisk identifiering (CGI) vid Naturhistoriska Riksmuseet. Vid varje lokal togs totalt fyra delprover, som samlades in så nära kamerariggarnas placering som möjligt med hjälp av en vattenhämtare. Delproven togs alltid innan kamerariggarna placerades ut för att undvika kontaminering (eftersom riggarna inte sanerades mellan varje lokal). De fyra delproverna från en lokal blandades till ett samlingsprov som direkt filtrerades genom Sylphium-filter från eDNA-kitet som CGI tillhandahållit. Därefter markerades filtret med lokalnamn och datum. Ett fältprotokoll fylldes i för varje lokal med datum, koordinater för lokalen, vattentemp, vädernotering och provtagare. För att undvika kontaminering mellan lokaler sanerades all provtagningsutrustning från DNA-spår med en klorinlösning, 1 del klorin med 9 delar vatten, inför provtagning på varje lokal. Efter avslutat fältarbete skickades filtren till CGI för utförande av DNA-analys. Extraktion av DNA gjordes med Mag-Bind HDQ Blood DNA Kit (Omega) och Kingfisher extraktions-robot enligt tillverkarens instruktioner. En första analys av detektion av DNA från svartmunnad smörbult gjordes med ett Bio-Rad CFX96 instrument enligt (Thomsen et

al., 2012). För varje prov utfördes tre tekniska replikat av denna metod. För flerartsanalys amplifierades en kort bit av mitokondriellt DNA med primers beskrivna för MiFish (Miya et al., 2015) med PCR-reaktioner som optimerats för flerartsanalys med sekvensering. PCR-reaktioner genererade rena amplifieringar av förväntad storlek i alla tre replikat för alla prover och bedömdes därmed lämpliga för att skapa sekvenseringsbibliotek. Biblioteken skapades av CGI och sekvenserades av BMK på ett NovaSeq-instrument (PE150).

Från denna rådata trimmades primersekvenser bort med hjälp av programmet cutadapt och kvarvarande data analyserades med R-paketet dada2 (Callahan et al., 2016). Dada2 använder sekvensdata från prover för att identifiera unika sekvenser av biologiskt ursprung och hur många gånger dessa hittas i vardera prov. Kvarvarande sekvensvarianter spårades till art genom att med hjälp av verktyget BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) jämföra sekvenserna mot NCBIs öppna nukleotiddatabas. Sökningen utfördes i februari 2024. Träffar med en identifikation på lägre än 95% exkluderades direkt. Dessutom exkluderades träffar från varje prov där träffen utgjorde mindre än 0,1% av det totala antalet sekvenser inom det provet för att minska risken för falskt positiva träffar. Det totala antalet fragment efter sekvensering av proverna var 30,8 miljoner, där enskilda prov hade mellan 1,6 miljoner och 3,5 miljoner fragment. Omkring 68% av sekvenserna innehöll förväntade primers och var av tillräckligt god kvalitet för att bibehållas i analysen. Av dessa tillhörde ~87% av sekvenserna fisk.

Lokaler

De 11 lokalerna valdes ut i samråd med representanter från Länsstyrelsen Gotland. Målet med lokalerna var att de skulle vara spridda runt hela ön och ligga i eller i anslutning till nuvarande eller planerade marina skyddade områden. Namn och generella koordinater för lokalerna presenteras i tabell 1. Följande platsbeskrivningar gäller provplatserna i närheten till områden som är skyddade eller planeras att få skydd:

Ar ligger inom utpekat område för den planerade nationalparken Bästeträsk. Området utgörs av steniga stränderna vid kusten som under vattenytan utgörs av områden med sjögräsängar och blåmusselbankar.

Kyllaj och **Slite** ligger vid Slite skärgård, ett naturreservat där stora delar av naturvärdena hittas under ytan med goda förutsättningar för ett artrikt marint liv. Bottenstrukturen är mosaikliknande och påverkas i olika grad av strömmar och vågor, vilket gör att det finns en stor variationsrikedom med ålgräsängar, blåstångsbälten och musselbankar.

Katthammarsvik ligger innanför Östergarn rev, ett område med flera marina naturvärden och grundare revbankar med blåmusslor.

Ronehamn ligger intill Ålarve naturreservat, ett område med kobbar och skär utanför kusten. Inventeringar visar på marina naturvärden som ålgräsängar och borstnate inom och i anslutning till naturreservatet.

Djupvik Ligger i höjd med naturreservaten Stora och Lilla Karlsö. Kring dessa öar och närmare kusten finns flera platser med blåstångbälten och mindre blåmusselbankar.

Ireviken ligger precis nedanför Hall-Hangvars naturreservat där planering på att skydda en del av kustvattnet pågår. I Ireviken ligger även en del av Ireåns naturreservat, då ån mynnar ut i viken.

Visby hamn valdes ut för att det tidigare rapporterats höga tätheter av Svartmunnad smörbult därifrån och lokalen därmed kunde anses som en sorts ”positiv kontroll” för den inledande fältprovtagningen.
Flundreviken och **Burgsvik** fick provplatser med målet att sprida ut inventeringen över ön samt att de var lättillgängliga lokaler.

Lokal nr	Lokalnamn	Latitud/N	Longitud/E	Djup (m)
1	Visby hamn	57.63556	18.28186	1,3 – 2,1
2	Flundreviken	57.66800	18.32551	1,0 – 1,8
3	Irevik	57.84005	18.58531	0,9 – 1,3
4	Ar	57.91789	18.94841	1,2 – 3,0
5	Fårösund	57.85636	19.06614	0,9 – 1,8
6	Kyllaj	57.75338	18.95016	1,1 – 1,5
7	Slite	57.71725	18.80451	1,1 – 1,7
8	Katthammarsvik	57.43658	18.85216	1,4 – 3,2
9	Ronehamn	57.17395	18.49374	0,6 – 1,4
10	Burgsvik	57.03439	18.25919	0,9 – 1,9
11	Djupvik	57.30867	18.14837	1,2 – 2,0

Tabell 1. Lokaler för provtagningar med videokameror och eDNA. Ovan anges de provtagna lokalerna i medurs riktning från Visby hamn. Observera att koordinaterna anges enligt systemet WGS84. Djupet anger minsta och största djup för de fyra kamerariggarna under provtagningen.

Resultat

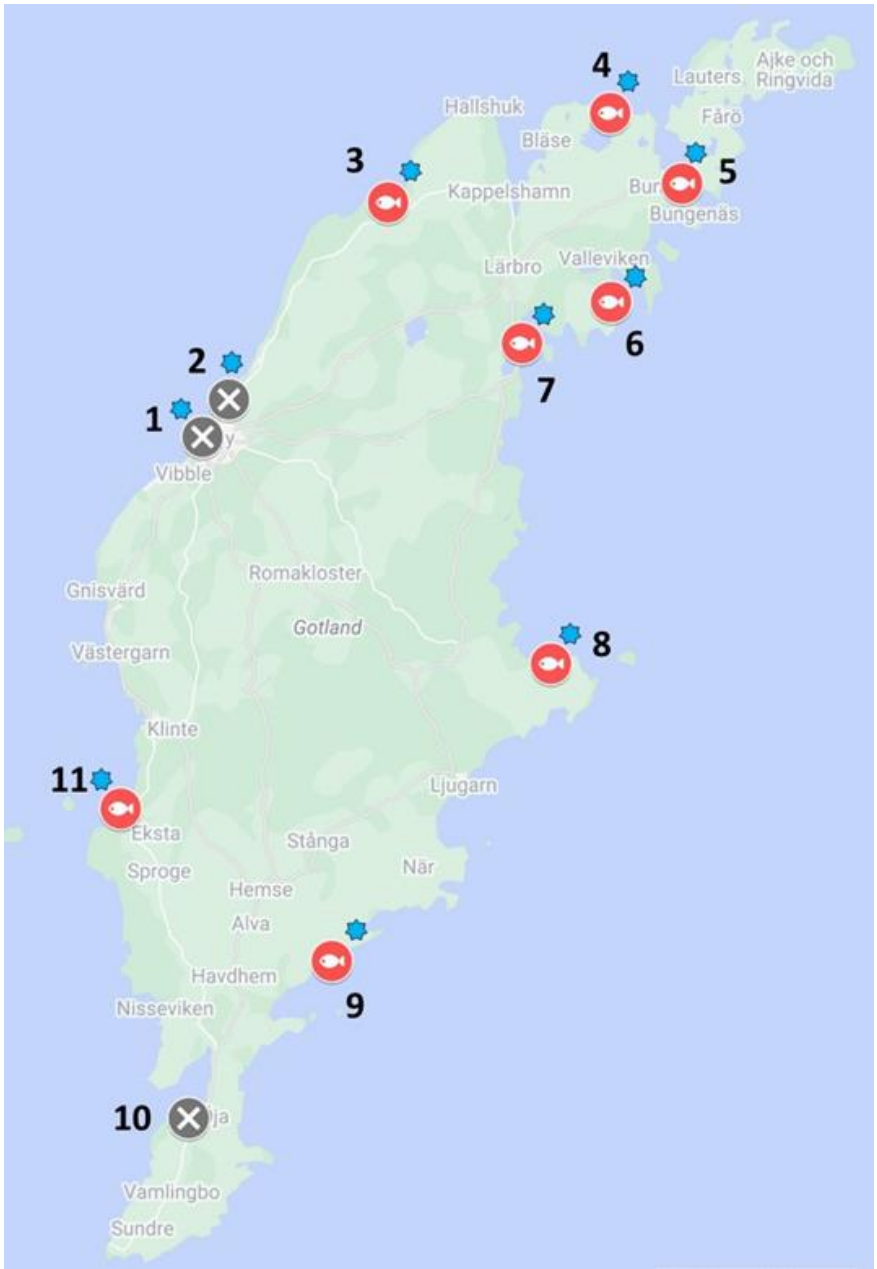
Förekomst av svartmunnad smörbult

Betade videokameror

Svartmunnad smörbult påträffades med videokameror på 8 av de 11 undersökta lokalerna i denna rapport (figur 2). Totalt observerades 79 individer i videoanalysen och som mest observerades 8 individer samtidigt på film, vilket skedde i Ar (Lokal nr 4). Denna lokal var tillsammans med Fårö och Ronehamn (lokal nr 5 respektive nr 9) de enda där samtliga fyra kameror registrerade svartmunnad smörbult (tabell 2). Det minsta max N-talet som observerades (på de filmer där arten förekom) var en individ, vilket skedde på nio filmer från sex olika lokaler. Som medel observerades tre individer samtidigt på filmer där arten förekom.

Analys av eDNA

Närvaro av DNA från svartmunnad smörbult kunde påvisas på 10 av de 11 undersökta lokalerna (figur 2). Av dessa hade fem lokaler tre positiva av tre utförda replikat, fyra lokaler hade två positiva replikat, och en lokal, Visby hamn, hade endast ett positivt replikat (tabell 2). Lokalen som var negativ i eDNA-analysen, Burgsvik, hade inte heller några registrerade individer av svartmunnad smörbult i videoanalysen.



Figur 2. Samtliga lokaler och de platser där fynd av svartmunnad smörbult gjordes under inventeringen. Röda symboler visar fyndplatser med videokameror. Kryss visar på lokaler där svartmunnad smörbult ej påträffades med videokameror. Blå stjärnor visar på detektion av DNA från svartmunnad smörbult i vattenprov från samma tillfälle som videoprovtagningen.

Lokal nr	Lokalnamn	Max_N total	Max_N max	Max_N med	Max_N min	eDNA träff
1	Visby Hamn	0	0	0	0	ja
2	Flundreviken	0	0	0	0	ja
3	Irevik	5	2	1,25	0	ja
4	Ar	18	8	4,5	3	ja
5	Fårösund	18	7	4,5	1	ja
6	Kyllaj	10	6	2,5	0	ja
7	Slite	9	4	2,25	0	ja
8	Katthammarsvik	14	8	3,5	0	ja
9	Ronehamn	5	2	1,25	1	ja
10	Burgsvik	0	0	0	0	nej
11	Djupvik	2	1	0,5	0	ja

Tabell 2. Förekomst av svartmunnad smörbult vid lokaler runt Gotland
Arten observerades med videokameror och eDNA enligt beskrivna metoder. *Max_N total* är summan av det högsta antalet individer som syntes samtidigt i bild på vardera av de fyra videokamerorna på lokalen (1 timmes inspelning/kamera). *Max_N max* är det högsta antalet individer som syntes samtidigt i bild på någon av de fyra videokamerorna på lokalen. *Max_N min* är det lägsta maxantalet individer som observerades från någon av de fyra videokamerorna vid en lokal (nollvärden visar att vissa kameror inte fångade någon svartmunnad smörbult på bild). Kolumnen *"eDNA träff"* anger om analysen visat positiv träff för svartmunnad smörbult eller ej.

Observerad artrikedom

Resultat från betade videokameror

De betade videokamerorna registrerade totalt 17 arter eller artgrupper, där den observerade artrikedomen och abundansen på varje lokal presenteras i tabell 3. De vanligaste arterna eller artgrupperna sett till antal lokaler de observerades på var: stubbar (11 lokaler), svart smörbult (10 lokaler), spiggar (9 lokaler), abborre (8 lokaler), svartmunnad smörbult (8 lokaler) och plattfiskar (7 lokaler). De vanligaste arterna eller artgrupperna sett till det totala antalet registrerade individer var stubbar (329 st), spiggar (179 st), abborre (108 st), svartmunnad smörbult (79 st) och svart smörbult (67 st). Trots att plattfiskar var en vanlig artgrupp på lokalnivå så registrerades endast nio individer totalt. Vidare så registrerades ett flertal arter med endast en eller två individer (och därmed endast på en eller två lokaler), dessa var: mindre havsnål (2 st), tånglake (2 st), sutare (1 st), id (1 st), samt grupperna karpfiskar (2 st) och

ruda/silverruda (1 st). De stimlevande arterna och grupperna elritsa, sjustrålig smörbult, sillfiskar och tobisfiskar observerades i större individantal (32, 16, 41 respektive 21 st) men endast på två lokaler vardera, med undantag från tobisfiskarna som observerades på fyra lokaler. Tångsnälla var relativt vanlig på lokalnivå med fem lokaler, med totalt 10 individer observerade. I videoanalysen fanns ett flertal situationer där ett stort antal juvenila individer av smörbultar förekom på videon, som var svåra att urskilja mellan en art av stubb eller svart smörbult. Det beslutades att ange dem som stubbar, vilket innebär en risk för att abundans och proportion svart smörbult kan ha underskattats något. Det har dock inte påverkat resultatet av absolut förekomst, då det förekom större individer av svart smörbult på dessa lokaler. När det gäller artgruppen spiggar så är det sannolikt att majoriteten av individerna som registrerats i inventeringen tillhör arten storspigg, då alla tillfällen där spiggen kom tillräckligt nära kameran för att artbestämmas visade sig vara denna art. Eftersom småspigg dock också förekommer på Gotland kan arten inte uteslutas, och för att kunna behålla alla observationer i analysen angavs spiggar som grupp (spiggfiskar).

Resultat från eDNA

Analysen av det sekvenserade materialet från vattenproverna fångade omkring 18,2 miljoner DNA fragment med en identifikationsmatchning på över 95% till kända taxa av fisk. Totalt återfanns 20 olika taxonomiska grupper (taxa till art eller familje-nivå). 75% av sekvenserna tillhörde 5 olika arter. Dessa arter var (i ordning av andel fragment): Storspigg 46.2%; lerstubb 9%; tånglake 7,8%; abborre 6,3%; svartmunnad smörbult 6,3%. Bland lokalerna så varierade antalet sekvenser mellan 4,3–12,5% av det totala antalet sekvenser som återfanns. DNA från storspigg dominerade (13,9–67,6% av totala antal sekvenser från fisk) på samtliga lokaler utom 3. Ireviken, där tånglake i stället dominerade provet (47,4% av totala antal sekvenser från fisk), samt 8. Katthammarsvik, där plattfiskar i stället dominerade (35,4% av totala antal sekvenser från fisk). Vissa fragment kunde ej allokeras till specifika arter, men i stället till släkten: dessa var plattfiskar, tobisfiskar, simpor och artkomplexet id/stäm. En oväntad art som registrerades i provet var clariasmal (*Clarias* sp.). Arten aldrig påträffats i det vilda i Östersjön, och fyndet är mest sannolikt från matrester, då arten förekommer inom mathandeln. Guldfisk återfanns vid lokal 2. Flundreviken, där andelen fragment uppgick till 1% av de fragment som registrerades från lokalen. DNA från svartmunnad smörbult återfanns vid samtliga lokaler utom 10. Burgsvik. Andel sekvenser för arten varierade mellan 0,2–13,4% av totala antalet sekvenser per lokal. Högst andel sekvenser för arten återfanns vid lokal 7. Slite (13,4%) och 5. Fårösund (11,1%). Störst antal sekvenser för arten återfanns vid lokal 6. Kyllaj. Samtliga taxonomiska grupper med signaler av eDNA återfinns nedan i Tabell 3.

	1. Visby hamn	2. Flundreviken	3. Irevik	4. Ar	5. Fårösund	6. Kyllaj	7. Slite	8. Katt-hammarsvik	9. Ronehamn	10. Burgsvik	11. Djupvik
Abborre *Perca fluviatilis*	2,75 (0-6)	6,75 (27*)		0,25 (1*)		6,25 (1-21)	5,25 (2-9)		1,5 (0-5)	1,75 (0-5)	2,5 (10*)
Elritsa *Phoxinus phoxinus*		7,5 (30*)			0,5 (2*)						
Id / Stäm *Leuciscus idus / lecosiscus*								0,25 (1*)			
Karpfiskar (*1) *Cyprinidae*		0,5 (0-1)									
Mindre havsnål *Nerophis ophidion*							0,25 (1*)	0,25 (1*)			
Plattfiskar *Pleuronectidae*	0,25 (1*)	0,25 (1*)	0,25 (1*)	0,25 (1*)	0,25 (1*)			0,75 (0-1)			0,25 (1*)
Ruda/Silverruda *Carassius sp.*											0,25 (1*)
Sillfiskar (*2) *Clupeidae spp.*			9 (0-35)					1,25 (5*)			
Sjustrålig smörbult (*3) *Gobiusculus flavescens*			1 (1-1)	3 (0-10)							
Spiggfiskar (*4) *Gasterosteidae spp.*		18 (0-70)	0,25 (1*)	1,5 (6*)	5,5 (1-10)	1,5 (0-3)		0,5 (0-1)	3,75 (1-10)	11,5 (0-40)	2,25 (9*)
Stubbar (*5) *Pomatoschistus spp.*	8 (0-25)	2,5 (2-3)	21,5 (14-30)	9,25 (3-20)	5,75 (4-8)	0,5 (0-1)	2,25 (0-4)	5,25 (1-8)	1,5 (0-3)	23,25 (9-35)	2,5 (2-4)
Sutare *Tinca tinca*											0,25 (1*)
Svart smörbult *Gobius niger*	1,5 (0-3)	1 (0-3)	0,75 (0-2)	1 (0-2)	2,5 (0-5)		2,75 (0-5)	0,25 (1*)	3,75 (2-6)	2,25 (0-5)	1 (0-2)
Svartmunnad smörbult *Neogobius melanostomus*			1,25 (0-2)	4,5 (3-8)	4,5 (1-7)	2,5 (0-6)	2,25 (0-4)	3,5 (0-8)	1,25 (1-2)		0,5 (0-1)
Tobisfiskar *Ammodytidae*			0,25 (1*)	0,25 (1*)	3 (12*)					0,25 (1*)	
Tånglake *Zoarces viviparus*			0,25 (1*)		0,25 (1*)						
Tångsnälla *Syngnathus typhle*					0,5 (0-1)	0,25 (1*)			0,5 (0-1)	1 (1-1)	0,25 (1*)
Simpor *Cottidae*											

Gädda *Esox lucius*											
Malfiskar (*6) *Clariidae*											
Antal arter, BRUV	4	7	9	8	9	5	5	8	6	6	9
Antal arter, eDNA	5	15	8	8	6	6	5	8	5	3	13
Bidragande arter, BRUV	2	1	3	4	5	2	3	3	1	4	3
Procent (%) ökat bridrag, BRUV	29	6	27	33	45	25	38	23	17	57	19
Bidragande arter, eDNA	3	8	2	4	2	3	3	3	0	1	7
Procent (%) ökat bridrag, eDNA	43	50	18	33	18	38	38	23	0	14	44
Summerad artrikedom	7	16	11	12	11	8	8	13	6	7	16

Tabell 3. Jämförande resultat från samtliga lokaler provtagna med betad video (BRUV) i siffror och miljö-DNA (eDNA) med färgkoder. Observerade fiskar är sorterade i bokstavsordning efter svenskt artnamn. Vetenskapligt namn anges i kursivt. Värdena motsvarar medelvärdet av de Max N-värden som observerats på de 4 videofilmerna från varje lokal (se metodbeskrivning). Värden i parentes anger min-maxintervall för lokalen, där noll indikerar att en eller två filmer saknade arten. Ett enskilt värde med asterisk indikerar att endast en kamera registrerade arten, och dess Max N. De fiskar som inte säkert kunde identifieras på artnivå har angetts som grupp (karpfiskar, plattfiskar, sillfiskar, spiggfiskar, stubbar, tobisfiskar). Färgade celler anger fynd med eDNA. För arter med gul eller orange färg förklaras färgkoden enligt asterisk med nummer vid artnamn. Asterisker med nummer anger följande: *1: eDNA signal från mört.; *2: eDNA signal från antingen sill (grön) eller skarpsill (gul) eller båda (orange), arterna går ej att skilja visuellt på BRUV. Vid lokal 8 återfanns sill i ett separat referensprov, medan skarpsill återfanns vid ordinarie eDNA-prov.; *3: Brist på eDNA-fynd kan bero på låg genetisk täckning i NCBIs referensdatabas. ; *4: eDNA signal från antingen storspigg (grön), småspigg (gul), eller båda arterna (orange), arterna är svåra att skilja visuellt på BRUV. ; 5*: eDNA signal från antingen sandstubb (grön) eller lerstubb (gul) eller båda (orange), arterna går ej att skilja visuellt på BRUV. ; *6: Malfisken *Clarias* odlas och säljs i butik som matfisk. Signal från denna är med största sannolikhet från humankonsumtion och avfall. Arten har exkluderats från alla summeringar.

Jämförelse av videoprovtagning och eDNA

Tabell 3 visar siffror för MaxN värden för betade kameror och färgindikatorer på lokaler där DNA fragment från arten påträffades. Tabellen tar ej hänsyn till kvantitativa data så som andel eller antal fragment från respektive art. Artrikedomen per lokal varierade beroende på undersökningsmetod. Utav de 11 undersökta lokalerna så återfanns fler arter med BRUV på 4 lokaler, och även fler arter med eDNA på 4 lokaler. 3 lokaler hade samma antal arter hos båda metoderna, men arterna skilde sig åt. Det ökade bidraget från betade kameror och eDNA

var också likvärdigt - 29% och 2,8 respektive 3,3 arter i genomsnitt. eDNA påvisade förekomsten av totalt sett fler arter, med 20 taxonomiska grupper jämfört med 17 st för betade kameror. Denna skillnad berodde i första hand på svårigheterna med ett urskilja stubbar (lerstubb och sandstubb), sillar (sill och skarpsill) och spiggfiskar (storspigg och småspigg) på video. Samtidigt påträffades flera arter på BRUV vars DNA ej påträffades i analysen (se nedan).

Bäst överlapp mellan metoderna fanns för följande taxa: abborre: 75%; elritsa: 67%; spiggfiskar: 82%; stubbar: 82% och svartmunnad smörbult: 80%, där procentgraden anger hur många lokaler där arten återfanns med båda metoderna, utav det totala antalet lokaler där arten påvisades. Vissa arter hade en total brist på överlapp mellan metoderna: Id/Stäm; ruda/silverruda/guldfisk; tobisfiskar. Hos vissa arter påträffades inga spår av eDNA hos något prov trots att dessa återfanns på kamera. De arter som endast återfanns på kamera var: mindre havsnål; sjustrålig smörbult; sutare. Vissa arter påträffades med eDNA men syntes aldrig på video. De arter / taxonomiska grupper som endast påträffades med eDNA var simpor; gädda; samt malfiskar (se sektion Resultat från eDNA).

Svartmunnad smörbult i relation till artrikedom och miljövariabler

Det fanns en svag positiv trend mellan max N-talet för svartmunnad smörbult och observerad artrikedom på videofilmerna, men denna korrelation var dock inte statistiskt signifikant (pearsons korrelationskoefficient $R = 0.27$, $p = 0.08$). Ingen statistisk korrelation kunde påvisas mellan max N-talet svartmunnad smörbult och totalt antal observerade fiskar ($R = 0.018$, $p = 0.91$), eller mellan proportionen svartmunnad smörbult (antal individer/totalt antal observerade fiskar) och observerad artrikedom ($R = -0.072$, $p = 0.64$).

Vattentemperatur och salthalt varierade mellan 17,9 och 19,6 °C respektive 5,4 och 6,99 under provtagningsperioden. Det fanns ingen korrelation mellan max N-talet svartmunnad smörbult och temperatur ($R = 0.15$, $p = 0.34$) eller salthalt ($R = 0.17$, $p = 0.27$). Det fanns heller ingen korrelation mellan max N-talet svartmunnad smörbult och djup ($R = 0.075$, $p = 0.63$).

Diskussion och slutsatser

Utifrån resultaten av inventeringen så kan det bekräftas att svartmunnad smörbult fortsatt är utbredd runt hela Gotland. Den observerade abundansen i videodatan kan ge intrycket att tätheten är relativt hög på nordöstra Gotland jämfört med andra delar av ön. Över 50% av det totala antalet DNA sekvenser från svartmunnad smörbult påträffades också vid

lokal 5–7, Däremot har denna inventering inte varit tillräckligt omfattande i form av undersökta arealer eller habitat- och djupvariationer för att kunna dra några generella slutsatser kring detta.

Svartmunnad smörbult är i de flesta fall redan känd ifrån de områden där den observerats i denna undersökning. Målet med inventeringen var att bekräfta om provtagningsmetoderna kunde påträffa arten och att i sådana fall även etablera en baslinje för eventuell fortsatt övervakning med dessa metoder. Det är viktigt att ha en konsekvent och standardiserad övervakningsmetod för att kunna få en så representativ bild som möjligt av både spatial och temporal abundans av svartmunnad smörbult runt Gotlands kust. Fram tills denna undersökning var till exempel de publika fynden på artportalen rapporterade från medborgarforskare i samband med privat fiske och bad, eller som bifångst från till exempel naturvärdesinventeringar av länsstyrelsen (Artdatabanken, 2023: Artportalen.se). Det gör att kännedomen om artens utbredning har viktats mot ett geografiskt och tidsmässigt oregelbundet provtagningsområde, och att förhållanden och trender är svåra att undersöka.

Ett exempel är Visby hamn, där över 500 individer rapporterades under åren 2012 till 2015 i samband med bland annat ideella provfisken (Artdatabanken, 2023: Artportalen.se). Därefter finns inga fler fynd rapporterade från Visby hamn i Artportalen. I denna undersökning påträffades inga individer på videofilmerna, och eDNA-analysen resulterade i endast ett positivt replikat av tre utförda, vilket enligt utföraren CGI skulle kunna bero på mindre DNA-mängder i vattenprovet. Det verkar därmed som att tätheten av svartmunnad smörbult i Visby hamn är relativt låg jämfört med de undersökta lokalerna på nordöstra Gotland. En fortsatt regelbunden övervakning, till exempel varje eller vartannat år, kan ge en tydligare bild av hur relativ förekomst och abundans ser ut runt ön och över tid, vilket är en grundförutsättning för att eventuella åtgärder mot arten ska kunna utföras effektivt, på rätt plats och vid rätt tidpunkt.

Svartmunnad smörbult observerades ej med BRUV vid två lokaler där DNA från arten påträffades (se Tabell 3). Det är troligt att arten är förekommande på dessa två lokaler, men ej i det habitat eller zon där videoprovtagningen skedde. Samtidigt ska det nämnas att eDNA rör sig med vatten och att en eventuell lokal uppströms kan påverka vilka arter som detekteras vid en lokal nedströms. Även om korrelationer mellan mängd eDNA sekvenser (genom artspecifik kvantitativ PCR) och antal individer av svartmunnad smörbult som kan fångas på video eller i ryssja tidigare har påvisats, så kan osäkerheten i måtten minska med ökad mängd replikat av båda metoderna (Sundberg et al., 2021; Green et al., 2024). Den enda lokal där svartmunnad smörbult inte påträffades med

vare sig videokameror eller eDNA-analys var Burgsvik, på sydöstra Gotland (figur 2). Denna lokal bestod av en långgrund sandvik runt en pir med bad- och småbåtsbryggor. På lokalen registrerades den högsta tätheten av stubbar, samt en del svart smörbult, och bedömdes kunna utgöra habitat även för svartmunnad smörbult eftersom piren är anlagd på en vågbrytare av sprängsten som kan erbjuda gömslen och bohålor. Det har även rapporterats svartmunnad smörbult längre ut i viken i samband med andra inventeringar av Länsstyrelsen Gotland samt i provfiske på ålgräsängar under 2021 och 2022 (Artdatabanken, 2023: Artportalen.se; Bergh & Forssén, 2022). Det finns därmed en chans att arten funnits på lokalen men missats av provtagningsmetoderna (falskt negativt), men en uppföljning av lokalen rekommenderas för att avgöra om så är fallet. Storspigg (*G. aculeatus*) påvisades i stor utsträckning i eDNA prover från samtliga lokaler, och spiggfiskar (troligtvis storspigg) påvisades också från 9 av 11 lokaler. Arten är otroligt talrik i Östersjön, och dess populationstillväxt och ekosystemkonsekvenser har fått den att jämföras med svartmunnad smörbult, trots att arten är inhemsk (ICES, 2022). Fortsatt rapportering av artens tätheter kan också bidra till kunskapsluckorna i hur små mesopredatorer påverkar ekosystemet vid brist på predatorkontroll.

Sammanfattningsvis så ger användningen av de båda metoderna en kompletterande bild av fisksamhället och de främmande arter som kan påverka det. Förekomsten av vissa arter kan påvisas relativt säkert med båda metoderna, medan andra med största sannolikhet påvisas bäst med endera metoden. Dessa arter går att utläsa ur Tabell 3.

Referenser

Andersson, M. (2015) Svartmunnad smörbult (*Neogobius melanostomus*) i gotländska hamnar 2014 (Rapporter om natur och miljö nr 2015:3). Länsstyrelsen i Gotlands Län.
https://catalog.lansstyrelsen.se/store/30/resource/2015_3

Andersson-Li, M. (2023) Undersökning av flodnejonöga och svartmunnad smörbult i Gotlands vattendrag (Rapporter om natur och miljö nr 2023:1). Länsstyrelsen i Gotlands Län.
https://catalog.lansstyrelsen.se/store/30/resource/114

Andradi-Brown DA., Macaya-Solis C., Exton DA., Gress E. & Wright G. et al. (2016) Assessing Caribbean Shallow and Mesophotic Reef Fish Communities Using Baited-Remote Underwater Video (BRUV) and Diver-Operated Video (DOV) Survey Techniques. PLOS ONE 11(12): e0168235.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168235

Artdatabanken SLU (2023). https://artportalen.se/

Bergh, F. & Forssén, M. (2022) Provfiske på ålgräsängar runt Gotland 2021. (Rapporter om natur och miljö nr 2022:3). Länsstyrelsen i Gotlands Län.

Bussmann, K., Hirsch, P. E., & Burkhardt-Holm, P. (2022). Invasive goby larvae: first evidence as stowaways in small watercraft motors. *Management of Biological Invasions*, 13(1), 191–203.
https://doi.org/10.3391/mbi.2022.13.1.11

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 (7): 581

Cambra, M., Lara Lizardi, F., Peñaherrera, C., Hearn, A., Ketchum, J., Zarate, P., Chacón, C., Suarez-Moncada, J., Herrera, E. & Espinoza, M. (2021). A first assessment of the distribution and abundance of large pelagic species at Cocos Ridge seamounts (Eastern Tropical Pacific) using drifting pelagic baited remote cameras. PLOS ONE. 16. e0244343.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244343.

Charlebois, P. M., Marsden, J. E., Goettel, R. G., Wolfe, R. K., Jude, D. J. & Rudnika, S. (1997). The Round Goby, Neogobius melanostomus (Pallas), a Review of European and North American Literature. Zion, IL: Illinois-Indiana Sea Grant Program and Illinois Natural History Survey.

French, B., Wilson, S., Holmes, T., Kendrick, A., Rule, M. & Ryan, N. (2021) Comparing five methods for quantifying abundance and diversity of fish assemblages in seagrass habitat. *Ecological Indicators*, Volume 124.

https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107415.

Green, L., Dahlgren, T. G., Axberg, A., Panova, M., Obst, M., & Sundberg, P. (2024). Monitoring of the invasive round goby in an estuarine seascape based on eDNA. *bioRxiv*, 2024-05. https://doi.org/10.1101/2024.05.06.592655

ICES. (2022). Workshop on Stickleback and Round Goby in the Baltic Sea (WKSTARGATE). ICES Scientific Reports. 4:77. 56 pp. https://doi.org/10.17895/ices.pub.21345291

Kotta, J., Nurkse, K., Puntila, R., & Ojaveer, H. (2016). Shipping and natural environmental conditions determine the distribution of the invasive non-indigenous round goby Neogobius melanostomus in a regional sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 169, 15–24. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.11.029

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H. & 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), p.150088.

Samantha Sherman, C., Heupel, M. R., Johnson, M., Kaimuddin, M., Sjamsul Qamar, L. M., Chin, A., & Simpfendorfer, C. A. (2020). Repeatability of baited remote underwater video station (BRUVS) results within and between seasons. *PLoS ONE*, 15(12), 1–18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244154

Schmid, K., Reis-Filho, J.A., Harvey, E. *et al.* Baited remote underwater video as a promising nondestructive tool to assess fish assemblages in clearwater Amazonian rivers: testing the effect of bait and habitat type. *Hydrobiologia* 784, 93–109 (2017). https://doi-org.ezproxy.ub.gu.se/10.1007/s10750-016-2860-1

Staehr, P. A. U., Dahl, K., Buur, H., Göke, C., Sapkota, R., Winding, A., … Sundberg, P. (2022). Environmental DNA Monitoring of Biodiversity Hotspots in Danish Marine Waters. *Frontiers in Marine Science*, 8 (January), 1–15. https://doi.org/10.3389/fmars.2021.800474

Strand, M., Aronsson, M., & Svensson, M. (2019). Klassificering av främmande arters effekter på biologisk mångfald i Sverige – ArtDatabankens risklista. ArtDatabanken Rapporterar 21. ArtDatabanken SLU, Uppsala. https://www.artdatabanken.se/globalassets/ew/subw/artd/6-publikationer/29.-artdatabankens-risklista/rapport_klassifisering_av_frammande_arter2.pdf

Sundberg, P., Axberg, A., Bravell, F., Wocken, Y., Ahlsen, J., & Bergkvist, J.

(2021). Övervakning av svartmunnad smörbult (*Neogobius melanostomus*) – pilotstudie med eDNA och provfiske i Göteborgs skärgård 2021. Länsstyrelsen Västra Götaland. https://catalog.lansstyrelsen.se/store/13/resource/2637

Verliin, A., Kesler, M., Svirgsden, R., Taal, I., Saks, L., Rohtla, M., Hubel, K., Eschbaum, R., Vetemaa, M. & Saat, T. (2017). Invasion of round goby to the temperate salmonid streams in the Baltic Sea. *Ichthyological Research*, 64 (1), 155-158. https://doi.org/10.1007/s10228-016-0537-4

Inventering av svartmunnad smörbult med betade kameror och eDNA runt Gotland

Denna rapport är framtagen av Länsstyrelsen i Gotlands län och Göteborgs Universitet

GÖTEBORGS UNIVERSITET

Länsstyrelsen Gotlands län

www.lansstyrelsen.se/gotland