

# NEMOte BARCODing

Förbättrad miljöövervakning av  
Östersjöns bentiska ekosystem

---

Henrik Sandberg, Dandan Isabell-Shen,  
Elias Broman, Mohammed Ahmed,  
Oleksandr Holovachov,  
Francisco Nascimento

RAPPORT 7131 | MARS 2024



# NEMOte BARCODing

Förbättrad miljöövervakning av Östersjöns bentiska ekosystem

av Henrik Sandberg, Dandan Isabell-Shen, Elias Broman, Mohammed Ahmed,  
Oleksandr Holovachov och Francisco Nascimento

**Beställningar**

Ordertel: 08-505 933 40

E-post: natur@cm.se

Postadress: Arkitektkopia AB, Box 110 93, 161 11 Bromma

Internet: [www.naturvardsverket.se/publikationer](http://www.naturvardsverket.se/publikationer)

**Naturvårdsverket**

Tel: 010-698 10 00

E-post: [registrator@naturvardsverket.se](mailto:registrator@naturvardsverket.se)

Postadress: Naturvårdsverket, SE-106 48 Stockholm

Internet: [www.naturvardsverket.se](http://www.naturvardsverket.se)

ISBN 978-91-620-7131-8

ISSN 0282-7298

© Naturvårdsverket 2024

Tryck: Arkitektkopia AB, Bromma 2024

Omslagsfoto: Henrik Sandberg



# Förord

Här presenteras resultaten från forskningsprojektet ”NEMOte BARCODing – Förbättrad miljöövervakning av Östersjöns bentiska ekosystem”. Projektet är ett av åtta projekt som genomförts inom forskningssatsningen DNA-metoder inom miljöövervakning.

Med forskningsområdet ville Naturvårdsverket och Havs- och vattenmyndigheten stödja forskning som kan bidra till en bättre och effektivare miljöövervakning genom införande av DNA-baserad analysteknologi.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag.

Rapporten har skrivits av Henrik Sandberg (Stockholms universitet, Institutionen för ekologi, miljö och botanik), Dandan Isabell-Shen (Stockholms universitet, Institutionen för ekologi, miljö och botanik), Elias Broman (Stockholms universitet, Institutionen för ekologi, miljö och botanik), Mohammed Ahmed (Naturhistoriska riksmuseet, Zoologi), Oleksandr Holovachov (Naturhistoriska riksmuseet, Zoologi) och Francisco Nascimento (Stockholms universitet, Institutionen för ekologi, miljö och botanik). Rapporten har granskats för vetenskaplig kvalitet av Jon Thomassen Hestetun (NORCE, Norge) och för praktisk relevans av Michael Haldin (Miljöövervakningsenheten, Havs- och vattenmyndigheten).

Författarna svarar för rapportens innehåll.

Stockholm, mars 2024

Marie Uhrwing  
Avdelningschef, Hållbarhetsavdelningen

# Innehåll

<b>Förord</b>	3
<b>Sammanfattning</b>	6
<b>Summary</b>	7
<b>1. Inledning</b>	8
<b>2. Fältprovtagning och beskrivning av DNA-streckkodning</b>	13
<b>3. Arbetspaket 1. Förbättrade referensbibliotek för Östersjöns nematoder</b>	17
3.1 Bakgrund och syfte	17
3.2 Metod	18
3.3 Resultat och diskussion	19
<b>4. Arbetspaket 2. Kvantifiering av nematod-samhällen med DNA-streckkodning</b>	21
4.1 Bakgrund och syfte	21
4.2 Metod	22
4.2.1 Experiment med artificiella nematod-samhällen	22
4.2.2 DNA-streckkodning av makrofaunaprover	25
4.2.3 Statistik	25
4.3 Resultat	26
4.3.1 Experiment med artificiella nematod-samhällen	26
4.3.2 Makrofauna DNA-streckkodning	30
4.4 Fortsatt arbete inom Arbetspaket 2	33
4.5 Diskussion	33
<b>5. Arbetspaket 3. Verktygen för att bestämma ekologisk status med nematoder</b>	39
5.1 Bakgrund och syfte	39
5.2 Metod	41
5.2.1 Beskrivning av prover och data	41
5.2.2 Formulering av ett Nematod-BQI index	42
5.2.3 Andra index	48
5.2.4 Statistik	49
5.3 Resultat	49
5.3.1 Mångfald och jämförelse mellan artantalsfaktorn och släktesfaktorn	49
5.3.2 Nematod-BQI, känslighetsfaktorn och känslighetsvärden	51
5.3.3 Statusklassning med Nematod-BQI – BQI-Sens <sub>0.33</sub>	55
5.3.4 Övriga index	57
5.4 Fortsatt arbete inom Arbetspaket 3	58
5.5 Diskussion	59

<b>6. Förslag. Pilotprogram för nematod-övervakning</b>	66
<b>7. Slutsatser</b>	70
<b>Tack</b>	71
<b>Källhänvisning</b>	72
<b>Publikationer och data</b>	83
<b>Bilaga 1. Metods-specifikationer Biblioteks-förberedelser</b>	85
<b>Bilaga 2. Tabell över uppladdade referens-sekvenser</b>	88
<b>Bilaga 3. Arbetspaket 2. Kompletterande resultat</b>	95
<b>Bilaga 4. Tabeller sekvensdata från arbetspaket 3</b>	97
<b>Bilaga 5. Känslighetsvärden för nematoderna</b>	98
<b>Bilaga 6. Arbetspaket 3. <math>S_{0,05}</math> kompletterande figurer</b>	99
<b>Bilaga 7. Arbetspaket 3. <math>DO_{0,05}</math> kompletterande figurer</b>	102
<b>Bilaga 8. Provtagna stationer</b>	105

# Sammanfattning

Förändringar av ekosystem och hot mot biologisk mångfald, samt de på denna mångfald vilande ekosystemtjänsterna, har skapat ett behov av mer robusta och kostnadseffektiva miljöövervakningsmetoder. Projektet NEMOte BARCODing har undersökt om de frilevande nematoderna kan hjälpa oss att fylla detta behov. Metastreckkodning (*metabarcoding* på engelska), en av de moderna DNA-metoderna, har möjliggjort att meiofauna-organismer som nematoder effektivt kan provtas. Nematoderna är en av de mest mångfaldshaltiga organismgrupperna i världen, och de har visat sig vara bra indikatorer på ekosystems hälsa och förändringar i miljön. I Östersjön, där traditionellt enbart större organismer, makrofauna, har använts, kan nematoderna tillföra värdefull information. Då antal makrofauna-arter i Östersjön är lågt har bedömningar av ekosystemhälsa baserat på makrofauna mindre upplösning än bedömningar baserat på de mer mångfaldiga och abundanta nematod-samhället.

Det finns dock hinder för DNA-streckkodning ska för att övervaka nematoder i Östersjön: 1. Bristande täckning av nematod-arter i nuvarande referensdatabaser. 2. Bristande kunskap om streckkodningsmetoders förmåga att kvantifiera nematod-samhället och återspegla samhällskompositionen i miljöerna som provtas. Och 3. Bristen på verktyg för att bedöma ekosystemhälsa och ekologiska status från data över nematod-samhället. NEMOte BARCODing har bidragit till att överkomma dessa brister och därigenom till att möjliggöra miljöövervakning av Östersjöns nematoder.

I Arbetspaket 1 förbättrade NEMOte BARCODing existerande referensdatabaser genom att ladda upp referenssekvenser av 18S och 28S rRNA-markörgenerna för 110 av Östersjöns nematod-arter. I Arbetspaket 2 utvärderades sekvenseringsmetoders lämplighet för miljöövervakning. 18S-streckkodning med TAREuk primerparen fungerade bäst av de testade metoderna, gav en god bild av nematod-samhället, och rekommenderas därav för nematod-övervakning i Östersjön. I Arbetspaket 3 har NEMOte BARCODing utvecklat ett verktyg för statusklassning med nematod-data, Nematod-BQI ( $BQI_{nem}$ ), med utgångspunkt i det BQI som används inom svensk miljöövervakning. Andra potentiella verktyg för nematod-övervakning utforskades även och en karta ritades för Nematod-BQI:s framtida utvecklingen, med potentiell inkludering av fler meiofauna-grupper som ett alternativ.

Slutligen så förslogs ett pilotprogram för streckkodningsbaserad nematod-övervakning, med rekommenderade metoder, provtagningsupplägg och statusklassningsverktyg ( $BQI_{nem}$ ). De frilevande nematoderna kan säga oss mycket om ekosystemens hälsa och arbetet inom NEMOte BARCODing har förhoppningsvis bidragit till att denna information förmedlas.

# Summary

Changes to ecosystems and threats to biodiversity and ecosystem services have led to a need for robust and cost-effective environmental monitoring methods. NEMOte BARCODing has explored the use of the free-living nematodes for environmental monitoring, and specifically their sampling with metabarcoding methods. Modern DNA-sequencing methods such as metabarcoding allow for cost effective monitoring of the meiofauna sized nematodes, meiofauna being animals between 1 mm and 45 µm. The monitoring of the benthic ecosystems in the Baltic Sea is currently based mainly on the softbottom macrofauna communities, which leaves out the meiofauna fraction where the majority of the metazoa diversity exists. A monitoring program based on nematodes would improve monitoring in the Baltic where the low species richness of macrofauna is a hinderance for high resolution status assessments. Metabarcoding based monitoring of meiofauna will provide additional information to stakeholders as well as robustness and cost effectiveness in monitoring programs.

There are however some obstacles that need to be overcome: 1. Lacking coverage of nematode species in current reference databases. 2. Lack in knowledge about how well metabarcoding quantifies nematode communities and how well it represents the community composition of the sampled habitats. And 3. The lack of tools to practically facilitate their inclusion into status assessments. NEMOte BARCODing have sought to alleviate these obstacles to free the true potential of nematode monitoring in the Baltic Sea.

In Work Package 1 NEMOte BARCODing improved the reference databases for the 18S and 28S rRNA marker genes of 110 Baltic Sea nematode species by uploading reference sequences for these. Work Package 2 constituted a proof of concept for the ability of metabarcoding to quantify the patterns in nematode communities. Metabarcoding of the 18S rRNA marker gene with the TAREuk primers performed the best of the methods tested, and was thus recommended for nematode monitoring. In Work Package 3 a tool for nematode status classification, a Nematode-BQI (BQI<sub>nem</sub>), was developed, with the BQI used in Swedish environmental monitoring as a starting point. Multiple methods and nematode monitoring tools were explored, and a path for future development of BQI<sub>nem</sub> was drawn, with inclusion of other meiofauna groups being a possibility.

In concluding, a pilot program for nematode monitoring was suggested, with recommendations of the method, sampling arrangement and status classification tools to be used (BQI<sub>nem</sub>). The free-living nematodes have a lot to tell us about the health of ecosystems, hopefully the developments within NEMOte BARCODing will allow for their message to be heard.



# 1. Inledning

Förändringar av ekosystemen och hot mot biologisk mångfald och ekosystemtjänster har lett till ett behov av robusta och kostnadseffektiva miljöövervakningsmetoder. Hur kan de frilevande nematoderna bidra till att fylla detta behov? Det är frågan som projektet ”NEMOte BARCODing: Förbättrad miljöövervakning av Östersjöns bentiska ekosystem” sökt att besvara. NEMOte BARCODing inleddes 2019 i samband med forskningssatsningen ”DNA-metoder inom miljöövervakning”, en forskningssatsning från Naturvårdsverket i samarbete med Havs och vattenmyndigheten. Nematoderna (rundmaskar, fylum *Nematoda*) lever i alla miljöer. I frilevande tillstånd är de nästan uteslutande i storleksklassen meiofauna, djur mellan 1 mm och 45 µm, och de är en av de mest mångfaldshaltiga organismgrupperna i världen (Appeltans m.fl., 2012). Metastreckkodning (*metabarcoding* på engelska) är en av metoderna som kommit ur utvecklingen av modern DNA-sekvensering. Denna metod möjliggör kostnadseffektiva studier av nematod-samhällen (Fonseca m.fl., 2010; Aylagas m.fl., 2018), vilka kräver expertkunskap och stor tidsåtgång att studera med traditionella morfologiska metoder där djuren artbestäms från deras synliga egenskaper. Dessa moderna metoder öppnar upp för användning av nematoder och andra meiofauna-grupper inom miljöövervakningsprogram, något som skulle förbättra miljöövervakningen av havsmiljöer som Östersjön där behovet av övervakning är stor och enbart större djur tidigare använts.

I Östersjön, en av världens mest påverkade havsmiljöer (Reusch m.fl., 2018), har bottenfauna övervakats i över 50 år (Nygård m.fl., 2020). Övervakning av bentiska miljöer är effektivt då övergödning eller föroreningar för eller senare påverkar havsbotten, vars annars relativt stabila djursamhälle snabbt förändras som svar på dessa (Pearson och Rosenberg, 1978; Heip, 1995). Havsbotten utgör en stor del av jordens yta och deras biologiska mångfald är kritisk för ekosystems funktion och ekosystemtjänster (Snelgrove, 1997; Solan m.fl., 2008). Östersjön ekosystem utstår stor påfrestning från övergödning, och det låga antalet arter gör ekosystemfunktionen i havet extra sårbart mot förluster i diversitet. Bottenlevande organismer bidrar till ekosystemprocesser som denitrifiering och mineralisering av organiskt material, vilka mitigerar effekten av övergödning, och påskyndar nedbrytningen av föroreningsämnen (Näslund m.fl., 2010; Nascimento m.fl., 2012; Bonaglia m.fl., 2014; Gammal m.fl., 2017). Men utbredningen av tillfällig eller permanent syrebrist i Östersjön (Diaz och Rosenberg, 2008; Kuliński m.fl., 2022) hotar denna biologiska mångfald, och därigenom ekosystemtjänsterna, vilket kan ytterligare förvärra övergödningens effekter (Norkko m.fl., 2015; Meier m.fl., 2022; Viitasalo och Bonsdorff, 2022). Stora delar av djupare Egentliga Östersjön är syrefria (Kuliński m.fl., 2022), och även kustområden drabbas av säsongsmässig och tillfällig syrebrist som ett resultat av övergödning (Rosenberg och Loo, 1988; Cederwall och Elmgren, 1990; Conley m.fl., 2011). För att nå de svenska miljömålen ”Giftfri miljö”, ”Ingen övergödning” och ”Hav i balans samt levande kust och skärgård” krävs tillförlitlig miljöövervakning som möjliggör att förvaltningsbeslut kan utvärderas. Utveckling av metoder som förbättrar precisionen i övervakningsresultat och vår förmåga att bedöma dessa ekosystems hälsa och mångfald är därav viktigt. DNA-streckkodning av meiofauna-organismer som nematoder är kostnadseffektivt (Fonseca m.fl., 2010)

och skulle tillföra information ekosystemens hälsa (Balsamo m.fl., 2012). Därav skulle det förbättra tillförlitligheten hos de habitatstatusklassningar som görs i enlighet med Vattendirektivet (Europaparlamentets och rådets direktiv 2000/60/EC, 2000) och Havsmiljödirektivet (Europaparlamentets och rådets direktiv 2008/56/EG, 2008), samt ge förvaltare bättre möjlighet att förstå, förutse och åtgärda konsekvenser av miljöförändring.

Bottenlevande makrofauna, djur större än 1 mm, ingår i svenska övervakningsprogram som underlag för att bestämma ekologisk status i kust och havsmiljö, både som indikator på övergödning och som mått på de bentiska habitatens ekologiska hälsa (HaV, 2012, 2019, 2020). Denna övervakning utelämnar dock merparten av den biologiska mångfalden och den del av djursamhället vars sanna diversitet ännu är ett kunskapsgap, nämligen meiofaunan (Creer m.fl., 2010). Meiofauna utgör en distinkt grupp från de större makrofauna-organismerna i ekosystemet och de fyller unika roller i ekosystemprocesserna (Coull, 1999; Schratzberger och Ingels, 2018; Bonaglia och Nascimento, 2023). Detta innebär att relevant, och potentiellt avgörande, information idag saknas från bedömningar av ekosystemens hälsa. Det låga antalet makrofauna-arter i Östersjön, samt artrikedomens beroende av salthaltsgradienten, utgör också ett problem för miljöövervakning då det försvårar bedömningen av spatiotemporala förändringar (Ankar och Elmgren, 1978; Zettler m.fl., 2007). Antalet meiofauna-arter i Östersjön är långt högre än det för makrofauna, speciellt i de nordligaste delarna som naturligt har ett väldigt lågt antal makrofauna-arter (Elmgren m.fl., 1984; Ólafsson och Elmgren, 1997). I de djupare områden av Egentliga Östersjön, som är kraftigt påverkade av syrebrist, är de större djuren nästintill helt frånvarande medan meiofauna fortfarande förekommer (Norkko m.fl., 2015; Broman m.fl., 2021). Meiofaunans bentiska livscykel och dess kontinuerliga reproduktion gör att de snabbt reagerar på miljöförändringar (Giere, 2009). Om meiofauna inkluderades i miljöövervakning skulle de därav kunna förbättra tillförlitligheten hos statusbedömningar, speciellt i områden med få eller inga makrofaunaorganismer, och tillföra värdefull information till förvaltare (Schratzberger, 2012).

Av meiofauna-grupperna är nematoder de mest mångfaldiga och abundanta, det uppskattas finnas över 1 million nematod-arter, men endast 27 000 (varav de marina utgör runt 11 400) är beskrivna (Coomans, 2000; Appeltans m.fl., 2012; Schratzberger, 2012). Nematod-samhället är en bra indikator på miljöförändringar och dess användning för detta syfte har förekommit i över 40 år (Alves m.fl., 2013; Ridall och Ingels, 2021). Miljöövervakning av nematoder är ännu inte utbredd (Ridall och Ingels, 2021), men forskning om deras användning som indikatorer på ekologisk status har ökat (di Montanara m.fl., 2022). De är toleranta mot syrebrist (Modig och Ólafsson, 1998) och ibland den enda faunagruppen som förekommer i kraftigt förorenade miljöer (Armenteros m.fl., 2010). Denna tolerans är också artspecifik, och nematod-samhällets komposition förändras snabb som svar på störning och miljöförändringar (Balsamo m.fl., 2012; Semprucci m.fl., 2015). Information om nematodernas artsammansättning kan därav möjliggöra att vi tidigare, och tydligare, ser förändringar av ekosystemhälsa, inklusive försämringar och återhämtning i kraftigt påverkade miljöer. Om den ekologiska hälsan i Östersjöns djupare och syrefattiga habitat skulle kunna bedömas med större precision och med en biologisk indikator skulle det stärka den målbaserade förvaltningen gällande övergödningens negativa effekter. Ett hinder för att inkludera nematoder och annan meiofauna i miljöövervakning är dock kostnaden och svårigheten att artbestämma

dem, något som kräver både tid och expertkunskap. Men moderna metoder som DNA-streckkodning kan användas för att överkomma detta hinder (Creer m.fl., 2010; Balsamo m.fl., 2012; Aylagas m.fl., 2018; Broman m.fl., 2019).

DNA-streckkodning baserar sig på sekvensering av artspecifika markörgener i de provtagna organismernas genom, dess arvs massa. Till skillnad från morfologiska metoder där varje individ artbestäms för sig så kan DNA-streckkodning användas för att bestämma hela samhällen samtidigt (Aylagas m.fl., 2018). Detta möjliggörs av nyare metoder där massiv parallell sekvensering genomförs (vars applicering inom DNA-streckkodning brukar kallas metastreckkodning, *metabarcoding* på engelska). Metoden kräver inte expertkunskap om varje art, utan de sekvenserade DNA-streckkoderna jämförs mot en referensdatabas (Hovmöller m.fl., 2017). Streckkodningsmetoder har visat på existensen av långt högre mångfald än vad som tidigare varit känt eftersom de effektivt kan användas även på mindre organismer (Fonseca m.fl., 2010; Lallias m.fl., 2015; Nascimento m.fl., 2018). Dessa metoder har visat sig vara potentiellt mer kostnadseffektiva än traditionell provtagning, och passande för miljöövervakningssyften (Aylagas m.fl., 2018; Keeley m.fl., 2018). De möjliggör därigenom miljöövervakning av nematoder och andra meiiofaunagrupper. Metoden begränsas dock av bristfälligheten hos de nuvarande referensbibliotek (Dell'Anno m.fl., 2015; Holovachov m.fl., 2017; Hovmöller m.fl., 2017). Nematod-arter varierar i egenskaper så som livshistoria och tolerans. För att representera denna mångfald är information om samhällskompositionen på åtminstone släktesnivå nödvändig (Moens och Vincx, 1997). Vårt projekt NEMOte BARCODing har sökt överkomma detta hinder genom att förbättra referensdatabaserna för Östersjöns nematoder. Detta arbete utgjorde det första av tre Arbetspaket inom NEMOte BARCODing. Genom Arbetspaket 1 har projektet därmed bidragit till att öka precisionen för DNA-streckkodning av nematoder samt till möjligheten att fylla kunskapsluckor om deras mångfald i Östersjön. I förlängningen stärker detta säkerheten i data och i statusklassningar av Östersjöns habitat som görs med nematod-streckkodning.

Ett andra hinder för DNA-streckkodning är kunskapsluckor om hur väl den relativa fördelningen av sekvensläsningar stämmer överens med den faktiska samhällskompositionen, fördelningen av arter, individer och biomassa, i nematod-samhället. Både faktorer relaterade till varje arts genom och potentiella metod-bias kan påverka utkomsten och leda till snedfördelningar i resultatet (Porazinska m.fl., 2010; Dell'Anno m.fl., 2015; Piñol m.fl., 2015). Korrelationer mellan sekvensläsningar och biomassa har dock hittats för bentiska organismer (Elbrecht och Leese, 2017; Bista m.fl., 2018) och korrigeringar i dataanalysen kan göras om en systematisk snedfördelning är känd (Bik m.fl., 2013; Piñol m.fl., 2015; Elbrecht och Leese, 2017). Vilka sekvenseringsmetoder och genmarkörer som är bäst lämpade för att kvantifiera samhällskomposition skiljer sig mellan djurgrupper och är ännu inte klarlagt för nematoderna. I vårt andra Arbetspaket har vi försökt besvara frågorna: Vilka metoder ger bäst representation av det faktiska nematod-samhället och vilka metod-bias finns som ger en skev representation av detta samhälle? Detta undersöktes experimentellt för 8 potentiella indikatorsläkten med god utbredning i Östersjön. Streckkodningsmetoder har i Arbetspaket 2 även testats på makrofauna-prover för att undersöka metodernas potential inom makrofauna-övervakning. Genom att belysa dessa frågor förbättras vår förmåga att omsätta data från DNA-streckkodningsstudier till kunskap om samhällskomposition och i förlängningen ekologisk status.

Slutligen så behövs metoder och verktyg för statusklassning med nematoder. Detta inkluderar både praktiska fält- och labbmetoder samt det sammanfattande verktyg, ett index, som statusklassningen ska basera sig på. Utformning och formulering av dessa metoder utgör ett nödvändigt underlag för att en nematod-bedömningsgrund ska kunna definieras. Igenom arbetet i NEMOte BARCODing så har lämpligheten hos olika DNA-streckkodningsmetoder praktiskt utvärderas, med målet att utveckla ett standardiserat metastreckkodnings-protokoll för övervakning av Östersjöns nematoder. I det tredje Arbetspaketet utvecklades statusklassningsverktyg som kan användas för just streckkodningsdata över nematod-samhället. Index som används för att bedöma ekosystemhälsan hos bottenlevande fauna påverkade av störning har ofta en liknande struktur, som utgår från arters olika känslighet (Diaz m.fl., 2004; Pinto m.fl., 2009). BQI (benthic quality index), som används i Sverige, har fungerat väl särskilt i de artrika västkusthabitaten, där känslighetsvärden har kunnat räknats ut empiriskt. Men i det artfattiga Östersjö habitatet så är BQI mindre robust mot förändringarna i mångfald, och känslighetsvärden är i Östersjön baserade på expertbedömning (Rosenberg m.fl., 2004; Zettler m.fl., 2007; Leonardsson m.fl., 2009). De icke empiriska känslighetsvärdena samt det låga antalet arter sänker den potentiella upplösningen med vilken statusklassning kan göras. Ett index för nematod-övervakning, ett Nematod-BQI, skulle möjliggöra att fördelarna av ett sådant övervakningsprogram i fråga om kostnadseffektivisering kan utnyttjas, samtidigt som det skulle bidra med en robust metod för statusklassning. De verktyg som utvecklats i NEMOte BARCODing kan inom miljöövervakning ge värdefull information till förvaltare, speciellt om den ekologiska statusen i Östersjöns mest påverkade miljöer.

Målen för NEMOte BARCODing har varit:

1. Att förbättra referensdatabaser för marin- och bräcktvattnensnematoder i Östersjön.
2. Att undersöka hur väl sekvenseringsdata från DNA-streckkodning överensstämmer med den faktiska fördelningen av individer och biomassa mellan nematod-arter. Och genom detta bedöma om eventuella metod-bias utgör ett problem samt om nödvändigt hitta korrigeringar för dessa. Liknande undersökningar kommer även göras för DNA-streckkodning av Östersjöns makrofauna, som potentiellt kan provtas med samma metod.
3. Att jämföra DNA-streckkodning och sekvenseringsmetoder ur lämplighets-synpunkt specifikt för övervakning av nematod-samhällen, samt att baserat på detta arbete ta fram en rekommendation till standardiserat metastreckkodnings-protokoll för ett sådant miljöövervakningsprogram.
4. Att utveckla potentiella förvaltningsverktyg, och specifikt ett Nematod-BQI, vilka tillsammans med ett standardiserat metodprotokoll kan användas som bedömningsgrund för statusklassning. Genom det utforskande arbetet för detta kommer projektet bidra till utvecklingen av skraddarsydd förvaltningsverktyg som är lämpliga för att detektera och kvantifiera regionala och lokala miljöförändringar.

Genom dessa mål har NEMOte BARCODing utvecklade metoder som kan förbättra miljöövervakningen av Östersjön. Men de utvecklade metoderna har också potential för generalisering, och applicering av dessa i västkusthabitat skulle utgöra en intressant fortsättning på projektet. Vi hoppas att rapportens innehåll leder till fortsatt forskning och vidareutveckling av sekvenseringsbaserade metoder för miljöövervakning. Dessa metoder har stor potential att öka vår kunskap om ekosystemens hälsa och därigenom förbättra den ekosystembaserade förvaltningen. De har även potentialen att på sikt kraftigt öka kostnadseffektiviteten inom miljöövervakning. En bred användning av metoderna inom miljöövervakning kommer medföra skalfördelar, och med tiden kommer metoderna också bli alltmer effektiva. Tidig implementering av sekvenseringsmetoder i välstrukturerade miljöövervakningsprogram skulle möjliggöra utvärdering och förbättring, och därigenom långsiktigt bidra till att realisera denna potential. Ett övervakningsprogram av Östersjöns nematoder är ett utmärkt exempel på ett sådant program, vars implementering även har mycket att bidra med i dagsläget. Vi är övertygade om att nematoderna har värdefull information att ge till förvaltare, och hoppas att verktygen som presenteras i rapporten möjliggör att denna information förmedlas.

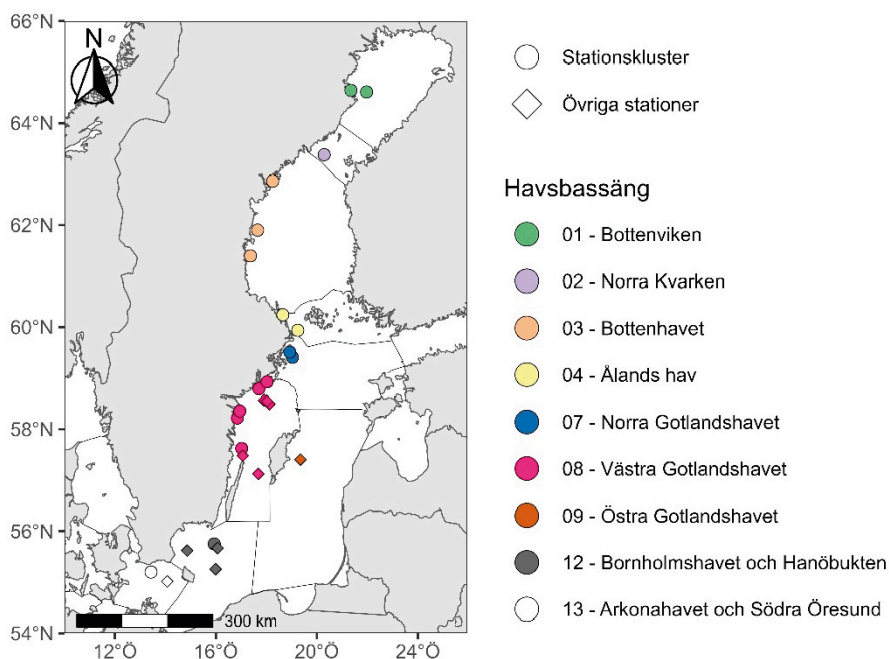
## 2. Fältprovtagning och beskrivning av DNA-streckkodning

Östersjön har en karakteristisk salthaltsgradient från norr till syd, vilket strukturerar havets biologiska mångfald (Segerstråle, 1957). Syretillståndet på havsbotten spelar också en stor roll i att forma Östersjöns biologiska samhällen, och djupare delar av Egentliga Östersjöns är ofta syrefattiga eller helt syrefria i vad som vanligtvis kallas döda zoner (Norkko m.fl., 2015; Meier m.fl., 2022). För att fånga in variationen i miljöförhållanden, mångfald och samhällskomposition mellan Östersjöns habitat har NEMOte BARCODing haft som mål att samlat in prover från hela Sveriges östkust. Genom detta kan vi täcka in den naturliga spridning som finns i samhällskomposition och diversitet hos Östersjöns meiofauna och nematod-samhällen. För att lyckas med detta samarbetade projektet nära med miljöövervakningsprogrammen som drivs av Stockholms universitet och Umeå universitet för den regionala och nationella miljöövervakningen (miljöövervakningsprogrammet av sedimentlevande makrofauna).

Prover togs från Östersjön mellan 2015 och 2019 till projektet, från totalt 81 miljöövervakningsstationer. Stationerna är utspridda i längs svenska kusten i Östersjön från Bottniska viken till Arkonahavet. De flesta stationer tillhör stationskluster, medan andra är mer utspridda och utgör historiska miljöövervakningsstationer. Stationerna låg i både kust och utsjöområden, och tillhörde 26 olika vattenförekomster. Karta över provtagna stationskluster och enskilda stationer ses i Figur 1, och medelvärde samt omfång av miljövariabler för de provtagna havsbassängerna kan ses i Tabell 1.

**Tabell 1. Havsbassänger och miljövariabler för de provtagna stationerna, givet som medelvärde (omfång). Fullständig lista över provtagna stationer, vilka stationskluster de tillhör och värden för abiotiska variabler finns i Bilaga 8.**

Havsbassäng	Djup (m)	Temperatur (C°)	Salinitet (PSU)	Syremättnad (mg/l)
01 – Bottenviken	78 (27–125)	2.3 (0.8–4.9)	3.2 (2.6–3.7)	10 (9.4–10.5)
02 – Norra Kvarken	87 (78–92)	3.3 (3.2–3.3)	5.9 (5.8–5.9)	7 (6.8–7.2)
03 – Bottenhavet	61 (17–84)	2.3 (1.9–2.8)	5.3 (5.1–5.6)	7.9 (2.4–10.1)
04 – Ålands hav	72 (24–123)	4 (2.8–5.3)	6 (5.1–6.8)	9.4 (8–10.8)
07 – Norra Gotlandshavet	48 (24–76)	20.9 (4.4–63.4)	7.5 (4.4–9)	8.6 (2–11.5)
08 – Västra Gotlandshavet	45 (10–124)	18.8 (3–72.3)	8.6 (4.4–10.3)	7.9 (0–11.8)
09 – Östra Gotlandshavet	111 (111–112)	6.7 (6.2–7.3)	11.1 (10.4–11.6)	0.2 (0.1–0.3)
12 – Bornholmshavet och Hanöbukten	79 (64–90)	7.5 (6.7–8.8)	15.9 (9.3–18.9)	1.7 (0.2–4.7)
13 – Arkonahavet och Södra Öresund	42 (39–48)	11.8 (4.5–55.8)	10.3 (7.8–16)	7.9 (5–11.3)



Figur 1. Karta över östersjön och med de provtagna stationsklustren markerade, stationerna är färgade efter vilken havsbassäng de tillhör. Linjer för avgränsning av havsbassängerna tagna från HELCOM. Fullständig lista över provtagna stationer och vilka stationskluster de tillhör finns i Bilaga 8.

I fält togs sedimentprov med kajakhämtare (där prov tas med rör som har en area på 50 cm<sup>2</sup>). De översta 2 cm av sedimentet avskildes och samlades in. Ett antal av proven var ämnade för både DNA-extraktion och morfologisk analys. Dessa prov förvarades i DESS (en lösning som innehåller dimetylsulfoxid, dinatrium-etylendiamintetraättiksyra, och mättad natriumklorid) som möjliggör både morfologiska och DNA-baserade analyser, till skillnad från förvaring i formalin (Yoder m.fl., 2006; Bik m.fl., 2009). Prover som var ämnade till endast DNA-extraktion konserverades genom att frysas i -20 °C. Efter 2019 har även flera prov samlats in i samband med miljöövervakningen för att möjliggöra en fortsättning på arbetet, om än inte i lika stor skala. Planen var att fortsätta med samma provtagningsupplägg som genomförts 2019 under efterföljande år, men på grund utav Covid-19 pandemin så fokuserades arbetet i stället på redan insamlade prover.

På labb gjordes densitetsextrahering av meiofauna organismer från sedimentproverna enligt Nascimento m.fl. (2008). För denna metod används Levasil Colloidal Silica (H.C. Starck). Sedimentprover (100 g av homogeniserat prov per kajacrör) sållas med ett såll vars nät är 40 µm, sedimentfraktionen som stannar i sållet innehåller därmed meiofaunan. Sedimentet förs sedan över till en Erlenmeyerkolv tillsammans med Levasil-lösningen, och kolven skakas. Blandningen låts vila i 5 minuter. Under denna tid flyter meiofauna upp medan sedimentpartiklar sjunker. Blandningen dekanteras och den överförda volymen som innehåller meiofauna tvättas med vatten vars salinitet matchar provstationens. Denna process repeteras ytterligare två gånger, en andra gång med 5 minuters vilotid efter skakning och en tredje gång med 30 minuters vilotid. De dekanterade volymerna sållas ytterligare en gång genom

det 40 µm maskiga sållet, och innehållet i sållet förs till sist över till en förvarings-behållare. Max 10 ml volym används för att föra över meiofaunan från sållet. Proverna förvarades sedan i -20 °C. Vissa av proverna användes för morfologisk analys och andra genomgick DNA-extrahering direkt.

Alla prov från fält, experiment och isolerade nematod-arter som var ämnade för DNA-streckkodning genom gick sedan biblioteksförberedelse (*library preparation* på engelska), som är förberedelserna för streckkodnings-sekvensering där PCR-metoder (polymeraskedjereaktion, *polymerase chain reaction* på engelska) används. Stegen för biblioteksförberedelse för metastreckkodning är i breda drag 1. DNA-extrahering, 2. Första PCR-amplifieringen – markörgens-amplifiering, 3. Andra PCR-amplifieringen – indexering av prover, 4. Renande av amplifierat DNA i proverna, 5. Sammanföring av prover till det slutgiltiga biblioteket. För metastreckkodning är dessa steg oftast gemensamma, men de varierar i specifikationerna så som använda material vid PCR-amplifiering, PCR-program, där proven sätts i en termocykler och genomgår olika cykler vid specifika temperaturer, samt inkluderingen av rengöring av DNA och PCR-produkter som mellansteg. Streckkodning som inte är av flera prover, utan av enskilda prov eller individer, som i Arbetspaket 1, är inte metastreckkodning och då indexerar inte proverna. Nedan följer en kort sammanfattning av stegen. Metoderna i varje Arbetspaket kommer beskrivas i korthet och en mer detaljerad lista på specifi-kationer för respektive biblioteksförberedelse kommer finnas i Bilaga 1.

I ett första steg så genomförs extrahering av DNA från de organismer som ska sekvenseras, detta görs oftast med kommersiella DNA-extraherings kit. Mängden DNA som har extraherats samt kvalitén på proven mäts efteråt för att kunna identifiera hinder för PCR-amplifiering. Ibland måste DNA-proven genomgå ytterligare ett renande steg för att bli av med ämnen som blockerar amplifieringen. Generellt så görs 3 replikat per prov under PCR-amplifieringsstegen, som sammanförs på slutet. I första PCR-amplifieringen så amplifieras genmarkören med hjälp av två hophörande primrar, en ”framåt” och en ”bakåt” primer. Dessa binder till DNA i templatet (DNA från de sekvenserade organismerna) vid specifika positioner på markörgenen, och vid PCR-amplifiering sker en stor ökning av de korta sekvenssegment som ligger mellan basparen som primrarna bundit till. Detta sker med hjälp av ett DNA-polymeras (vanligen Taq-polymeras) och andra nödvändiga komponenter som har adderats till proven. PCR-buffertlösningar som innehåller de nödvändiga ingredienserna, vanligtvis kallad *master mix* på engelska, används ofta. De amplifierade, korta sekvenssegmenten är våra streckkoder, amplikons, som används för att bestämma arten. De cykliska momenten i PCR-programmen behöver ibland optimeras, och resultatet testas efteråt med gelelektrofores för att säkerställa att amplifiering har skett.

PCR-Ingredienserna, överblivna primers och Taq-polymeras, tvättas generellt från proven innan den andra omgången av PCR-amplifiering som görs vid meta-streckkodning. Vid metastreckkodning där flera prov sekvenseras samtidigt görs den andra omgången för att kunna särskilja prov i utvunna sekvenseringsdata. Indexerings-primrar, som binder till använda markörgensprimar, används i unika kombinationer för de olika proverna vilket gör att de kan särskiljas. Efter index-amplifieringen så rengörs proven och endast sekvenssegment med en basparslängd som matchar den önskade streckkoden behålls. Detta exkluderar diverse biprodukter



från PCR-processen. Till sista så sammanförs replikat, mängden DNA i varje prov mäts (med Qubit) och sist sammanförs alla prov till ett gemensamt provrör som då utgör det färdiga biblioteket. En specifik volym per prov förs över för att få en lika-fördelning av koncentration och molarmängd av varje prov. Biblioteket sekvenseras sedan, en vanlig plattform för metastreckkodning är Illumina MiSeq. Sekvenseringsdata behöver sedan genomgå steg av kvalitetssäkring och datastädning, så som trimmandet av primersekvenser och mätning av kvalitén på sekvensläsningarna. Sekvensläsningar är antalet detekterade avläsningar av ett visst sekvenssegment under sekvenseringen. Vidare bioinformatik krävs även för att sekvensdata ska kunna analyseras, så som jämförelse av sekvenser mot referensbibliotek.

Vidare läsning om metoderna för DNA-streckkodning finns i bland annat Aylagas m.fl. (2016, 2018), och Bourlat m.fl., (2016), och beskrivningar av metoderna som användes inom detta projekt finns i artiklar som publicerats i samband med projektet (Broman m.fl., 2019, 2021; Ahmed m.fl., 2020).

# 3. Arbetspaket 1.

## Förbättrade referensbibliotek för Östersjöns nematoder

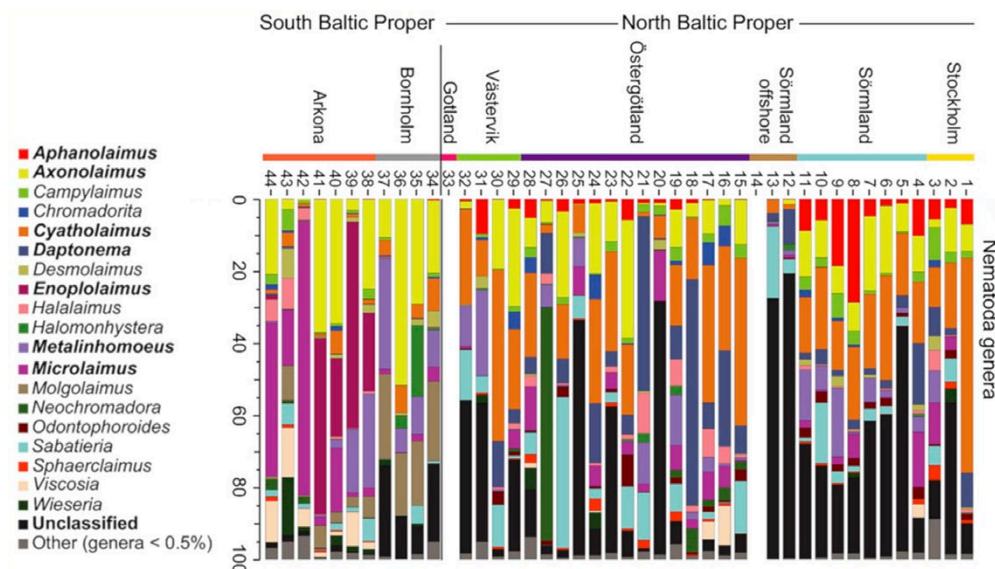
### 3.1 Bakgrund och syfte

DNA-sekvensering har potentialen att hjälpa oss täcka de kunskapsluckor som finns gällande ekosystemens mångfald av meiofauna och mikrober (Bik m.fl., 2012). Men för att DNA-streckkodning ska kunna ge en representativ bild av mångfalden i samhället så måste det finnas referensbibliotek som har bra täckning, både av de arter som provtas och de markörgener som används. Några exempel på markörgener är ribosom-RNA generna 18S rRNA och 28S rRNA, samt den mitokondriella genen för cytokrom c-oxidas (COI). Dessa används vid DNA-streckkodning av nematoder (Nascimento m.fl., 2018) och har i marina miljöer visat på en större mångfald än vad som tidigare antogs (Fonseca m.fl., 2010; Lallias m.fl., 2015; Nascimento m.fl., 2018) samt lett till att endemiska nematod-arter har upptäckts (Porazinska m.fl., 2010). Detta visar på potentialen hos DNA-streckkodning, men implicerar också behovet av kontinuerlig förbättring av referensdatabaser för att ta vara på streckkodningsmetodernas fulla potential.

I idealfallet skulle varje referensbibliotek ha täckning för alla arter inom det studerade ekosystemet, samt data över varje taxas utbredande i förhållande till geografi och ekologi, de salinitets, temperaturs och syrehalts-förhållande under vilka de förekommer (Holovachov m.fl., 2017). Detta är ett ideal som nuvarande referensdatabaser inte lever upp till (Dell'Anno m.fl., 2015; Holovachov m.fl., 2017). En studie av Holovachov m.fl. (2017) visade att endast 180 av 530 (beskrivna) marina nematod-släkter fanns representerade i NCBI GenBank, och en annan studie av Hovmöller m.fl. (2017) pekade också ut nematoder som en grupp i behov av förbättrad täckning i referensdatabaserna, och de estimerade att endast 0,3 % av nordiska nematod-arter finns i BOLD (Bold Systems v4, 2023), dessa är två av de mest använda referensdatabaserna. Data över nematod-samhället på släktesnivå behövs för att göra noggranna och ekologiskt relevanta statusbedömningar (Moens och Vincx, 1997). Prover insamlade inom NEMOte BARCODing har visat på sämre täckning för nematod-släkten i Norra Egentliga Östersjön än de i södra, se Figur 2 (Broman m.fl., 2019). Syftet med första delen av NEMOte BARCODing var att förbättra dessa databaser med hänsyn till Östersjöns nematoder. De referenssekvenser som laddats upp i samband med NEMOte BARCODing kommer att förbättra representationen av det faktiska nematod-samhället vid streckkodning, och därigenom förbättra potentialen i miljöövervakning av nematoder samt bidra till forskning om meiofauna-samhällets utbredd och mångfald.

Målen för arbetspaket 1 i NEMOte BARCODing var:

- Att binda samman morfologiska och molekylära data för 110 nematod-arter från Östersjön.
- Att förbättra referensdatabaser för 18s och 28s rRNA markörgener genom att ladda upp denna data till referensdatabaser som SILVA och NCBI.
- Att potentiellt beskriva tidigare obeskrivna och endemiska nematod-arter i Östersjön.



Figur 2. Släkten av meiofauna baserat på DNA-streckkodning med prover från Norra och Södra Egentliga Östersjön. Andelen oklassificerade nematod-släkten är större i Norra Egentliga Östersjön. Figur modifierad från Broman m.fl. (2019), därav text på engelska.

## 3.2 Metod

Arbetspaket 1 baserade sig på prover tagna längs hela Sveriges östkust. De togs både under vår och sommar för att ta hänsyn till säsongsmässiga variationer. Som beskrivet i Del 2 av rapporten togs sedimentprov med kajakhämtare och meiofauna-fraktionen separerades. Nematoder bestämdes till art morfologiskt av Dr Oleksandr Holovachov på Naturhistoriska riksmuseet, en taxonomisk expert på nematoder. DNA från enskilda nematoder extraherades, rengjordes och genomgick biblioteksförberedelser för 18S rRNA samt 28S rRNA markörerna. Metoderna för sekvensering är beskrivna i detalj i Ahmed m.fl. (2020), specifikationer finns även i Bilaga 1. Metoderna presenteras här i korthet.

DNA från de enskilda nematoderna extraherades med Qiagen QiAmp DNA Micro kit. Två rRNA genregioner amplifierades, 18S-rRNA och D2-D3 segmentet av 28S-rRNA. 18S-rRNA genen amplifierades med primerparet 988F–1912R för det första fragmentet och primerparet 1813F–2646R för det andra fragmentet (Holterman m.fl., 2006). D2-D3 segmentet av 28S-rRNA genen amplifierades med primerparet D2Af and D3Br (Nunn, 1992). Kvalitetskontroll och sekvenstrimning gjordes i BioEdit (Hall, 1999) och ihop sättning av framåt och bakåt segmenten av sekvenserna gjordes i Fragment Merger online tool (Bell och Kramvis, 2013). För 18S så sattes även de två fragmenten ihop

till ett *contig* (sammansatt sekvens) med samma verktyg. Biblioteken skickades sedan till Macrogen Europe B.V. för Sanger sekvensering. Sekvenser för genmarkörer laddades upp till databaserna SILVA och NCBI.

### 3.3 Resultat och diskussion

Från proverna har 450 nematoder identifierades. Dessa tillhörde 110 arter respektive 72 släkten, från 29 olika nematod familjer. Sekvenseringen var framgångsrik i ca 95 % av fallen och misslyckades helt för endast för 13 av 318 prov för 18S och endast 8 av 188 prov för 28S. Totalt 440 referenssekvenser har uppladdats (285 för 18S och 155 för 28S D2-D3). Referenssekvenserna var runt 1 600 baspar långa för var och en av markörgenerna. Se Tabell 11 i Bilaga 2 för lista på uppladdade sekvenser och nematod-art, samt vilken familj dessa tillhör.

Då 121 nematod-släkten hittades i data baserat på prover från hela Östersjön som inom NEMOte BARCODing användes för Arbetspaket 3 så utgör uppladdning av referenssekvenser för 72 olika släkten ett betydande bidrag till förbättringen av existerande referensdatabaser. Referenssekvenser för släktena fanns representerade i referensdatabaserna sedan innan, och inga endemiska eller beskrivna arter upptäcktes. Men i och med variationen i markörger som kan finnas inom en art (Porazinska m.fl., 2010; Bik m.fl., 2012; Dell’Anno m.fl., 2015), samt vikten av referenssekvenser från olika geografiska områden (Holovachov m.fl., 2017), kommer NEMOte BARCODings bidrag till referensbiblioteken förbättra streckkodning av Östersjöns nematoder.

Både miljöövervakning och forskning kommer gynnas av den fortsatta utvecklingen och förbättringen av referensbibliotek. Kunskapsluckor om meiofauna-mångfalden i Östersjön kommer successivt att minska i och med denna förbättring, och felaktiga taxonomiska bestämningar vid streckkodning kommer att bli färre.

Förvaltning inom vilken streckkodningsövervakning är en del måste se till denna långsiktiga utveckling av referensdatabaser. En fördel med metoden är att sparad sekvensdata senare kan åter jämföras mot förbättrade referensdatabaser, vilket gör att historiska data kommer vara jämförbara med nyare data givet jämförbara metoder i övrigt. I och med metoderna och databasernas fortsatta utveckling kommer också skillnaderna som resulterar från uppdateringar av databaserna avta. Dessa förbättringar kräver dock fortfarande taxonomisk expertis inom meiofauna och nematoder. För att se till referensdatabasernas utveckling skulle identifiering, sekvensering, och uppladdning av referenssekvenser där brister i databaserna existerar kunna utgöra en del i ett nematod-övervakningsprogram.

Ett sätt att inkorporera detta i ett övervakningsprogram är att morfologiskt bestämma arter för utvalda prover inom nematod-övervakning, vilket kan fungera som en metod för kvalitetssäkring. Ett sådant upplägg skulle möjliggöra kontinuerliga förbättringar av metoderna samt validering av resultaten. Detta arbete kräver fortfarande taxonomisk expertis, men är mindre i skala än om samtliga prov skulle morfologiskt bestämmas. Att taxonomisk expertis om målorganismerna finns är såklart också både nödvändigt och gynnsamt för ett miljöövervakningsprogram. För att bestämma nematod-samhället kan nematoderna i en bestämd volym av ett homogeniserat prov och/eller ett specifikt antal individer artbestämmas, vilket ger en bild av den relativa abundansen och potentiellt den absoluta abundansen. Om

möjligt kan samma individer återföras till provet och DNA-streckkodning genomföras för en direkt jämförelse inom provet. Annars kan prov från samma station, eller mångfalden i ett kluster, jämföras.

Då denna morfologiska metod ej har en absolut säkerhet så skulle denna kvalitetssäkringsmetod oftast inte innebära ett definitivt god- eller underkännande av prov. Ett tröskelvärde för gemensamma taxa skulle kunna sättas, men det har visat att gemensamma taxa mellan metoderna kan vara låg (Schenk m.fl., 2020). Det skulle dock utgöra ett mått på tillförlitligheten i data, möjliggöra utvärdering av metoder över tid, samt att arter med bristande representation i referensdatabaser kan plockas ut, sekvenseras och få referenssekvenser uppladdade. Även i liten skala skulle det tillåta en långsiktig utvärdering och förbättring av metoderna. Vårt projekt har visat på möjligheten till fortsatt förbättring av referensdatabaserna för Östersjöns, och har även som en fortsättning på detta inlett ett arbete med att ta fram en databas för nematoder från alla livsmiljöer. En sådan databas skulle vara en god resurs för ett miljöövervakningsprogram av nematoder.

# 4. Arbetspaket 2.

## Kvantifiering av nematod-samhällen med DNA-streckkodning

### 4.1 Bakgrund och syfte

Även med referensbibliotek som täcker de provtagna arterna så återstår frågan om sekvenseringsdata utgör en korrekt representation av samhällskompositionen och den relativa abundansen (Schenk m.fl., 2019). Frågan är alltså om det går att koppla sekvensläsningar till kvantitativa mått av abundans eller biomassa. Det finns två problem som kan försvåra detta och störa djurens relativa fördelning av sekvensläsningar jämfört med dess fördelning i samhället. För det första finns det en potentiell variation både mellan och inom arter i relevanta genomegenskaper så som genkopior och genmarkörernas exakta nukleotidsekvens (Bik m.fl., 2012). Detta har setts för nematod-arter, där individer från välbeskrivna arter varierar i både antal genkopior och har skillnader i sekvens för markörgener vid enskilda baspar (Porazinska m.fl., 2010; Bik m.fl., 2012; Dell’Anno m.fl., 2015; Schenk m.fl., 2019). Variationsgraden skiljer sig mellan arter, vilket kan göra det svårt att få korrekta mått av relativ eller absolut abundans från sekvenseringsdata. Det andra problemet är potentiella metod-bias vid PCR-amplifiering. Dynamiker i amplifieringsprocessen, sekvensinteraktioner samt bindningspreferenser för använda primers kan göra att vissa amplikons amplifieras i högre grad än andra. Detta resulterar i en överrepresentation av dessa amplikons i det slutgiltiga biblioteket och därmed en inkorrekt och snedfördelad representation av djursamhället (Piñol m.fl., 2015).

Men studier visar också att streckkodningsdata utgör en representation, om än en bristfällig sådan, av den underliggande samhällsstrukturen. Detta kan till exempel visas genom de korrelationer mellan sekvenseringsläsningar och biomassa som har hittats för bentiska organismer (Elbrecht m.fl., 2017; Bista m.fl., 2018). Det är dock viktigt att bedöma hur mycket, och kanske ännu viktigare på vilket sätt, sekvensdata skiljer från den faktiska fördelningen. Det har visats att korrigeringsfaktorer kan användas för att minimera effekten av systematisk snedfördelning om en sådan är känd (Bik m.fl., 2013; Piñol m.fl., 2015; Elbrecht och Leese, 2017). En metod som har lett till lovande resultat när det kommer till biomassaestimering är användningen av flera primer par för olika genmarkörer i samma replikat samt kombinationer av genmarkörer för sekvenssegment från samma region (Gibson m.fl., 2014; Kelly m.fl., 2014; Bista m.fl., 2018), vilket kan förbättra både måttet av artrikedom, och biomassaestimering från streckkodningsdata. Dessa metoder har dock inte applicerats på nematoder eller meiofauna i allmänhet.

I Arbetspaket 2 så har NEMOte BARCODing undersökt hur väl streckkodningsmetoder kvantifierar nematod-samhället, samt undersökt hur metod-bias, som är potentiella hinder för streckkodningsövervakning, påverkar metodens användning på nematoder. Arbetet har fokuserat på 8 släkten som är potentiella indikator på syrebrist och även abundanta i Östersjön. Dessa släkten visade sig ha olika känslighet mot syrebrist i experiment gjorda av Modig och Ólafsson (1998) och fördelningen av dem i nematod-samhället kan därav potentiellt indikera negativa effekter av övergödning i form av hypoxi. Olika DNA-sekvenseringsmetoder, både streckkodning med 18S och 28S markörgenerna och shotgun-sekvensering, testades och jämfördes ur lämplighetssynpunkt för miljöövervakningssyften i relation till de ovanstående beskrivna problemen. Information om hur väl DNA-streckkodning kvantifierar nematod-samhällen kommer förbättra vår förmåga att omsätta data till kunskap om nematodernas samhällsstruktur, och i förlängningen underlätta deras inkludering i miljöövervakning och vår förmåga att bedöma habitatens ekologiska status utifrån denna. Streckkodningsmetoder testades även för applicering på makrofauna-samhällen för jämförelse och för att utforska potentialen att även övervaka makrofauna med DNA-baserade metoder.

Målen för arbetspaket 2 i NEMOte BARCODing var:

- Att testa hur väl sekvenseringsmetoder kvantifierar abundans och biomassa för dessa 8 släkten. Detta för att antingen visa på goda återspeglingsfaktorer av det faktiska nematod-samhället, eller hitta möjliga korrektionsfaktorer som kan användas för att korrigera för snedfördelningar.
- Att även testa streckkodningsmetoder på makrofaunasamhällen, och jämföra beräkningar av BQI, som används för att bestämma ekologisk status, mellan morfologiska och DNA-baserade metoder.
- Att utifrån dessa tester jämföra sekvenseringsmetoder för miljöövervakning ur lämplighetssynpunkt, och från detta ge ett förslag till ett standardiserat meta-streckkodningsprotokoll för miljöövervakning av meio och makrofauna i Östersjön.

## 4.2 Metod

### 4.2.1 Experiment med artificiella nematod-samhällen

Experiment genomfördes med artificiellt sammansatta nematod-samhällen. Frågorna som vi ville besvara var: 1. Får olika nematodtaxa olika antal sekvensläsningar i förhållande till sitt individantal? 2. Korrelerar mängden DNA med relativa abundans av sekvensläsningarna för de 8 släktena? 3. Påverkar val av sekvenseringsmetod eller markörgener förhållandet mellan sekvensläsningar och antal individer eller DNA mängd för de 8 släktena?

Två experimentella upplägg användes för att besvara dessa frågor. I det första, DNA-mängdsexperimentet, användes en bestämd proportion av redan extraherat DNA från de 8 släktena. I det andra, individexperimentet, användes en bestämd proportion av individer från släktena.

De 8 släktena valdes för experimentet baserat på deras förekomst i Östersjön samt har visat skillnader i känslighet mot syrebrist (Modig och Ólafsson, 1998), vilket gör dem till potentiella indikatorsläkten. Klassningen av tolerans mot syrebrist var

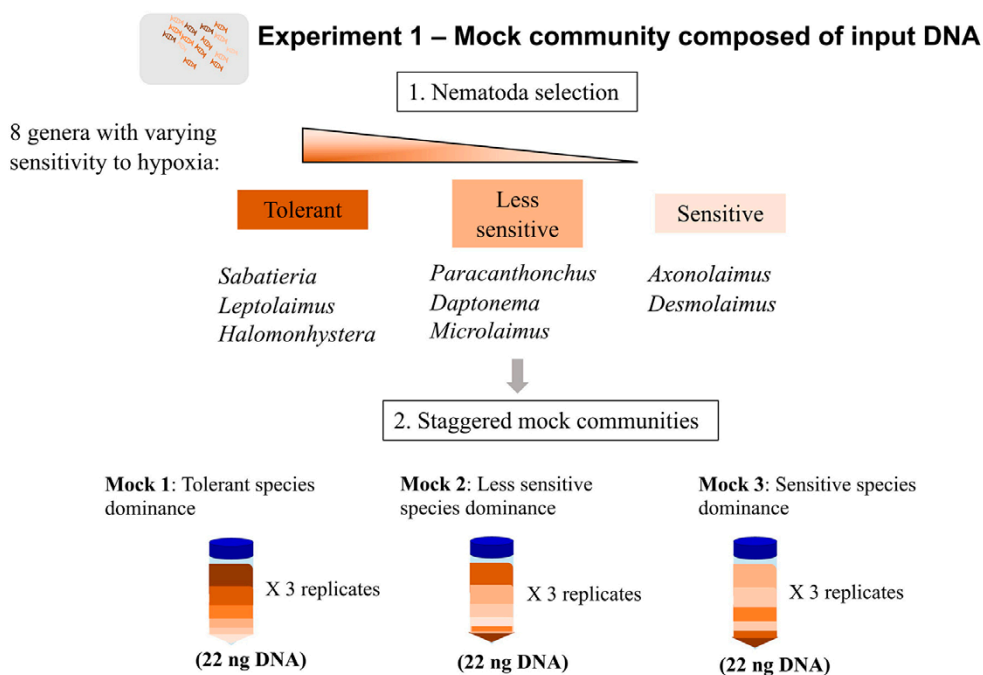
baserad på experimentella resultat från Modig och Ólafsson (1998), samt förekomsten av släktena längs en syrehaltsgradient i prover tagna inom projektet. Utvalda släkten och respektive klassning var följande:

1. Toleranta mot syrebrist: *Sabatiera*, *Leptolaimus* och *Halomonhystera*.
2. Mindre känsliga mot syrebrist: *Paracanthochus*, *Daptonema* och *Microlaimus*.
3. Känsliga mot syrebrist: *Axonolaimus* och *Desmolaimus*.

Respektive experiment hade 3 typer av artificiella samhällen som dominerades av respektive toleransklass:

- Ett samhälle dominerat av toleranta släkten.
- Ett samhälle dominerat av mindre känsliga släkten.
- Ett samhälle dominerat av känsliga släkten.

För individexperimentet tillfördes även fjärde artificiellt samhälle med lika antal individer av släktena. För alla typer av artificiella samhällen i respektive experiment gjordes 3 replikat.

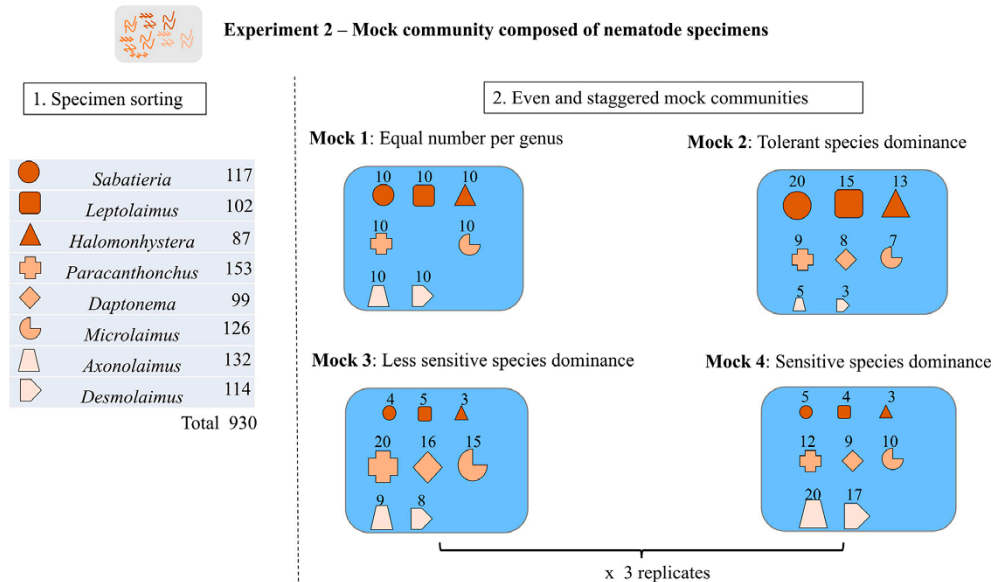


Figur 3. Upplägg experiment 1. DNA-mängdsexperimentet, där olika mängd DNA från respektive känslighetskategori användes för att konstruera 3 typer av artificiella samhällen, med 3 replikat var. Figur tagen från manuskript i förberedelse som kommit ur NEMOte BARCODing, därav text på engelska.

Prover togs med kajakcores och meiofauna separerades som beskrivet i Del 2 av rapporten. Nematoderna identifierades visuellt av experter på Naturhistoriska riksmuseet och individer från de 8 utvalda nematod-släktena separerades. Till DNA-mängdsexperimentet extraherades DNA från 50 individer från respektive släkte. De 3 replikaten för respektive samhällstyp konstruerades sedan, med 22 ng som den totala mängden DNA i varje samhälle, se Figur 3.



I individantalexperimentet utgjordes varje replikat av 80 individer totalt, med fördelning enligt samhällstyperna, se Figur 4. Samhället med lika antal av släktena utgjordes dock av 70 individer då otillräckligt antal individer gjorde att släktet *Daptonema* behövde utelämnas. Extrahering gjordes av varje artificiella samhälle med QIAmp DNA Micro kit enligt tillverkarens instruktioner.



Figur 4. Upplägg experiment 2. individexperimentet, där olika antal individer från respektive känslighetskategori användes för att konstruera 3 typer av artificiella samhällen, samt ett fjärde samhälle med lika antal individer av 7 av släktena (*Daptonema* behövde utelämnas på grund utav brist på individer). Samtliga av dessa gjordes i 3 replikat var. Figur tagen från manuskript i förberedelse som kommit ur NEMOte BARCODing, därav text på engelska.

Samtliga replikat från båda experimenten, samt negativa kontroller, genomgick biblioteksförberedelser med 3 olika metoder. Två olika streckkodningsmetoder, den första med primers TAREuk454FWD1 och TAREukREV3 (Stoeck m.fl., 2010) som har 18s rRNA genregionen som målsekvens, och den andra med primers 1274F och 706R (Schenk m.fl., 2019) som har 28s rRNA genregionen som målsekvens) samt en tredje metod där Shotgun-sekvensering användes. I Shotgun-sekvensering så genomförs sekvensering direkt på det extraherat DNA, DNA massan bryts i mängder av små bitar som sekvenseras. Genom att man kan pulsa ihop dessa bitar och jämföra med referensdatabaser kan man bestämma samhällskompositionen. Biblioteken sekvenserades sedan med Illumina MiSeq.

För bioinformatiken trimmades index och markörprimers från sekvensdata med programmet Cutadapt (version 1.17). DADA2 paketet i R miljö (Callahan m.fl., 2016) användes för kvalitetsfiltrering, mätning av fel och borttagning av duplicerade sekvenser. 18S-sekvenssegmenten jämfördes sedan mot databasen NCBI med BLAST algoritmen. För 28S gjordes en jämförelse av sekvenssegmenten mot de referens-sekvenser som tagits fram i projektet, även det med hjälp av BLAST algoritmen.

## 4.2.2 DNA-streckkodning av makrofaunaprover

Under juli 2021 samlades makrofaunaprover in från 38 stationer i Askö området, Norra Egentliga Östersjön, varav 15 är miljöövervakningsstationer. Proven konserverades i etanol (90 %, utspätt från 96 % med glycerol) som innehöll infärgningsmedlet Bengalrosa (0,1 g per liter). Samhällskompositionen, artabundans, biomassa (våtvikt) och artantal fastställdes morfologiskt och BQI räknades ut per station. Djuren konserverades sedan åter i samma konserveringslösning. 20 av dessa prover, 10 med lågt BQI och 10 med högt BQI, valdes ut för DNA-streckkodning för att jämföra samhällskomposition och BQI uträkning med den morfologiska analysen. DNA extraherades med Powermax Soil DNA Isolation Kit (som bedömdes kunna användas effektivt på djurvävnad) i februari 2022, 7 månader efter konservering. Före extrahering tvättades och sköljdes djuren för att få bort konserveringsvätskan, samt homogeniserades med mortel. Biblioteksförberedles genomfördes med 2 uppsättningar av PCR-buffert-blandningar (buffert som innehåller DNA-polymeras och andra nödvändiga komponenter för PCR-amplifiering), AmpliTaq Gold och Q5 High Fidelity 2X Master Mix. Primers för COI genmarkören användes (framåt-primern mlCOIintF och bakåt-primern mlCOIintR, (Leray m.fl., 2013)). Rengöring av proven var nödvändigt för lyckad amplifiering, för detta användes *DNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit*. En möjlig anledning till att rengöring behövdes är att kvarvarande bengalrosa utgjorde ett hinder för PCR-amplifiering. Då konserveringsmetoden är identisk med den som utförs i nuvarande makrofauna-övervakningsprogram har detta potentiellt implikationer för metodens användning inom denna makrofauna-övervakning. Biblioteket sekvenserades sedan med Illumina MiSeq. Trimning av primersekvenser och kvalitetsfiltrering genomfördes med hjälp av DADA2 paketet i R. Sekvenssegmenten jämfördes mot referensdatabasen NCBI med hjälp av BLAST algoritmen.

## 4.2.3 Statistik

Samtlig statistik gjordes i R miljö. För experimenten med artificiella nematod-samhällen använde en PCoA analys med Bray-Curtis avstånd för att jämföra variationen mellan replikaten och samhällstyperna. R paketet "vegan" användes (Oksanen m.fl., 2022). Ett Manteltest gjordes för att mäta om skillnaden mellan samhällena var signifikant. Pearsons korrelationstest användes för att testa korrelationen mellan varje släktes relativa del av sekvensläsningarna i replikaten med antalet individer eller mängden DNA som använts.

Streckkodningsdata från makrofaunaproverna sorterades för tilldelning av känslighetsvärden. Totala artantalet var högre i streckkodningsmetoderna, detta kan vara på grund utav felaktiga bestämningar och sällsynta sekvenssegment som uppstått på grund metodfel, vilket var tydligt i vissa fall. Men det var också på grund utav högre taxonomisk upplösningen än vad som används i morfologisk analys. Både för taxa som *Oligochaeta*, vilka ska räknas sammanslaget i enligt bedömningsgrunderna (HaV, 2020), och taxa som av praktiska skäl oftast inte bestäms till artnivå, så som frilevande plattmaskar (klass *Turbellaria*). Hela taxonomiska klassificeringshierarkin av varje bestämt taxon jämfördes mot listan på känslighetsvärden för taxa samt exkluderade grupper för Östkusten. Känslighetsvärdet som kunde ges till högst taxonomisk nivå för arten valdes. I vissa fall gjordes manuell tilldelning när ett taxon var känt men inte hade tilldelats rätt känslighetsvärde eller exkluderingsstatus.

De relativa proportionerna av varje taxa i proven räknades ut för respektive metod. BQI räknades ut för de 4 samhällskompositionerna (2 baserade på morfologi, individantal och biomassa, och 2 på streckkodningsdata, Q5 High Fidelity och AmpliTaq proverna). För data över antal individer, som BQI är ämnat att användas för, räknades BQI ut enligt bedömningsgrunden (Leonardsson m.fl., 2009; HaV, 2020). För data baserat på sekvensläsningar och biomassa behövde dock abundansfaktorn uteslutas då den ej kan räknas för dessa. Se Faktaruta om BQI i Arbetspaket 3 för mer detaljer om de olika faktorerna i BQI.

För artantal räknades endast de taxa som kunde ges känslighetsvärde. På så sett uteslöts effekten av sällsynta sekvensläsningar från icke relevanta taxa, vilka kan bero på metodfel. Då artantal för samhället är den samma oavsett om antal individer eller biomassa används så gjordes endast jämförelsen mot artantal räknat med antal individer. Känslighetsfaktorn för BQI, respektive hela BQI-indexet samt artantal jämfördes mellan metoderna. Pearsons korrelationstest gjordes för att testa korrelationer och Parade t-test med Holms metod för multipla jämförelser gjordes för att jämföra skillnaden i medelvärde. Pearsons korrelationstest gjordes också för varje art där dess relativa abundans i proven korrelerades mellan metoderna

För att jämföra samhällsstrukturen gjordes en NMDS-visualisering (Non-metric multidimensional scaling). För detta användes funktionen "metaMDS" från R paketet "Vegan" (Oksanen m.fl., 2022). Ett PERMANOVA-test (funktionen adonis2 i "Vegan") samt ett parvis PERMANOVA-test (funktionen "pairwise.adonis2" från R paketet "pairwiseAdonis" (Arbizu, 2023)) användes även för att statistiskt jämföra samhällskompositionen mellan metoderna. Ett SIMPER-test (funktionen "simper" från R paketet "Vegan" (Oksanen m.fl., 2022)) användes för att testa vilka arter som signifikant bidrog till skillnaden mellan metoderna, med gräns vid 90 % för bidrag till den kumulativa olikheten. Samtliga av dessa gjordes med Bray-Curtis avstånd mellan prov baserat på fördelning av relativ abundans (utan vidare omvandling) med metod som den förklarande variabeln till skillnader.

## 4.3 Resultat

### 4.3.1 Experiment med artificiella nematod-samhällen

Replikaten av olika toleransklassstyp skiljde sig statistiskt åt, medan de av samma typ ej gjorde det. Detta visades både för DNA-mängdsexperimentet (Manteltest,  $p < 0,002$  för samtliga) och individantals-experimentet (Manteltest,  $p < 0,003$ , för samtliga). Implikationen av detta är att DNA-metoder är robusta nog att vara jämförbara mellan prover, samt att de kan användas för att jämföra breda mönster i samhällskomposition och mångfald. Dock så visade experimenten på en viss metod-bias och sned fördelning.

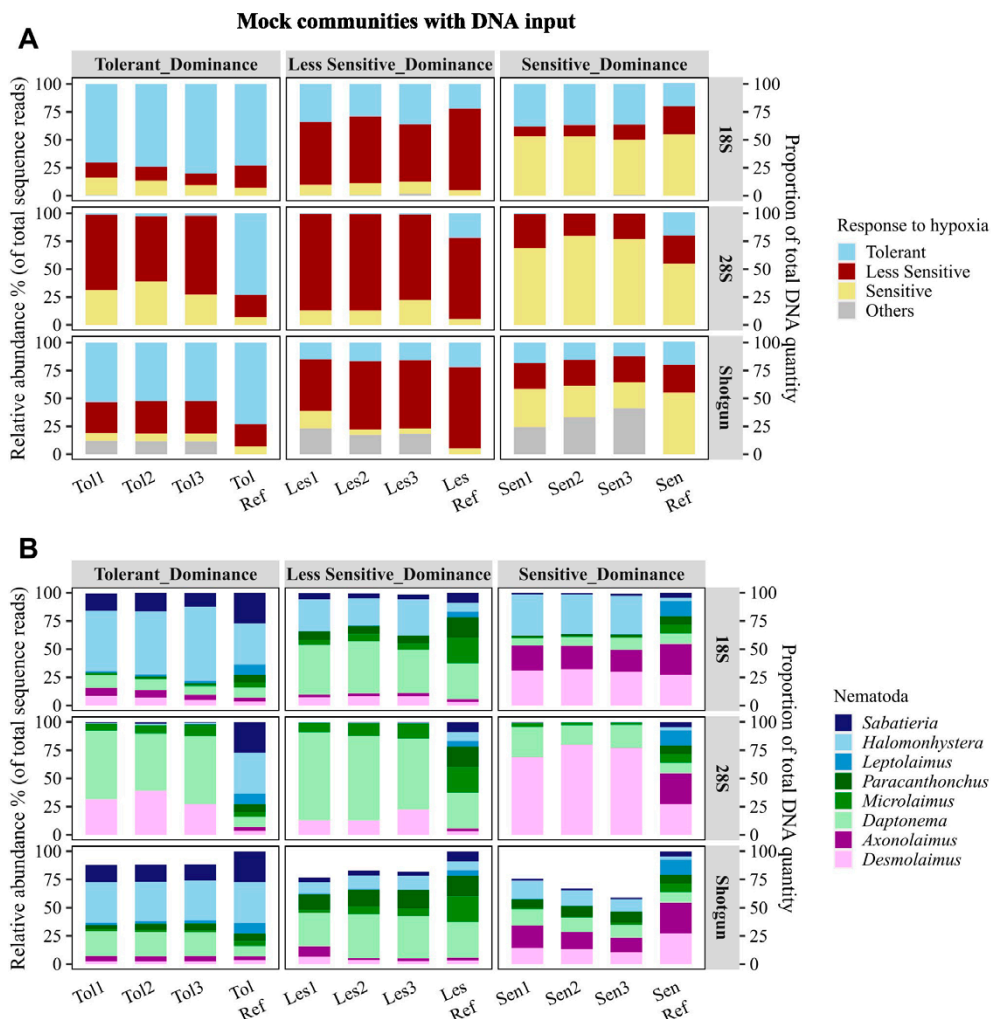
## DNA-mängdsexperimentet

På toleransklass nivå visade streckkodning med 18s rRNA och shotgun-sekvensering god överrensstämme med den egentliga fördelningen av DNA-mängd mellan klasserna i replikaten. Men streckkodning med 28s rRNA frångick den egentliga fördelningen kraftigt på grund utav överrepresentationen av *Daptonema* ("mindre känslig") och *Desmolaimus* ("känslig"), se Figur 5. Viss släktspecifik över eller underrepresentation förekom dock för alla metoder:

Streckkodning av 18s rRNA: I 18s-data så var *Halomonhystera* överrepresenterad, medan *Leptolaimus*, *Microlaimus* och *Paracanthochus* var underrepresenterade.

Streckkodning av 28s rRNA: I 28s-data så utgjorde *Daptonema* och *Desmolaimus* nästintill hela den relativa abundansen, oavsett den egentliga kompositionen (samhällets tolerans-typ). *Paracanthochus* och *Axonolaimus* förekom i låg relativ abundans men *Sabatieria*, *Halomonhystera* och *Leptolaimus* var näst intill helt frånvarande.

Shotgun-sekvensering: I data från shotgun-sekvensering så var *Halomonhystera* överrepresenterad, medan *Leptolaimus* och *Paracanthochus* var underrepresenterade, precis som i 18s-data.



Figur 5. Från DNA-mängdsexperimentet. Samhällsstrukturen i de olika replikaten, med den egentliga kompositionen längs till vänster markerad med Ref. Figur tagen från manuskript i förberedelse som kommer ur NEMOte BARCODing, därav text på engelska.

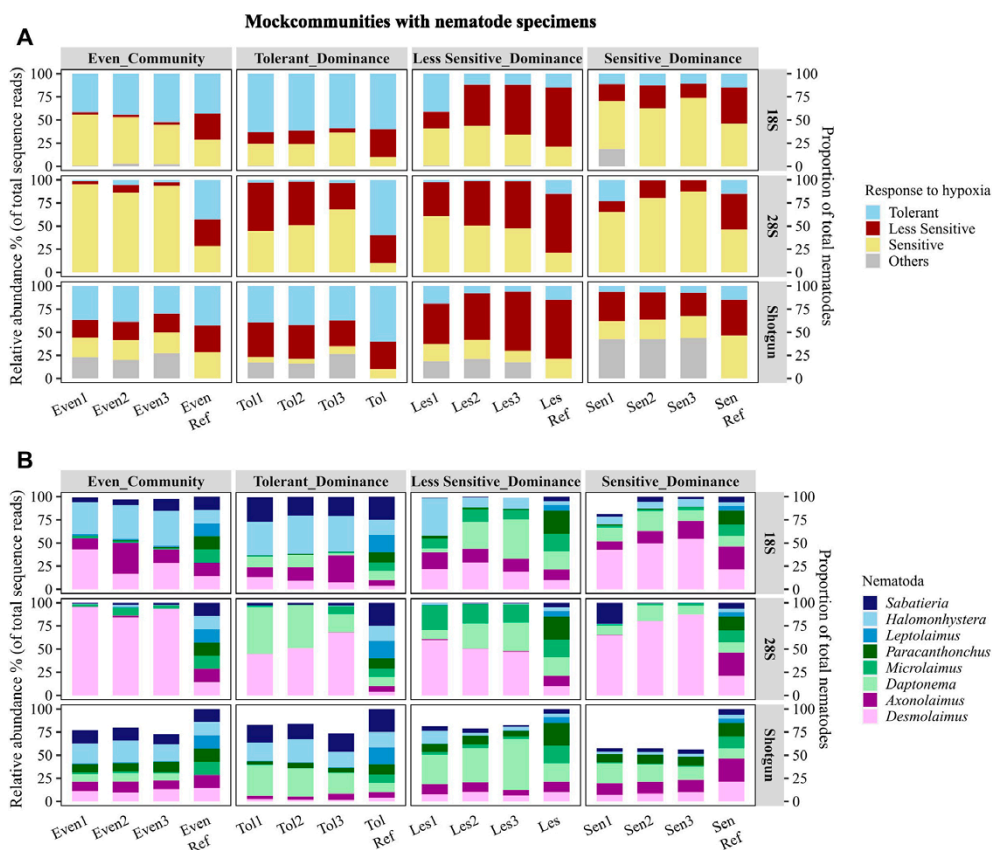
## Individantals-experimentet

På toleransklass nivå visade streckkodning med 18s rRNA och shotgun-sekvensering även för individantalexperimentet god överensstämmelse med den egentliga fördelningen. Överrepresentationen av *Daptonema* ("mindre känslig") och *Desmolaimus* ("känslig") gjorde också i detta experiment att sekvenseringsdata från 28S-streckkodning ej speglade den verkliga fördelningen av individer i samhället, se Figur 6. Även i individantals-experimentet förekom viss släktesspecifik över eller underrepresentation för alla metoder:

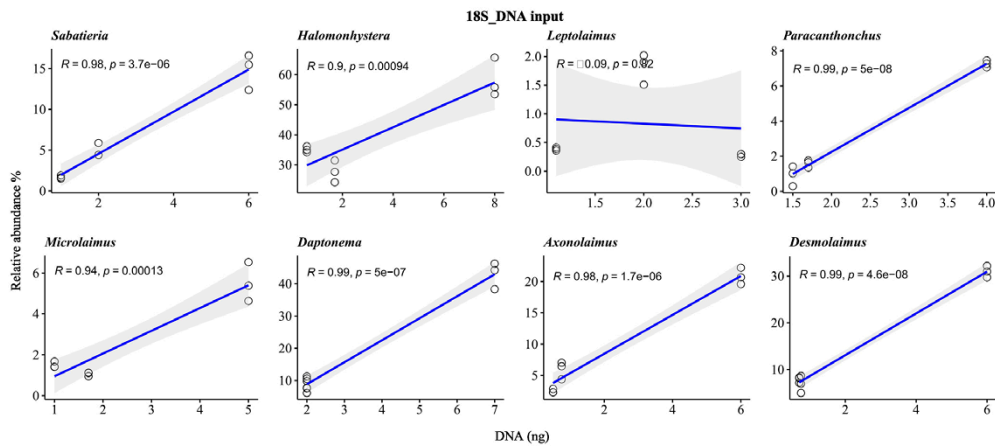
Streckkodning av 18s rRNA: I 18s-data så var både *Halomonhystera*, *Desmolaimus*, och *Daptonema* överrepresenterad, medan *Leptolaimus* och *Paracanthochus* var underrepresenterad.

Streckkodning av 28s rRNA: I 28s-data så var både *Halomonhystera*, *Desmolaimus*, och *Daptonema* överrepresenterad, medan *Leptolaimus* och *Paracanthochus* var underrepresenterad.

Shotgun-sekvensering: Intressant nog förekom *Daptonema* i shotgun-sekvenseringsdata för samhället med jämnt antal individer, trots att den hade utelämnats från dessa. *Leptolaimus* och *Microlaimus* var underrepresenterad i shotgun-sekvenseringsdata.



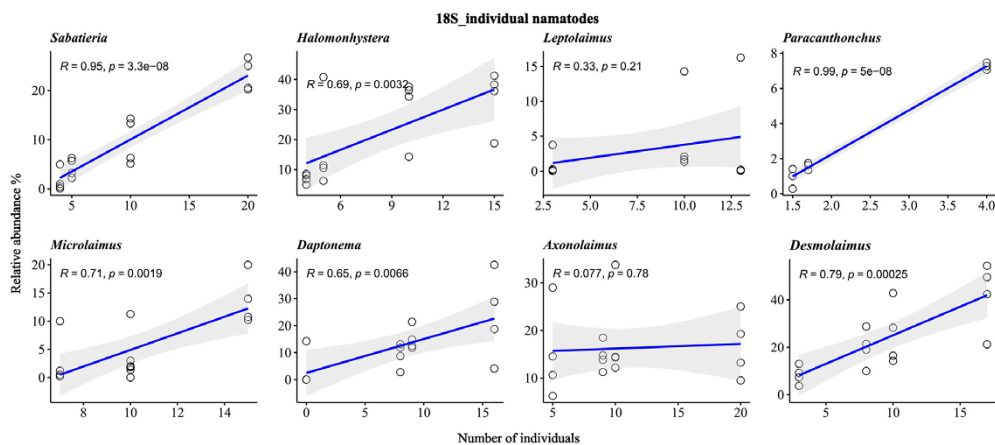
Figur 6. Från individantalexperimentet. Samhällsstrukturen i de olika replikaten, med den egentliga kompositionen längs till vänster markerad med "Ref". Figur tagen från manuskript i förberedelse som kommit ur NEMOte BARCODing, därav text på engelska.



Figur 7. Från DNA-mängdsexperimentet. Korrelationer mellan DNA-mängd och relativ abundans av sekvensläsningar. Dessa korrelationer är för DNA-streckkodning av 18s rRNA genmarkören, som visade bäst samband med det faktiska förhållandet i nematod-samhället. Samtliga korrelationer förutom den för *Leptolaimus* var signifikanta. Figur tagen från manuskript i förberedelse som kommit ur NEMOte BARCODing, därav text på engelska.

I DNA-mängdsamhällena korrelerade den relativa abundansen av sekvensläsningar för alla nematod-släkten positivt med den använda mängden DNA för 7 släkten, alla utom ett *Leptolaimus*, se Figur 7. Korrelationerna var starkare i 18S och shotgun-sekvenseringsdata än i 28S data ( $p < 0,001$ ).

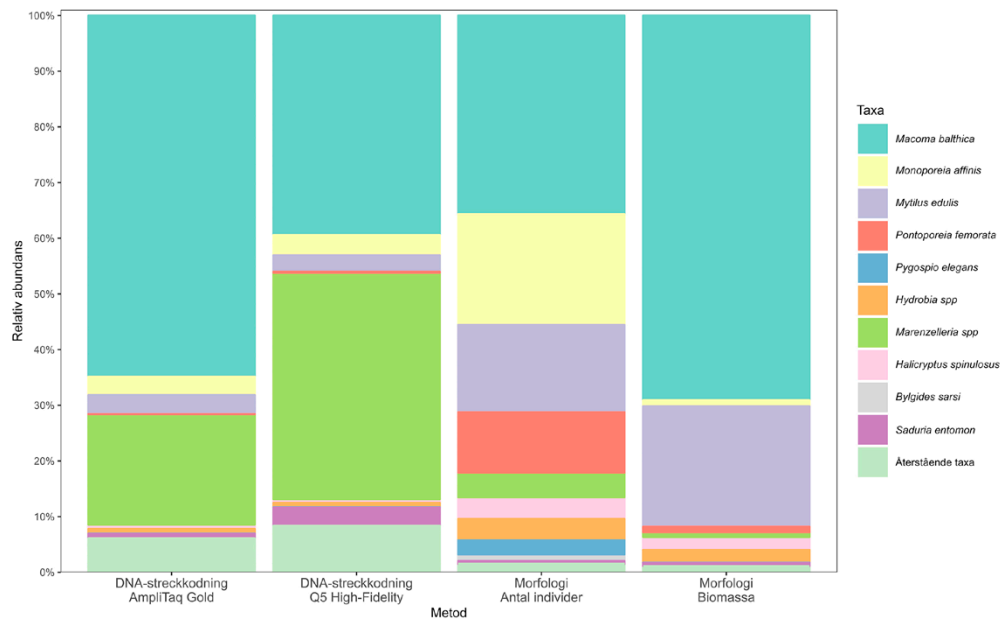
Positiva korrelationer fanns också i de artificiella samhällena baserade på antalet individer. I 18S var 6 släkten korrelerade med sitt individantal, alla förutom *Leptolaimus* och *Axonolaimus*, se Figur 8. I proven där shotgun-sekvensering används korrelerade 7 släkten med antalet använda individer, alla förutom *Paracanthochus*. I data från 28S sekvensering av de individbaserade samhällena hittades positiva korrelationer endast för *Paracanthochus* och *Microlaimus*. Korrelationerna var dock starkare i experimentet där DNA-mängd användes än de där antalet individer användes, se både Figur 7 och Figur 8.



Figur 8. Från individantalexperimentet. Korrelationer mellan antal individer och relativ abundans av sekvensläsningar. Dessa korrelationer är för DNA-streckkodning av 18s rRNA genmarkören, som visade bäst samband med det faktiska förhållandet i nematod-samhället. Samtliga korrelationer förutom de för *Axonolaimus* och *Leptolaimus* var signifikanta. Figur tagen från manuskript i förberedelse som kommit ur NEMOte BARCODing, därav text på engelska.

### 4.3.2 Makrofauna DNA-streckkodning

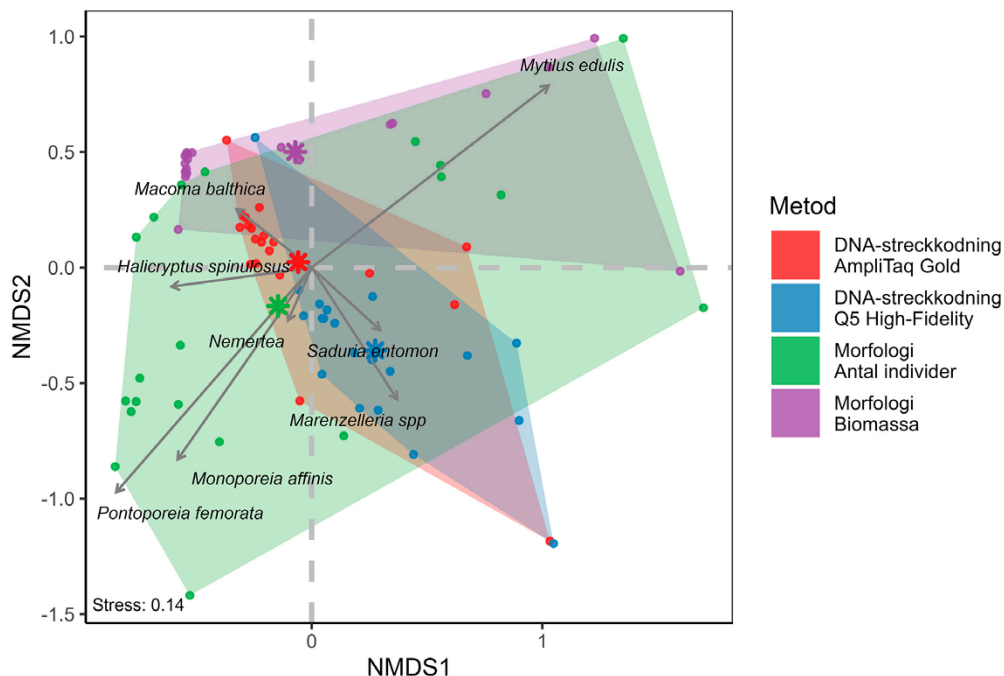
Samhällsstrukturen skilde sig åt signifikant mellan metoderna (PERMANOVA,  $p = 0,001$ . Parvis PERMANOVA,  $p < 0,002$  för samtliga jämförelser). Den tydligaste skillnaden var den starka överrepresentationen av släktet *Marenzelleria* för streckkodningsmetoderna, se Figur 9 för visualisering av den genomsnittliga samhällskompositionen. Överrepresentationen var som starkast i prover där Q5 High Fidelity använts som PCR-buffert. Släktet bidrog signifikant till skillnaden mellan samhällsammansättningen från streckkodning med Q5 High Fidelity jämfört mot biomassa och abundansdata (SIMPER,  $p < 0,001$  för båda). För jämförelse mellan AmpliTaq proverna och morfologiskdata så bidrog *Marenzelleria* bara signifikant till skillnaden mot samhällsammansättningen baserad på individantal (SIMPER,  $p < 0,001$ ). *Marenzelleria* förekom endast i 11 av proven som hade bestämts morfologiskt, men fanns representerat i samtliga 20 streckkodningsprov för båda PCR-buffertmetoderna. Den hade i prov där *Marenzelleria* ej hittats fortfarande hög relativ abundans, men lägre än i proven där släktet hade hittats (för AmpliTaq 15,4 % och Q5 33,4 % i prov där *Marenzelleria* ej hittats respektive 26,7 % och 47,8 % där släktet hittats). Detta tyder på korskontaminering, men detta kan inte ensamt förklara den stora överrepresentationen av just *Marenzelleria*. Storleksgraden i överrepresentationen tyder på metod-bias, så som preferentiell primer-bindning (Piñol m.fl., 2015) till *Marenzelleria* DNA för de COI-målgensprimrar som användes.



Figur 9. Genomsnittlig samhällskomposition räknat med relativ abundans baserade på samma 20 prover. Jämförelse mellan de 4 olika metoderna, först de 2 DNA-streckkodningsbaserade, där AmpliTaq Gold respektive Q5 High-Fidelity användes som PCR-buffert. Sedan morfologiskt bestämda samhällskompositionerna baserat på antal individer och biomassa. Stor överrepresentation av *Marenzelleria* kan ses för DNA-streckkodningsmetoderna.

*Monoporeia affinis* och *Pontoporeia femorata* bidrog även signifikant till skillnaderna mellan samhället representerat med antal individer och de övriga, då de hade högre relativ abundans räknat med individantal (SIMPER,  $p < 0,001$  för samtliga). SIMPER-testet visade inga arter som bidrog signifikant till skillnaderna mellan biomassa och AmpliTaq-sekvensdata. I Figur 10 kan samhällenas förhållande till varandra samt taxa som bidrog till skillnaderna observeras. Lista över jämförelser för vilka dessa arter bidrog signifikant till skillnaderna finns i Bilaga 3.

Korrelationer av varje arts relativa abundans mellan metoderna visade att de oftast korrelerade positivt mellan morfologiska och streckkodningsbaserade data. För 15 av 17 taxa som bestämts till gemensam taxonomisk nivå fanns en signifikant korrelation mellan relativ abundans baserat på morfologiska metoder (individantal eller biomassa) och relativ abundans baserat på sekvensläsningar. För de flesta taxa korrelerade båda starkt positivt, med högre korrelationen var mellan biomassa och streckkodningsdata för majoriteten. Se Tabell 12 i Bilaga 3.



Figur 10. NMDS graf över de 4 olika samhällena baserade på samma 20 prover. De 4 metoderna är de DNA-streckkodningsbaserade, AmpliTaq Gold (röda punkter) respektive Q5 High-Fidelity (Blåa punkter) PCR-buffert, och morfologiska, antal individer (gröna punkter) och biomassa (lila punkter). Taxa som bidrog signifikant till skillnaden mellan metoderna är utmarkerade på grafen med namn och pil för att indikera riktningen i vilken de drog stationer som de var abundanta på. Punkter är stationer, och stjärnan är varje metods centroid (tyngdpunkt).

Artrikedom, räknat med arter som kunde ges känslighetsvärde, korrelerade signifikant mellan samtliga metoder. Även artrikedomen räknat med alla arter för streckkodningsdata hade signifikanta korrelationer mellan metoderna, se Tabell 13 i Bilaga 3.

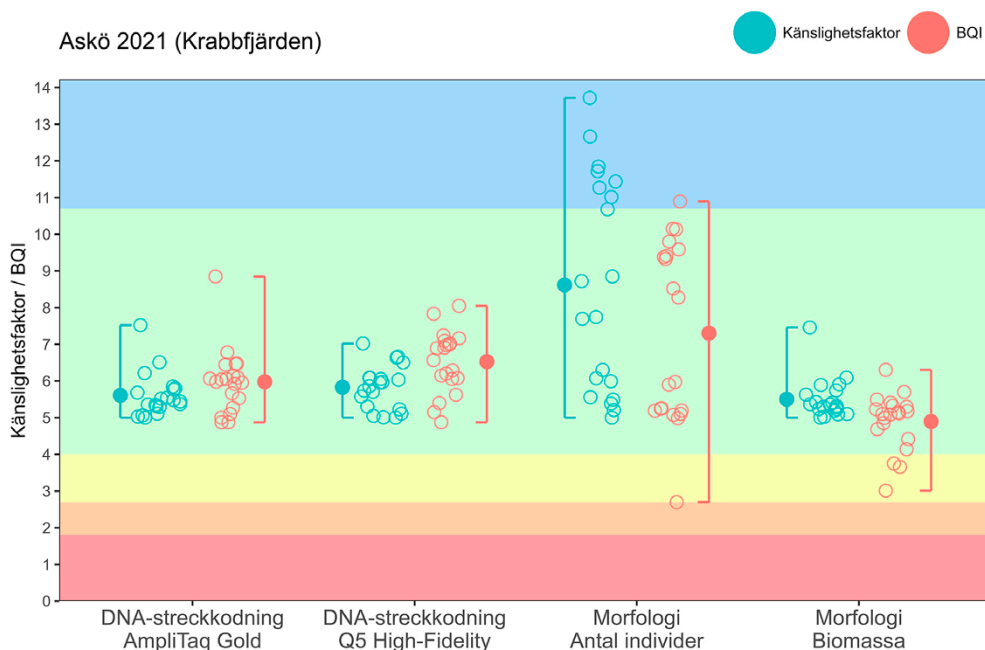
Känslighetsfaktorn hade en stark korrelation mellan de två streckkodningsmetoderna ( $R = 0,80$ ,  $p < 0,001$ ) och samt en stark korrelation mellan de två morfologiska metoderna ( $R = 0,74$ ,  $p < 0,001$ ). Resterande korrelationer av känslighetsfaktorerna var också positiva, ( $R$  mellan 0,38 och 0,52) men av dessa var den enda signifikanta korrelationen mellan biomassa-känslighetsfaktorn och känslighetsfaktorn räknad med sekvenseringsdata när Q5 användes ( $R = 0,52$ ,  $p = 0,020$ ).



BQI-index korrelerade signifikant mellan de två streckkodningsmetoderna ( $R = 0,78$ ,  $p < 0,001$ ) och mellan de två morfologiska metoderna ( $R = 0,60$ ,  $p < 0,001$ ). BQI räknat med biomassa korrelerade även signifikant med de två streckkodningsmetoderna (Q5,  $R = 0,73$ . Amp.  $R = 0,60$ ,  $p < 0,006$  för båda). BQI räknat med antal individer hade positiv korrelation med streckkodningsmetoderna, men dessa var ej signifikanta (Q5,  $R = 0,41$ , Amp.  $R = 0,37$ ). Medelvärden för BQI, känslighetsfaktorn och artrikedom finns i Tabell 2. I Tabell 13 i Bilaga 3 finns statistiska jämförelser av medelvärdena.

**Tabell 2. Medelvärde och standardavvikelse för BQI, känslighetsfaktorn och artantal för respektive metod.**

Metod	BQI	Känslighetsfaktor	Artrikedom Taxa med känslighetsvärde
AmpliTaq	$5,98 \pm 0,88$	$5,61 \pm 0,59$	$10,85 \pm 2,43$
Q5	$6,53 \pm 0,85$	$5,83 \pm 0,59$	$12,45 \pm 2,67$
Biomassa	$4,86 \pm 0,74$	$5,50 \pm 0,55$	-
Antal individer	$7,28 \pm 2,48$	$8,62 \pm 2,92$	$7,00 \pm 2,10$



Figur 11. Känslighetsfaktorn och BQI räknat med respektive metodunderlag baserade på samma 20 prover. Blå punkter är känslighetsfaktor för stationer och röda punkter är BQI värde för stationer. Linjen visar spannet på värden och ifyllda punkten på linjen visar medelvärdet. Bakgrundsfärgerna utgör statusklasser samt tröskelvärden mellan statusklasser för Krabbfjärden, vattenförekomsten som Askö området befinner sig i.

## 4.4 Fortsatt arbete inom Arbetpaket 2

Våren 2023 togs makrofaunaprover till NEMOte BARCODing från miljöövervakningsstationer. Från Asköområdet togs 5 prover, från Trelleborgs-området 3 prover, och från Stockholmsområdet 3 prover. Dessa förvarades i  $-20\text{ °C}$  efter sällning. Lämpligheten i frysning kontra konservering i etanol för streckkodningssyften kan göras med dessa. Resterande prov från 2021 har redan homogeniserats med mortel då detta gjordes för samtliga prover, och dessa skulle kunna användas för en sådan jämförelse. Planen är att bestämma proverna från 2023 morfologiskt, för att sedan genomföra bibliotekförberedelser. Data från de 2021 prover som sekvenserade kan även analyseras vidare, speciellt för att utforska hur den taxonomiska upplösningen för DNA-streckkodningsdata ska hanteras, samt vilka modifieringar av BQI som möjligtvis skulle kunna göras för få ett jämförbart resultat med BQI med nuvarande metoder. Prover som har samlats in inom projektet ger god potential att fortsätta testa ett streckkodningsbaserat BQI för makrofauna på stationsnivå.

Utöver dessa kvantitativa prover samlades även en stor mängd individer av alla de vanligare makrofauna-arterna in. Planen för dessa är göra experiment med artificiella samhällen likt de genomförda med nematoder inom projektet. Ett experimentellt upplägg med samhällen baserade på lika fördelning av abundans, biomassa (våtvikt eller torrsvikt) och DNA mängd för ett antal arter finns planerat. Detta kommer utgöra ett mer kontrollerat test av streckkodning av makrofauna, och kan klargöra orsaken till *Marenzellerias* överrepresentation i streckkodningsproven från 2021.

I dessa prover finns stor potential till fortsatt arbete. Speciellt för att testa och optimera DNA-metoder för makrofauna. Då vissa av stationerna även har meiofaunaprover insamlade så kan en jämförelse mellan meio och makrofauna-streckkodning göras på stationsnivå. Allt detta ryms inte inom projektet, som går mot sitt slut, men har potential att genomföras i framtida projekt.

## 4.5 Diskussion

### **Kan vi kvantifiera bentiska samhällen med sekvenseringsmetoder?**

Sekvenseringsbaserade metoders förmåga att kvantifiera biologiska samhällen är en central fråga för diskussion om deras användningsområden (till exempel Porazinska m.fl., 2010; Dell'Anno m.fl., 2015; Schenk m.fl., 2020). Resultaten i Arbetpaket 2 visar att data från DNA-streckkodning speglar kvantitativa förhållanden i bentiska samhällen. I både resultaten från nematod-experimenten och resultaten från makrofauna-prover så var de relativa proportionerna av sekvensläsningar för ett taxon beroende av dess faktiska relativa abundans i samhället. Nästintill samtliga taxa som förekom i proverna återfanns också i streckkodningsdata. Detta resultat överensstämmer i breda drag med vad som rapporterats i tidigare streckkodningsstudier (Porazinska m.fl., 2010; Kelly m.fl., 2014; Elbrecht m.fl., 2017), men vissa studier har också rapporterat omfattande problem och brister i streckkodningsmetodens förmåga att kvantifiera biologiska samhällen (Piñol m.fl., 2015). Vårt resultat visar på möjligheten att använda streckkodning för övervakning av Östersjön, men också på problem som måste adresseras.

DNA-streckkodning har i visat sig kunna användas effektivt för att upptäcka nematod (Porazinska m.fl., 2010) och makrofauna (Elbrecht och Leese, 2017) mångfald i naturliga miljöer. I Arbetsspaket 2 visade både experimenten med nematod-släkten och streckkodningen av makrofauna en god överensstämmelse mellan morfologiska bestämningar och streckkodningsdata. Andra studie har dock observerat svårigheter med att identifiera samtliga nematod-arter som förekommer i prov när morfologisk och streckkodningsbaserade metoder jämförs (Dell'Anno m.fl., 2015; Schenk m.fl., 2020). I nematod-experimenten saknades inga släkten i streckkodningsdata, men bestämning av nematoder till art är svårare än bestämning till släkte, både med streckkodning och morfologiska metoder. Streckkodningsanalyser på artnivå är för nematoder därav ännu inte möjligt med god tillförlitlighet men från våra resultat så verkar streckkodning verkar ge data över nematod-förekomst på släktesnivå, vilket är nödvändigt för att analysen ska ha ekologisk relevans (Moens och Vincx, 1997). För makrofauna är morfologisk bestämning oftast lättare än för meiofauna, men svårt för vissa arter. Oligochaeter bestäms till exempel inte till högre taxonomisk nivå och behandlas sammanslaget inom miljöövervakning (HaV, 2020). Streckkodningsmetoder kan ge högre taxonomisk upplösning av dessa taxa, vilket också sågs för i Arbetsspaket 2. En studie av Elbrecht m.fl. (2017), där makrofauna i floder provtogs med streckkodningsmetoder, visade också att fler taxa kunde identifieras på grund av den högre taxonomisk upplösning som metoden ger jämför med morfologiska metoder. DNA-streckkodning bör alltså vara passande för övervakning av bredare mångfaldsmönster i Östersjön, både av nematoder och makrofauna.

När det kom till att återspegla arternas relativa abundans, mätt med individantal eller biomassa (för nematoder representerat av DNA-mängd), så var resultaten i Arbetsspaket 2 mer delade. Antalet individer och biomassa korrelerade med sekvensläsningar för nästintill samtliga taxa, både för makrofauna och nematoder. I båda fallen var korrelationen bättre med biomassa. Korrelationer med biomassa har tidigare hittats både för makrofauna (Elbrecht m.fl., 2017; Bista m.fl., 2018) och nematoder (Schenk m.fl., 2019), något som gett förhoppningar om att sekvenseringsdata kan användas för biomassaestimering i naturliga habitat. Detta skulle förbättra vår förmåga att bedöma närings och födovävsflöden i ekosystemen (Schenk m.fl., 2019). Kvantifiering av biomassa från sekvenseringsdata är dock komplext. En förhållande däremellan har visat sig vara icke-linjärt (Kelly m.fl., 2014) och kan vara påverkat av metod-bias som leder till överrepresentation av enskilda arter (Piñol m.fl., 2015).

I Arbetsspaket 2 sågs stor överrepresentation av nematod-släktena *Daptonema* och *Desmolaimus* när 28S-streckkodning gjordes, medan andra släkten, *Sabatieria*, *Halomonhystera* och *Leptolaimus*, underskattades till den grad att de gränsade till att vara totalt frånvarande i data. I streckkodningen av makrofauna, där COI-målgenen användes, visades stor överrepresentation av släktet *Marenzelleria*. En möjlig förklaring är att använda primerpar preferentiell binder till DNA-templat från vissa taxa vid PCR-amplifiering, något som påverkar resultatet (Piñol m.fl., 2015). Bias likt dessa skiljer sig mellan metoder och utgör ett jämförande mått på deras lämplighet, i vårt experiment visade till exempel 18S-streckkodningen av nematoder färre problem med bias. Jämförelser av metod-bias är enklare med makrofauna än med mindre organismer vars morfologisk bestämning är tidskrävande och har högre osäkerhet. Experimenten med artificiella samhällen som gjordes i NEMOte BARCODing visar ett tillvägagångsätt genom vilket olika DNA-metoder kan jämföras i sin lämplighet, även för meiofauna, och liknande experiment har även genomförts i andra studier

(Piñol m.fl., 2015; Schenk m.fl., 2019). Denna form av experiment kommer också genomföras med makrofauna från prover insamlade inom NEMOte BARCODing för att fortsätta testa streckkodning av makrofauna.

Vilken markörger som ger bäst resultat för streckkodning av nematoder skiljer sig åt mellan studier. Schenk m.fl., (2019) visade, till skillnad från våra resultat i Arbetspaket 2, att 28S-streckkodning av nematoder fungerade väl, medan 18S-streckkodning ej gjorde det. I en annan studie, Schenk m.fl. (2020), visades både 18S och 28S-streckkodning fungera väl. Resultaten är beroende av använt primerpar, methodspecifikationer samt vilka taxa som sekvenseras. Problemen med över och underrepresentation av släkten när 28S användes som markörger skulle därav kunna vara specifikt till de släkten som ingick i experimenten, eller till de primerpar som användes. Dessa släkten är dock abundanta i Östersjön (se Tabell 19 i Bilaga 5), och resultatet talar därav för lämpligheten hos det använda 18S primerparet (TAREuk) för övervakning av Östersjöns nematoder, speciellt jämfört med de 28S primerpar som testades, även om resultatet är släktesspecifikt. De 18S-primerpar som visade sig prestera dåligt i Schenk m.fl. (2019) var andra än de som användes i arbetspaket 2, och skillnader i specifik målregion kan ha bidragit till de olika resultaten.

Shotgun-sekvensering och streckkodning har tidigare jämförts i studier, och metoderna har visat olika fördelar och nackdelar (Bista m.fl., 2018). Både 18S-streckkodning och shotgun-sekvensering visade sig i Arbetspaket 2 fungera väl när det kom till att kvantifiera nematodsamhället, till skillnad från 28S-streckkodning, som presterade värst av metoderna. I Bista m.fl. (2018), där båda metoderna testades för provtagning av makrofauna, sågs bättre precision med shotgun-sekvensering än med streckkodning när det kom till kvantifiering av biomassa och förekomsten av arter. Men resultaten från Arbetspaket 2 visade att 18S-streckkodning presterade likvärdigt eller till och med bättre än shotgun-sekvensering, en dyrare metod, när det kom till kvantifiering av biomassa hos Östersjöns nematoder.

### **Implikationer för övervakning av nematoder**

Resultaten i Arbetspaket 2 talar för att streckkodningsdata över nematod-samhället kan användas som underlag för bedömning av ekosystemhälsa. Trots att viss över och underrepresentation fanns på släktesnivå så speglade data från 18S-streckkodning fördelningen av känslighetsklasser väl. På samhällsnivå bör de alltså kunna representera ekologiskt relevanta förhållanden, så länge stora metod-bias ej finns. Klassning av nematoders känslighet och tolerans, så som tilldelningen av känslighetsvärden, kommer vara ett viktigt steg för att möjliggöra deras inkludering i miljöövervakningsindex som BQI. Att ta fram korrigeringsfaktorer för samtliga nematod eller meiofauna släkten i Östersjön genom experiment likt de ge genomförda i Arbetspaket 2 skulle vara både dyrt och tidskrävande. Våra resultat visar att om en tillförlitlig klassificering av känslighet görs på släktesnivå, och lämpliga streckkodningsmetoder används, så bör detta inte vara nödvändigt.

Den fortsatta utvecklingen av metoder som shotgun-sekvensering, en dyrare metod (Hovmöller m.fl., 2017) men som visat sig prestera bättre än streckkodning i andra studier (Bista m.fl., 2018), bör följas. Shotgun-sekvensering är intressant eftersom PCR-metoder inte används. Metoden är därav opåverkad av metodfel vid PCR-amplifiering och primer-bias. I nuläget är streckkodning dock mer fördelaktigt i termer av kostnadseffektivitet.

Fortsatt forskning om vilka markörgener, primerpar och andra metod specifikationer som är bäst lämpade vid streckkodning av nematoder bör också utvärderas inom ett nematod-övervakningsprogram. Den kvalitetssäkringsmetod som beskrivits i Arbetspaket 1, där vissa individer bestäms morfologiskt inom ett streckkodningsbaserat program, skulle möjliggöra metodutveckling genom att över tid beskriva brister i metoderna. Men då 18S-streckkodning med de primerpar (TAREuk) och metod-detaljer (Bilaga 1) som använts i NEMOte BARCODing visade sig prestera både väl och bäst av de testade metoderna så kan vi rekommendera denna metod för ett miljöövervakningsprogram av Östersjöns nematoder som skulle implementeras idag.

### Implikationer för övervakning av makrofauna

Streckkodning av Östersjöns makrofauna kommer fortsätta att utforskas med de inom projektet insamlade proverna. Men de goda korrelationerna som visades mellan sekvenseringsläsningar och biomassa eller abundans för 15 av 17 i data gemensamma taxa indikerar att potential finns för att göra statusklassning baserat på makrofauna-streckkodning. För makrofauna återstår dock större hinder än för nematoder, och dessa måste överkommas för att detta ska vara möjligt.

BQI baserat på streckkodningsdata följde till viss del mönstren i BQI baserat på morfologiska metoder. Sekvenserings-baserade varianter har skapat för andra index (Aylagas m.fl., 2014) och inkludering av streckkodningsdata i index är viktigt för att metodernas ska utvecklas och nå sin fulla potential för användning inom miljöövervakning (Pawlowski m.fl., 2018). De skillnader som fanns gentemot samhällsstrukturen baserat på individantal, som BQI är ämnat för, hade dock en avgörande inverkan på BQI uträkningen. BQI räknat med streckkodningsdata hade låga värden som alla var inom ett smalt spann, trots att stationer med både högt och lågt BQI sekvenserats. En meningsfull bedömning av ekologisk status är svår att göra med på ett för smalt spann av värden (Leonardsson m.fl., 2009). Anledningen till det smala spannet var den minskade representationen av känsliga arter, samt överrepresentationen av släktet *Marenzelleria* (som klassas som tolerant med BQI-känslighetsvärde 5). Medan överrepresentationen av *Marenzelleria* bör kunna överkommas genom optimering av metoderna så är den minskade representationen av känsliga arter troligt något som kommer kvarstå och behöva korrigeras för i ett streckkodnings-BQI.

Korrigeringsfaktorer för makrofauna kan möjligtvis baseras på konverteringsfaktorer mellan individantal och biomassa. På grund utav de korrelationer som visats i NEMOte BARCODing och andra studier (Elbrecht m.fl., 2017; Bista m.fl., 2018) har detta potential att förbättra återspeglings av samhället och det skulle öka representationen av abundanta känsliga arter så som *Monoporeia affinis* (med BQI-känslighetsvärde 15) för vilka individer väger mindre i genomsnitt än till exempel *Macoma balthica* (med känslighetsvärde 5) som också är abundant i Östersjön (Ankar och Elmgren, 1978). Littaraturvärden för estimering av biomassa skulle kunna användas (till exempel de i Ankar och Elmgren (1978)) eller en uträkning baserat på den stora mängden data som finns från miljöövervakningen. Genomsnittlig individstorlekt skiljer sig dock mellan stationer, och detta kombinerat med osäkerhet i sekvensläsningar kan försök att efterlikna ett individantalsbaserat BQI med tillfredställande tillförlitlighet. Större justeringar av BQI och en mer självständig utformning för en streckkodningsvariant kan då vara nödvändig.

Sekvenseringsbaserade varianter av ett annat bottenfauna index, AMBI, gAMBI, har tidigare utvecklats (AMBI beskrivet i Borja m.fl. (2000), gAMBI beskrivet i Aylagas m.fl. (2014)). Likt våra resultat för BQI så har gAMBI visat sig korrelera bättre med AMBI varianter baserade på biomassa (Warwick m.fl., 2010), än det ursprungliga AMBI baserat på individantal (Aylagas m.fl., 2018). AMBI baserat på förekomst (Warwick m.fl., 2010), om taxa hittas i provet eller inte, har också utforskats för både sekvenseringsdata och data från traditionella metoder med jämförbara resultat däremellan (Aylagas m.fl., 2014, 2016, 2018). Ett förekomstbaserat BQI skulle dock troligtvis fungera dåligt i det artfattiga Östersjön.

Utöver över och underrepresentation av vissa arter så observerades även korskontaminering som ett problem för ett streckkodnings-BQI för makrofauna. *Marenzelleria* förekom i sekvenseringsdata för prov där de inte funnits i det egentliga provet. Detta tyder på korskontaminering, som kan ha stor påverkan i DNA-streckkodning (Aylagas m.fl., 2016). Extra cellulärt DNA i till exempel maginnehållet av vissa djur kan även ha bidragit, men *Marenzelleria* bör ej ha förekommit i närområdet för samtliga stationer. Biblioteksförberedelser utfördes sterilt, men labb och fältarbete där makrofauna provtogs och bestämdes morfologiskt gjorde inte det likt inom nuvarande miljöövervakningsprogram. Att kontamineringar kombinerat med metod-bias kan få stora effekter på resultatet är problematiskt för användningen av ett streckkodningsbaserat Makrofauna-BQI. Korskontaminering kan minimeras i fält (Aylagas m.fl., 2016), men kan vara svårt att undvika helt om övervakning ska ske vara kostnadseffektiva. Att hitta kostnadseffektiva lösningar för att minimera korskontaminering är därav en viktig fråga att lösa för streckkodningsövervakning av makrofauna, och miljöövervakning med sekvenseringsbaserade metoder i allmänhet.

Den ökade taxonomisk upplösningen som DNA-streckkodning har potential att förbättra precisionen för statusbedömningar. Att antalet taxa som identifieras i prov höjs skulle potentiellt också underlätta uträkningen av empiriska känslighetsvärden i Östersjön med de metoder som använts inom BQI (Rosenberg m.fl., 2004; Leonardsson m.fl., 2015). Dock krävs arbete för att hantera och bearbeta den taxonomisk informationen, och utvecklingen av metoder och rutiner för detta kommer behövas. Detta inkluderar tilldelning av existerande känslighetsvärden till rätt taxa, särskiljning av tolerans för de arter som tidigare behandlats som ett sammanslaget taxon, uteslutning av arter som uppenbart kommer från kontaminering, samt hantering av förändringar av taxonomi i databaser. Konkret så behövs standardiserade arbetsflöden vid dataanalys samt utvidgade listor av känslighetsvärden och uteslutna taxa (som de i HaV, (2020)).

Det krävs alltså fortsatt utforskning och metodutveckling för att möjliggöra streckkodningsbaserad övervakning av Östersjöns makrofauna. Det bör tilläggas att streckkodningen av makrofauna gjordes efter att proverna sorterats på labb, och detta skulle inte utgöra en kostnadseffektivisering av metoderna. I det artfattiga Östersjön är artbestämning inte heller ett avgörande moment för tidsåtgången i makrofauna-övervakning. Streckkodning av makrofauna bör dock fortsatt utforskas och i framtiden kan metoden möjligtvis användas för att provta flera organismgrupper, både makrofauna och meiofauna, samtidigt (Porazinska m.fl., 2010; Bik m.fl., 2012).

## Implikationer för streckkodningsövervakning generellt

Resultaten i NEMOte BARCODing visar att streckkodning kan ge en approximativ representation av samhällsstrukturen i bentiska habitat, men att de inte utgör ett exakt mått av individantal eller biomassa. Möjligtvis bör sekvensläsningar ses och behandlas som ett mått i sig, men betydande snedfördelningar i samhällskomposition måste tas hänsyn till. Vid implementering av sekvenseringsbaserade miljöövervakningsprogram bör val av metoder övervägas baserade på lämplighet för just miljöövervakningssyften. Inom program där metoder och bedömningsgrunder är framtagna för, och baserat på, sekvenseringsdata så kan minskad osäkerhet i resultat för prov vara mer fördelaktigt än minimerad skillnad mot den faktiska samhällskompositionen. Arbetspaket 2 visar att sekvenseringsmetoder, trots vissa metod-bias, ger konsekventa resultat. Resultaten visade också DNA-streckkodning, med rätt metoder, ger en god representation av samhället och dess mångfald, trots att sekvenseringsläsningar inte utgör en exakt representation av individantal eller biomassa. Det visar också att metod-bias kan ha avgörande effekt på resultatet om felaktigt metodval görs.

Metoderna för streckkodning av makrofauna behöver fortsätta utforskas för att hitta lämpligare metoder än de använda i Arbetspaket 2, och prover som samlats in inom projektet kommer användas för detta. Men den lägre förekomsten av just känsliga arter i streckkodningsdata kommer troligtvis behöva korrigeras för i ett streckkodnings-BQI för makrofauna oavsett metod.

För nematoder så visade resultaten i Arbetspaket 2 att sekvenseringsdata, från lämpliga streckkodningsmetoder, utan korrigering kan ge en god representation av samhällsstrukturen. Resultaten visade även att klassificering av nematoders känslighet kan förbättra återspeglingsgällande ekologiskt relevanta förhållanden i nematod-samhället. I Arbetspaket 3, som syftar till att utveckla verktyg för klassificering av ekologisk status, kommer därav sekvenseringsdata över nematod-samhället utan korrigeringar användas. Streckkodning av 18S-målgenen med de använda primerparen (TAREuk) var bäst lämpade av de testade metoderna och rekommenderas därav, tillsammans med de övrigt använda metodspekifikationerna, för miljöövervakning av Östersjöns nematoder.

# 5. Arbetspaket 3. Verktygen för att bestämna ekologisk status med nematoder

## 5.1 Bakgrund och syfte

Övervakning av ekosystemens hälsa kräver robusta och precisa verktyg, där resultaten ger ett tydligt handlingsunderlag åt förvaltare och effektivt informerar allmänheten om miljöns hälsotillstånd. Vattendirektivet anger därav att områdets ekologiska status ska klassas till antingen Hög, God, Måttlig, Otillfredsställande eller Dålig status (Europaparlamentets och rådets direktiv 2000/60/EC, 2000), och Havsmiljödirektivet förenklar klassificeringen till antingen God eller Dålig status (Europaparlamentets och rådets direktiv 2008/56/EG, 2008). Index är den vanligaste formen som statusklassningsverktyg tar, och dessa används för klassificering av ekologisk status i de flesta bedömningsgrunder. Index sammanfattar data, som kan variera i typ och skala, till ett enskilt värde för jämförelse som sedan kan jämföras mot tröskelvärden. BQI, som används för övervakning av mjukbottenlevande makrofauna i Sveriges kust och havsområden, är baserat på 3 olika datatyper: den första är fördelningen av känsliga respektive toleranta arter, den andra antalet arter och den tredje det totala antalet individer i samhället (Leonardsson m.fl., 2009, 2015), se Faktaruta om BQI för mer detaljer.

Makrofaunasamhället i Östersjöns artfattigdom gör Makrofauna-BQI mindre robust i havet. Salthaltsgradienten har även en avgörande effekt på artantalet i Östersjöns habitat (Segerstråle, 1957), och därav kan BQI variera kraftigt mellan havsbassänger (Zettler m.fl., 2007; Fleischer och Zettler, 2009). Ett index baserat på nematoder bör vara mindre känsligt mot dessa variationer på grund utav det högre antalet arter och individer (Elmgren m.fl., 1984). Nematod-övervakning har alltså potential att vara mer robust mot förändringarna mellan områden och stokastisk variation än övervakning av makrofauna. Som diskuterat tidigare i rapporten så skulle övervakning av nematoder också bidra med värdefull information och potentiellt höja kostnadseffektiviteten inom miljöövervakningsprogram. För miljöövervakning med nya indikatorer, så som nematoderna, behövs dock utveckling av statusklassningsverktyg så en bedömningsgrund kan definieras. Om vi vill ta vara på fördelarna av nematodövervakning så behövs alltså ett index som gör att vi kan gå från data över nematod-samhället till en klassificering av ekologisk status, ett Nematod-BQI.



## Faktaruta om BQI

Indexet BQI som verktyg för att bestämma ekologisk status i havsmiljöer formulerades i Rosenberg m.fl. (2004), och hade 2 delar, känslighetsfaktorn, fördelningen av toleranta respektive känsliga arter, samt viktning av indexet baserat på antalet arter. I bedömningsgrunder benämns indexet ofta BQIm för att särskilja det från ett index med samma namn och förkortning som använts i övervakning av svenska sjöar sedan 80-talet (Wiederholm, 1980).

Känslighetsfaktorn är den del i BQI med störst vikt, och utgår från känslighetsvärden som tilldelats arter. Känslighetsvärdet för varje art räknades i Rosenberg m.fl. (2004) empiriskt ut genom att beräkna den 5te percentilen av det förväntade antalet arter,  $ES_{0,05}$  (uträknat mer rarefiekurvor för 50 individer), för artens abundans (Rosenberg m.fl., 2004). Detta ger ett värde som indikerar om arten förekommer i habitat med få arter (tolerant) eller habitat med många arter (känslig). Appliceringen av denna metod i Östersjön som har en naturligt låg diversitet gav endast statusklassningar under god status (Zettler m.fl., 2007). En studie av Schiele m.fl. (2016) där  $ES_{0,05}$  metoden användes i Östkusten visade också att arter som bedöms vara känsliga, så som *Bylgides sarsi* och *Monoporeia affinis*, klassades som relativt toleranta med metoden.  $ES_{0,05}$  känslighetsvärden uträknade i Östersjön får även ett smalare span än på västkusten, vilket skulle minska indexets upplösning samt minska vikten av känslighetsfaktorn (Leonardsson m.fl., 2009). Leonardsson m.fl. (2009) presenterar i stället känslighetsvärden för Östersjöns arter som är baserade på expertbedömning, där värdena 1, 5, 10 och 15 används för att representera en skala från tolerant till känslig. Leonardsson m.fl. (2009) föreslog även abundansfaktorn som ett tillägg till BQI, vilket korrigerar för fall då en enskild individ med högt känslighetsvärde simmar till ett kraftigt stort område. Nuvarande formell för BQI är alltså följande:

$$BQI = \left[ \sum_{i=1}^{S_{klassade}} \frac{N_i}{N_{klassade}} \times \text{Känslighetsvärde}_i \right] \times \log_{10}(S + 1) \times \left( \frac{N_{totalt}}{N_{totalt} + 5} \right)$$

Ekvation 1.  $S_{klassade}$  är antalet taxa med känslighetsvärde,  $N_i$  är abundansen av taxon  $i$ ,  $N_{klassade}$  är den totala abundansen av taxa med känslighetsvärde, Känslighetsvärde $_i$  är känslighetsvärdet för taxon  $i$ ,  $S$  är artantalet och  $N_{totalt}$  är totala abundansen av alla arter per 0,1 m<sup>2</sup>

Och utgörs av tre faktorer. Den första faktorn, känslighetsfaktorn, baseras på fördelningen av toleranta respektive känsliga arter, och är summan av varje arts känslighetsvärde viktat mot dess relativa abundans av arter med känslighetsvärde, vilket ger ett viktat känslighetsvärde för provet. Den andra, artantalsfaktorn, är logaritmen av antalet arter i provet plus 1 i basen 10, den gemensamma logaritmen. Denna faktor sänker värdet på prov med ett artantal under 9, och höjer de med ett artantal över 9. Den tredje är abundansfaktorn, antalet individer i provet (per 0,1 m) delat med antalet individer i provet plus 5, som representerar abundansvärdet där abundansfaktorn är lika med 0.5 och då halverar indexet.

I Leonardsson m.fl. (2009) föreslogs också metoden som används för att statistisk säkerställa den ekologiska statusen för en vattenförekomst, uträknandet av den 20:e percentilen av områdets BQI-medelvärde med bootstrap-metoder. I samband med WATERS projektet förslags ytterligare förändringar av BQI (Andersen m.fl., 2016). Däribland att känslighetsvärdet skulle räknas ut med det observerade artantalet i stället för det förväntade ( $S_{0,05}$ ), att BQI på västkusten skulle korrigeras för djup, och ett nytt index pBQI för Östersjön (Leonardsson m.fl., 2015, 2016; Andersen m.fl., 2016). Dessa har dock ännu inte implementerats i bedömningsgrunderna (HaV, 2012, 2019).

Genom Arbetspaket 1 har NEMOte BARCODing praktiskt bidragit till att förbättra referensbiblioteken, en central infrastruktur för streckkodningsövervakning, och genom Arbetspaket 2 så har projektet visat på streckkodningsmetodernas förmåga att kvantifiera nematod-samhället. I det tredje Arbetspaketet har NEMOte BARCODing utvecklat det verktyg som möjliggör statusklassning baserat på nematod-data, ett Nematod-BQI. För att förenkla utveckling av detta index, samt underlätta dess implementering i ett övervakningsprogram, så valde NEMOte BARCODing att ha formen för Makrofauna-BQI som utgångspunkt. På så sätt kan indexet anpassas nematod och DNA-streckkodningsdata, men med potential att använda existerande tröskelvärden i en inledande fas av nematod-övervakning. Ett Nematod-BQI skulle öka statusklassningarnas upplösning speciellt i Bottenviken, där markofaunamångfalden naturligt är extra låg (Elmgren m.fl., 1984; Jenny Caruso m.fl., 2013), och i de syrefria habitaterna i Egentliga Östersjön, där makrofauna saknas helt (Norkko m.fl., 2015). I syrefattiga miljöer utan makrofauna utgör nematoderna en potentiell biologisk indikator (Broman m.fl., 2021). Ett Nematod-BQI kan därav förbättra vår förmåga att bedöma ekosystemhälsa, samt identifiera potentiell återhämtning, i Östersjöns dödzoner. Detta skulle innebära att åtgärder mot övergödning bättre kan utvärderas, och därigenom stärka den målbaserade förvaltningen av Östersjön.

Målen för arbetspaket 3 var:

- Att utveckla de index som används för miljöövervakningen av bentiska habitat och därav möjliggöra inkluderingen av nematoder.
- Att med denna utveckling formulera ett Nematod-BQI index, och med detta verktyg göra statusklassningar för jämförelse mot Makrofauna-BQI.
- Att ge ett förslag till ett standardiserat meta-streckkodningsprotokoll för miljöövervakning av meio och makrofauna i Östersjön.

## 5.2 Metod

### 5.2.1 Beskrivning av prover och data

Dataanalysen i Arbetspaket 3 baserar sig främst på 200 prover tagna mellan 2015 och 2019 från miljöövervakningsstationer med jämförbara makrofauna-data. Ytterligare ett prov tagits i samband med miljöövervakningen, men som ej hade jämförbara makrofauna-data, användes för uträkningen av känslighet baserat på antalet nematodsläkten. Detta prov användes dock inte i några jämförelser mellan nematod och makrofauna-data eller i uträkningen av beskrivande data för nematoder.

Samtliga prov genomgick biblioteksförberedelser för 18S. Biblioteksförberedelser för 16S-rRNA och metagenomik har också genomförts för proven i andra syften, men dessa data ingick inte i dataanalysen för Arbetspaket 3. Sekvenssegmenten jämfördes mot NCBI med hjälp av BLAST algoritmen. De amplikonsekvenser som blev bestämda till fylum *Nematoda*, samt hade en taxonomisk bestämning till släkte separerades, dessa utgjorde dataunderlaget nematod-samhället i analysen. Av de läsningar som bestämdes till *Nematoda* var 73 % bestämda till släkte, och av de sekvenser (ASVs, *Amplicon sequence variants*) som bestämts till *Nematoda* var 80 % bestämda till släkte (se Tabell 17 och Tabell 18 i Bilaga 4). Analys på släktesnivå valdes för att få en balans mellan behållna sekvensläsningar och tillräckligt god upplösning för ekologisk relevans (Moens och Vincx, 1997). I två av proven saknades nematodssekvensläsningar helt, dessa behandlades som att nematoder saknades från provet.

Makrofauna-data för provtagna stationer hämtades från Sharkweb för åren 2015 till 2019. Data för ett antal stationer fanns inte på Sharkweb, men tillhandahölls av ansvariga för miljöövervakningen av mjukbottenfauna på Stockholms universitet. Abundansdata användes för beräkning av artrikedom samt BQI per prov för de jämförda stationerna. Statusklassning gjordes enligt Leonardsson m.fl. (2009) och bedömningsgrunderna (HaV, 2020) med arternas känslighetsvärde för Östersjön. Statusklassning gjordes utifrån vattenförekomst eller stationskluster i de fall ett stationskluster var delat på flera vattenförekomster. Jämförelse mellan nematod-data och makrofauna-data gjordes per provtagningstillfälle och medelvärdet för varje tillfälle räknades ut när mer än ett makrofauna-prov var taget. På 35 stationer saknades levande makrofauna, vilka räknades till BQI värde 0.

Miljövariabler så som syremättnad och salinitet, vilka samlats in i miljöövervakningen, användes även. För två tillfällen där syremättnad saknades tog medelvärdet från de kringliggande åren vid samma station.

För att underlätta att implementeringen av nematod-övervakning så fokuserades arbetet på att ta fram ett liknande index för nematoder. Detta index kommer benämnas Nematod-BQI i skriften text för att tydligt särskilja det från Makrofauna-BQI. I formler kommer  $BQI_{nem}$  användas, som är mer passande för framtida användning då indexet är etablerat.

## 5.2.2 Formulering av ett Nematod-BQI index

Om ett Nematod-BQI skulle initialt kunna använda samma tröskelvärden som Makrofauna-BQI i bedömningsgrunder skulle det underlätta den initiala implementeringen av ett nematod-övervakningsprojekt. Makrofauna-BQI är även, trots brister, det bästa måttet på ekologisk status för de jämförda stationerna. Korrelationer och jämförelser med Makrofauna-BQI och dess olika faktorer samt jämförelser av statusklassningar utgjorde därav en del i utvärderingen av potentiella Nematod-BQI formler samt känslighetsvärden. Målet var dock inte att maximera korrelation eller likheten med Makrofauna-BQI, utan att visa på samstämmighet i bred drag gällande de jämförda stationernas ekologiska status.

Särskild vikt gavs också till stationer/provtagningstillfällen där levande makrofauna saknades, då en fördel med ett Nematod-BQI är potentialen att bedöma dessa stationer på större djup eller drabbade av syrebrist (medelvärde för syremättnad vid provtagningstillfällen utan levande makrofauna var 0,92 mg/l). Variation i ett Nematod-BQI för dessa provtagningstillfällen är naturligt, men hade de varit samma värde eller högre än resterande provtagningstillfällen. Beskrivande statistik så som medelvärden kommer därav presenteras både för alla provtagningstillfällen, och för de tillfällen där levande makrofauna hittades respektive inte hittades.

Då ett problem för uträkningen av makrofaunakänslighetsvärden med de metoder som används på västkusten är skillnaderna mellan havsbassänger och mångfaldens beroende av salthaltsgradienten (Zettler m.fl., 2007), samt att denna påverkar Makrofauna-BQI som det görs i Östersjön idag, så testades även hur stort detta problem var för ett Nematod-BQI. Saliniteten är dock även högre i djupare områden, som tenderar att vara artfattigare, vilket gör att fler faktorer måste tas med i en modell som mäter effekten av salinitet i Östersjön (Norkko m.fl., 2015). I stället användes en korrelation med longitud för att se om ett mönster fanns mellan index eller mångfald och Östersjöns miljögradient från norr till syd.

## Släktesantalsfaktorn

Artantalsfaktorn i Makrofauna-BQI tar in en stations biologiska mångfald som en del i bedömningen av ekologisk status (Rosenberg m.fl., 2004). Nematodernas biologiska mångfald kan också användas för att bedöma ekosystemhälsa (Lambshead m.fl., 1983). Stationer med hög mångfald bör bedömas ha högre ekologisk status. I det här fallet är mångfald mätt i antalet släkten, då detta är den taxonomiska nivån vi valt att basera vår analys på. Om nematoder inte förekom i provet räknades även Nematod-BQI till 0, likt för Makrofauna-BQI, detta var fallet i 2 prov.

Då antalet nematod-släkten är högre än antalet makrofauna-arter så behövs en korrigering av värdet för antalet släkten om en släktesantalsfaktor i Nematod-BQI ska kunna fylla samma roll som artantalsfaktorn i Makrofauna-BQI. Denna roll är att sänka BQI-värdet för de stationer som har låg mångfald, och höja det för de som har hög mångfald. I Makrofauna-BQI så sänks prov med mindre än 9 arter, medan prov med över 9 arter ökar. Antalet nematod-släkten korrelerade väl med antalet makrofauna-arter ( $\rho = 0,71$ ,  $p > 0,001$ ), vilket möjliggjorde användandet av en korregeringsfaktor för att få ett jämförbart resultat med artantalsfaktorn. Korregeringsfaktorn som valdes var att dela antalet nematod-släkten med 3,5. Detta var medelvärdet av förhållandet mellan antalet nematod-släkten och makrofauna-arter och även kurvan för en linjär regression med makrofauna artantal som responsvariabeln och nematod släktesantal förklarande variabel.

Vi ville även bestraffa, alltså ytterligare sänka indexvärdet, för stationer med särskilt lågt antal släkten. Detta av liknande anledningar som inkluderingen av abundansfaktorn i Makrofauna-BQI, stationer med inga eller väldigt få nematoder bör få ett lågt BQI-värde. Enskilda släkten med högt känslighetsvärde kan förekomma i data på grund av korskontaminering eller PCR-artefakter, och Nematod-BQI blir mer robust mot dessa metod-fel genom att bestraffa stationer med väldigt lågt antal släkten. En modifierad variant av abundansfaktorn (som inte kan räknas med sekvensdata), inkluderades därför, med antalet släkten i stället för abundans. Detta ses som en andra del av släktesfaktorn, där antalet släkten delas med antalet släkten plus 2,5. Värdet 2,5 valdes genom en bedömning av vad som sänkte proverna med lågt släktesantal tillräckligt och samtidigt höll indexet jämförbart med Makrofauna-BQI. Dessa två kommer i rapporten tillsammans att benämnas som släktesantalsfaktorn. Formeln för Nematod-BQI som användes var alltså:

$$BQI_{nem} = \left[ \sum_{i=1}^{S_{klassade}} \frac{N_i}{N_{klassade}} \times \text{Känslighetsvärde}_i \right] \times \log_{10} \left( \frac{S}{3,5} + 1 \right) \times \left( \frac{S}{S + 2,5} \right)$$

Ekvation 2. Där  $S_{klassade}$  är antalet taxa med känslighetsvärde,  $N_i$  är antalet sekvensläsningar av släkte  $i$ ,  $N_{klassade}$  är det totala antalet sekvensläsningar för släkten med känslighetsvärde,  $\text{Känslighetsvärde}_i$  är känslighetsvärdet för släkten  $i$ ,  $S$  är antalet släkten. Densamma som i formeln för Makrofauna-BQI förutom att  $S$  är antalet släkten istället för arter.  $N_i$  respektive  $N_{klassade}$  räknas även med sekvensläsningar tillika relativ abundans av dessa, men detta utgör inte en skillnad mot hur Makrofauna-BQI då det är den relativa fördelningen som räknas ut i båda fallen.

Denna formel för släktesfaktorn var inte den enda möjliga, och är öppen för korrigering, vilket skulle vara nödvändigt om antalet släkten är högre eller om arter ska användas i stället. Till exempel skulle en högre bas av log kunna användas, användning av log i bas 35 i stället för att dela antalet släkten med 3.5 visade jämförbara resultat som ovanstående indexformulering. Användning av  $\log_{10}$  valdes då det underlättar kommunikation och jämförelse med Makrofauna-BQI. Hur ett index likt BQI skulle påverkas av ett mycket stor sifferspann i taxaantal bör dock utvärderas.

### **Känslighetsfaktorn och känslighetsvärden**

Faktorn med högst vikt i BQI är känslighetsfaktorn (Leonardsson m.fl., 2009). För att ett Nematod-BQI ska framgångsrik kunna användas för att bedöma ekologisk status måste nematod-släkten ges känslighetsvärden som representerar verkliga ekologiska förhållanden. Flera metoder för att göra detta utforskades i NEMOte BARCODing, och samtliga har inte inkluderats i rapporten. För empiriska metoder gavs kravet att nematodsläktet skulle förekomma i minst 20 prov, vilket var kravet vid bestämningen av nuvarande makrofauna-känslighetsvärden (Rosenberg m.fl., 2004; Leonardsson m.fl., 2015). Antalet prov bedömdes vara för få för att använda förekomst i minst 40 prover som gräns som föreslås i Leonardsson m.fl. (2015). 41 av 121 nematod-släkten förekom i mer än 20 prov, dessa utgjorde i snitt 97 % av den relativa abundansen och minst ett av släktena förekom i samtliga prov där nematoder förekom generellt. Känslighetsvärden avrundades till närmaste heltal då det gör dem till ett mer effektivt kommunikationsverktyg om organismers känslighet. Det kontrollerades först att detta endast hade marginell effekt på resultaten.

Metodval gjordes i enighet med de kriterier som beskrivits för indexet i allmänhet ovan. Utöver dessa togs praktiska avvägande in, med vikt på möjligheten att räkna om värdena i framtiden samt arbetsbördan som skulle vara nödvändig för detta. Det är en fördel om känslighetsvärdena kan baseras på data som samlas in i nuvarande miljöövervakning, eller endast målorganismerna själva, och därav inte kräver extra arbete utöver provtagning av nematoderna. Användningen av känslighetsvärden baserat på litteratur från Modig och Ólafsson (1998) och Ridall och Ingels (2021) utforskades även, och presenteras som underlag för diskussion om expertbestämda nematod-känslighetsvärden. Men då dessa värden inte kan räknas om presenteras de ej som alternativ till känslighetsvärden för nematoder.

### **Känslighetsvärde $S_{0.05}$ , uträknat med relativ abundans**

Då antalet nematod-släkten är högre än antalet makrofauna-arter i Östersjön finns potential i att använda en likande metod som den använd på västkusten (Rosenberg m.fl., 2004; Leonardsson m.fl., 2015). Metoden beskriven i (Leonardsson m.fl., 2015), där känslighetsvärdet räknas ut som 5:e percentilen av artrikedom för en arts-abundans,  $S_{0.05}$  valdes som passande för sekvensdata. Till skillnad mot metoden i Leonardsson m.fl. (2015) användes antal släkten, samt släktets relativa abundans i stället för absoluta abundans. Den stratifiering som gjordes i Leonardsson m.fl. (2015), vilken har syftet att statistiskt säkerställa att känslighetsvärdet är det lägsta för arten, gjordes inte heller då en tydlig kategorisering av prover i de som kom från påverkade och inte påverkade områden inte fanns, samt att ett större antal prover bedömde behövas för metoden.

$S_{0.05}$  räknades ut för släkten som förekom i minst 20 prov ut som 5:e percentilen nematodsläktesantal för varje släktes relativa abundans. Detta gjordes med funktionen "wtd.quantiles" från R paketet "Hmisc" (Harrell, 2023). Parametern "norm.wt = TRUE" användes. En analys av likgiltighetsgrad för släkterna ("degree of indifference") uträknad enligt Leonardsson m.fl. (2015) gjordes även med samma funktion. Likgiltighetsgraden räknas ut som skillnaden mellan den 97,5:e percentilen och 2,5:e percentilen, delat med det maximala värdet, i det här fallet släktesantal, i något prov. Värdena föll i ett spann (1 till 26) och hade en fördelning som gjorde att Nematod-BQI baserat på dessa skulle få ett jämförbart värde med Makrofauna-BQI. Därav gjordes ingen omvandling av värdena för att få ett mer jämförbart värde med Makrofauna-BQI, och Nematod-BQI uträknat med  $S_{0.05}$  känslighetsvärden bedömdes kunna användas med existerande tröskelvärden för klassning av ekologisk status.

### Generalisering av 5:te percentil metoden baserat på andra variabler

Som en förlängning av metoden för att räkna ut  $S_{0.05}$  testades även att tilldela känslighetsvärden baserade på 5:te percentilen av andra underliggande värden som samlas in i miljöövervakningsprogrammen. Flera variabler utforskades inom NEMOte BARCODing, 2 av dessa presenteras här:

Syremättnad i bottenvatten, då förekomst i syrefattiga miljöer visar tolerans mot syrebrist. Dessa känslighetsvärden kommer benämnas  $DO_{0.05}$ , där DO står för syremättnad, *dissolved oxygen* på engelska.

Och Makrofauna-BQI värdet för station/provtagningstillfälle, då släkten som förekommer på stationer med låg ekologisk status, BQI värde lågt eller 0 (ingen makrofauna), bör kunna ses som toleranta. Dessa känslighetsvärden kommer benämnas  $BQI-Sens_{0.33}$ , för att påvisa att de är baserade på BQI-värden, men särskilja dem från indexet BQI. Då 17,5 % av provtagningstillfällena (35 stycken) saknade makrofauna så valdes en högre percentil än den 5:te. För många släkten fick annars värdet 0, vilket skulle resultera i en skev fördelning av känslighetsvärden. Den 33:e percentilen valdes för att minimera antalet släkten som fick värde 0 men fortfarande behålla anledningen att använda en lägre percentil för uträkning, att släktet representeras av de mest toleranta individerna (Rosenberg m.fl., 2004). För tre släkten, *Halomonhystera*, *Molgolaimus* och *Sabatieria*, så var BQI-värdet vid den 33:e percentilen av dess relativa abundans fortfarande 0.

En analys av likgiltighet gjordes för dessa känslighetsvärden,  $BQI-Sens_{0.33}$  och  $DO_{0.05}$ , med samma metod som för  $S_{0.05}$  fast med percentil och maximumvärden för de relevanta variablerna.

Då värdet som tilldelas släkten från uträkning av percentilen av dessa två variabler (syremättnad och Makrofauna-BQI) inte faller i samma spann som de känslighetsvärden som används för makrofauna så gjordes en omvandling av värden för att existerande tröskelvärden (vid klassning av ekologisk status) ska kunna användas. Målet med omvandlingen var att känslighetsvärdena skulle ha ett jämförbart viktat medelvärde med makrofaunakänslighetsvärden (vid jämförda provtillfällen). Vi ville även att det minsta värdet skulle vara 1. Det viktade medelvärde för makrofauna, medelvärdet av känslighetsfaktorn för provtillfällena, var 8,9.

För att uppnå detta så genomfördes en standardisering av känslighetsvärdena som räknades ut baserat på 5:te percentilen av syremättnad och Makrofauna-BQI. Standardpoäng räknades ut och från dessa transformerades värdena till önskad skala. Standardpoängen räknades ut med det viktade medelvärdet (funktionerna "wtd.mean" från

R paketet "Hmisc") och den viktade standardavvikelsen (kvadratroten av funktionen "wtd.var" från R paketet "Hmisc", med parametern "norm.wt =TRUE"). Släktets relativa abundans (av de som klassats) vid varje station användes som vikt.

Standardpoängen multiplicerades sedan med önskad standardavvikelse och önskat viktat medelvärde. Det önskade viktade medelvärdet adderades sedan. Då det viktade medelvärdet för makrofauna känslighetsvärden gav för stor tungvikt på högre värden så användes i stället 8, mittpunkten mellan 1 och 15. Den önskade standardavvikelsen räknades ut som den standardavvikelsen med vilken det minsta värdet skulle vara 1 efter uträkning.

Uträkningen gjordes alltså enligt följande ekvation:

$$z_i = \left( \frac{x_i - \bar{x}_w}{sd_w} \right)$$
$$\text{Känslighetsvärde}_i = z_i * \left( \frac{1 - \bar{y}_w}{\min_{z_1 \dots z_n}} \right) + \bar{y}_w$$

Ekvation 3. Där  $x_i$  är det originella percentilvärdet för släkte  $i$  som räknats ut,  $\bar{x}_w$  är det viktade medelvärde av dessa värden för alla släkten ( $i$  minst 20 prov),  $sd_w$  är den viktade standardavvikelsen för värdena,  $z_i$  standardpoängen för släkte  $i$  och  $\bar{y}_w$  det önskade viktade medelvärdet,  $i$  det här fallet 8.

Detta behåller värdenas spridning runt det viktade medelvärdet i standardpoängen, men spridningen i absoluta tal beror på det viktade medelvärdets förhållande till det lägsta värdet. Om det viktade medelvärdet ligger för nära det lägsta värdet i standardpoäng kan känslighetsvärdet få ett väldigt stort intervall, medan om det ligger för långt ifrån det lägsta värdet så kommer känslighetsvärdena få ett väldigt smalt intervall.

Att värdena behövde omvandlas för att vara jämförbara med makrofauna har såklart implikationer för dess användning. Schiele m.fl. (2016) använde normalisering, som liknar standardisering av värden, av  $ES_{0.05}$  värden för makrofauna för att bättre jämföra känslighet mellan havsbassänger i Östersjön. Schiele m.fl. (2016) ansåg dock inte att dessa var passande att använda, eftersom normalisering av känslighetsvärden skulle leda till förändrade resultat. Så länge samtliga känslighetsvärden som används räknas ut och omvandlas samtidigt, som i denna rapport, bedömer vi inte detta vara ett problem. Men i långsikten är det en brist som kan praktiskt försvåra metodens användning. En annan brist är värdenas beroende av makrofauna-data respektive syremättnadsvärden från stationer.  $S_{0.05}$  har större potential för användning på längre sikt, då endast data från nematod-samhället krävs. Inkludering av meiofauna i allmänhet skulle dock öka spannet för  $S_{0.05}$  känslighetsvärden, och omvandling dessa kan då vara nödvändigt. Inte bara för göra dem mer jämförbart med Makrofauna-BQI, som inte är nödvändigt när nematodövervakning är mer etablerad och har självständiga tröskelvärden, utan även för att värdena ska vara hanterbara och utgöra ett effektivt kommunikationsverktyg.

## Test av slumpbaserade känslighetsvärden

Släkten med förekomst i fler prov och med högre genomsnittlig relativ abundans generellt fick lägre känslighetsvärden med de uträknade metoderna. Vi ville därav testa om detta fenomen bidrog till relationen mellan Nematod och Makrofauna-BQI. Vi ville alltså testa om Nematod-BQI tenderade att korrelera med Makrofauna-BQI delvis eller enbart på grund utav att de nematod-samhället vid de starkt påverkade stationerna dominerades av generell abundanta släkten. För att testa denna effekt så räknades slumpbaserade känslighetsvärden ut för jämförelse. Funktionen ”rnorm\_bounded” från R-paketet ”dyngen” (Cannoodt och Saelens, 2022) användes för att generera värden som efterlikna den verkliga fördelningen av de använda värdena, BQI, syremättnad och släktesantal. Varje station slumpades 3 värden för vardera variabel som replikat, och känslighetsvärden räknades ut för varje replikat med respektive metod ovan. De baserat på BQI och syremättnads fördelningen genomgick standardiseringen medan de baserad på släktesantals-fördelningen inte gjorde det. Känslighetsfaktorer uträknade baserat på dessa värden korrelerade inte med makrofauna-känslighetsfaktorn (medelvärde av rho för samtliga replikat = -0,01).

## Känslighetsvärden baserat på expertbedömning

I det inledande arbetet med att ta fram känslighetsvärden för Nematod-BQI användes de 9 indikator släkten som kunde delas in i klasser av känslighet mot syrebrist baserat på Modig and Ólafsson (1998). Dessa gavs värdena:

- 1: *Sabatieria*, som bedömdes vara extra tolerant (Ridall och Ingels, 2021).
- 5: *Leptolaimus* och *Halalaimus*.
- 10: *Paracanthochus*, *Daptonema*, *Microlaimus*, och *Campylaimus*.
- 15: *Axonolaimus* och *Desmolaimus*.

De 9 släktena utgjorde en stor del av samhället i de flesta fall, i snitt 38 % av den relativa abundansen och endast 2 av 198 prover där nematoder förekom saknade de 9 släktena helt. Dock korrelerade känslighetsfaktorn för Nematod-BQI uträknat med dessa värden inte väl med känslighetsfaktorn för Makrofauna-BQI och de empiriska metoder för att räkna ut känslighetsvärden som redogörs för ovan utforskades i stället.

För att fortsatt testa konceptet med expertbedömda känslighetsvärden så användes även data från Ridall och Ingels (2021), där nematod-släkten listas som känsliga respektive toleranta baserat på benämningar om känslighet i litteraturen. Ridall och Ingels (2021) gav varje släkte minus 1 per artikel de benämns som känsliga och plus 1 per artikel de benämns som toleranta.

Av de 121 nematod-släkten som fanns i vår data var 43 listade i Ridall och Ingels (2021). Dessa utgjorde i snitt 60 % av den relativa abundansen. Av de 10 mest abundanta släktena saknades dock 3 från listan, *Halomonhystera*, *Desmolaimus*, *Cyatholaimus*, och i 4 av 198 prover där nematoder förekom så saknades släkten från listan helt.

För att testa hur väl känslighetsvärden baserat på litteraturen skulle stämma överens med ekologiska status baserat på Makrofauna-BQI så räknades en känslighetsfaktor ut baserat listan. Då värdena gick från minus 10 (-10) mest känsligt till plus 27 (27), mest tolerant, så behövde värdena skalas om för uträkningen. Storleksordningen av värdena omvändes och gjordes till en positiv skala. Alla värden subtraherades med 27 och sedan med det önskade minimum värdet 1 för att få värden mellan -38 och -1. Absolutbeloppet av dessa värden togs sedan för att få en skala mellan 1, mest tolerant, och 38, mest känslig.



Dessa värden skulle kunna genomgå samma process av standardisering som är beskrivet ovan för att göra att de kan användas med BQI tröskelvärden. Men då de troligtvis överskattar värdena för arter som benämns oftare i litteraturen, saknar värden för abundanta nematod-släkten i Östersjön samt är svåra att uppdatera så presenteras de här som ett test av potentialen för expertbedömning av känslighetsvärden i framtida nematod-övervakningsprogram.

### 5.2.3 Andra index

Andra index som har föreslagits för nematoder inom övervakning och bedömning av ekologisk status utforskades även. Dessa var Shannon-Wieners index och *Maturity Index* (Bongers m.fl., 1991), för vilka Moreno m.fl. (2011) föreslagit statusklassgränser inom vattendirektivet. *Nematode-Copepode ratio* (Raffaelli och Mason, 1981), förhållandet mellan nematoder och copepoder (hoppkräftor), räknades också ut, men har för närvarande inga föreslagna klassgränser i litteraturen.

#### **Statusklassning med Shannon-Wieners och *Maturity Index***

Statusklassning av habitat med *Maturity Index* (Bongers, 1990) och Shannon-Wieners index baserat på nematod-samhället har testats med framgång i medelhavet (Moreno m.fl., 2011). Moreno m.fl. (2011) förslog klassgränser för *Maturity Index* respektive Shannon-Wieners-index för klassning enligt vattendirektivet. Shannon-Wieners-index för vår data jämfördes mot dessa gränser. *Maturity Index* uträknades också med en sammanföra en lista på *colonizer-persister* värden för de nematod-släkten som förekom i vår data. Värdena togs från de ursprungliga artiklarna om *Maturity Index* (Bongers, 1990; Bongers m.fl., 1991), övriga publicerade artiklar som använt *colonizer-persister* värden (Holterman m.fl., 2011; Broman m.fl., 2019) samt värden från websidan Nemaplex (Nemaplex, 2023). Genom detta kunde 100 av 121 släkten tilldelas ett *colonizer-persister* värde, dessa utgjorde i snitt 99,5 % av den relativa abundansen. *Maturity Index* uträknades enligt (Bongers, 1990).

#### ***Nematode-Copepod ratio***

*Nematode-Copepod ratio*, förhållandet mellan nematoder (fylum *Nematoda*) och de frilevande copepoderna (ordning *Harpacticoida*) (Raffaelli och Mason, 1981), räknades ut genom att totala antalet sekvensläsningar för dessa två taxon i varje prov separerades och antalet sekvensläsningar bestämt till fylum *Nematoda* delades med antalet sekvensläsningar bestämt till ordning *Harpacticoida*. Detta skulle Dock kunna underskatta mängden frilevande copepoder om samtliga av dessa inte hade bestämningen till *Harpacticoida* i sin taxonomi. De finns för närvarande inga statusklassgränser föreslagna för *Nematode-Copepod ratio* inom vattendirektivet eller havsmiljödirektivet.

## 5.2.4 Statistik

Samtlig statistik gjordes i R miljö, visualisering gjordes med hjälp av R paketet ggplot2 (Wickham m.fl., 2023).

Då korrelationer testades för flera olika variabler mot Makrofauna-BQI och känslighetsvärden så användes Spearmans rangkorrelation för samtliga för att öka jämförbarheten mellan olika korrelationer. För de komponenter av Nematod-BQI som har utvecklats just för att ha ett samband med Makrofauna-BQI så rapporteras inte p värden för korrelationerna. Detta då vi har haft syftet att få denna korrelation, och ett p värde för hypotestest ej skulle vara ett korrekt mått. Rho värden för dessa korrelationer där p värde inte rapporteras ska snarare ses som beskrivande värden. För övriga korrelationer har p värde rapporterats. Spearmans rangkorrelation gjordes med samtliga 200 prov, inklusive de som saknade levande makrofauna och de som saknade nematoder.

Ett mått på osäkerhet räknades ut för känslighetsfaktorerna respektive indexen med de tre känslighetsvärdena. Detta mått baserar sig på formler i Leonardsson och Blomqvist, (2014) för att räkna ut osäkerhet för medelvärdet av samtliga kluster i en havsbassäng över fler år, men då endast 1 replikat fanns per provtagningstillfälle, så räknades osäkerheten utan replikat osäkerheten. Detta räknades även för makrofaunavärdena, och gjordes där med medelvärde i de fall de fanns replikat från stationer, för att uträkningen skulle vara jämförbar med uträkningen för Nematod-BQI värdena.

För att få ett jämförande mått på hur mycket de olika Nematod-BQI värdena skiljde sig från Makrofauna-BQI oavsett om värdet var lägre eller högre så räknades den procentuella skillnaden ut. Detta räknades som den absoluta skillnaden mellan ett Nematod-BQI värde och ett Makrofauna-BQI värde på stationsnivå, delat med medelvärdet mellan de två värdena.

## 5.3 Resultat

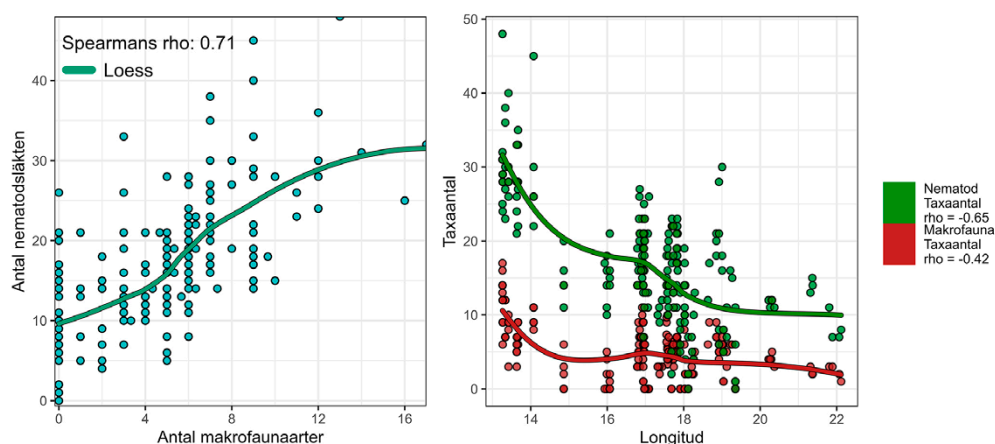
### 5.3.1 Mångfald och jämförelse mellan artantalsfaktorn och släktesfaktorn

Medelvärdet av taxaantal var 17 för nematoder och 5 för makrofauna (samtliga provtagningstillfällen, se även Tabell 3). Medelvärdet av Shannon-Wieners index var 1,9 för nematoder, och 1,0 för makrofauna (provtagningstillfällen där levande makrofauna hittats). Skillnaden i Shannon-Wiener index berodde främst på skillnaden i taxaantal då nematoder och makrofauna hade likande medelvärde i Pielus jämnhet, jämnhetskomponenten av Shannon-Wiener index. Medelvärdet av Pielus jämnhet var 0,7 för nematoder, och 0,6 för makrofauna (provtagningstillfällen där levande makrofauna hittats).

Nematod och makrofauna-mångfald korrelerade väl (Taxaantal:  $\rho = 0,71$ ,  $p > 0,001$  se Figur 12. Shannon-Wieners index:  $\rho = 0,60$ ,  $p > 0,001$ ) och nematod-mångfald korrelerade även väl med Makrofauna-BQI (Taxaantal:  $\rho = 0,48$ ,  $p > 0,001$ , Shannon-Wieners index:  $\rho = 0,45$ ,  $p > 0,001$ ).

**Tabell 3. Medelvärde och standardavvikelse för taxaantal (artrikedom för makrofauna och släktesantal för nematoder) samt Shannon-Wiener index, och Pielus jämnhet. Värdena är uppdelat i samtliga provtillfällen, provtillfällen där ingen levande makrofauna hittades samt provtillfällen där levande makrofauna hittades för taxaantal. För Shannon-Wiener index, och Pielus jämnhet anges värdena för provtillfällen där levande makrofauna hittades.**

	Taxaantal Samtliga prov	Taxaantal Utan levande makrofauna	Taxaantal Med levande makrofauna	Shannon-Wieners index Med levande makrofauna	Pielous Jämnhet Med levande makrofauna
Nematoder	17 ± 8 (0–48)	10 ± 6 (0–26)	19 ± 8 (4–48)	1.9 ± 0.5	0.7 ± 0.1
Makrofauna	5 ± 3 (0–17)	0	6 ± 3 (1–17)	1 ± 0.5	0.6 ± 0.2



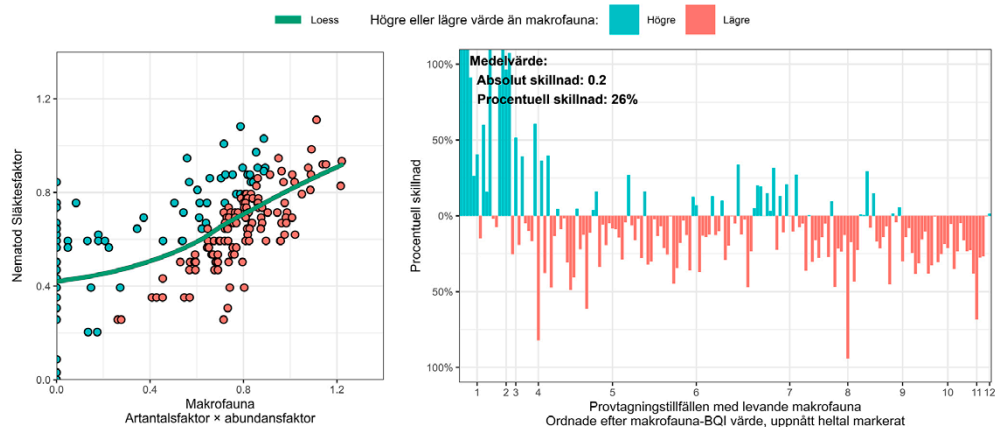
Figur 12. Förhållandet mellan antal nematod släkten och antalet makrofauna-arter till vänster. Relationen mellan longitud och Antal nematod-släkten samt antal makrofauna-arter i Östersjön till höger, gröna punkter och trendlinje representerar antal nematod-släkten och röda punkter respektive trendlinje representerar antal makrofauna-arter.

Dock kan korrelationerna mellan taxaantal delvis bero på att dessa korrelerade negativt med longitud för både makrofauna och nematoder (Makrofauna:  $\rho = -0,65$ ,  $p > 0,001$ . Nematoder:  $\rho = -0,42$ ,  $p > 0,001$ ). För att testa om meiofauna i allmänhet också hade samma förhållande med longitud så gjordes korrelationer mellan antalet meiofauna-släkten totalt i varje prov samt antal sekvensläsningar för nematoder och för meiofauna total. Nematod-sekvensläsningar korrelerade negativt med longitud ( $\rho = -0,50$ ,  $p > 0,001$ ) medan totala antalet meiofauna-sekvensläsningar och meiofauna släktesantal inte gjorde det (Meiofauna-sekvensläsningar:  $\rho = 0,13$ ,  $p = 0,06$ . Meiofauna-släktesantal:  $\rho = -0,05$ ,  $p = 0,49$ ). Detta tyder på att antalet nematod-släkten likt antalet makrofauna arter är högre i de sydligaste delarna av Östersjön. Dock har resultat från vårt projekt visat att nematod-släkten i södra Östersjön är bättre representerade i referensdatabaserna än de i norra, samt att nematoder har sämre representation än andra meiofauna-grupper (se Figur 2 i Arbetspaket 1, samt Broman m.fl. (2019)).

### Släktesfaktorn i Nematod-BQI

För prov med levande makrofauna hade släktesfaktorn av Nematod-BQI medelvärdet  $0,67 \pm 0,18$ , medan makrofauna artantals och abundansfaktorn räknat tillsammans hade medelvärde  $0,73 \pm 0,23$ . I prov utan levande makrofauna hade släktesfaktorn medelvärdet  $0,41 \pm 0,24$  och för samtliga  $0,63 \pm 0,21$ . Dessa delar av respektive index

korrelerade väl med varandra ( $\rho = 0,71$ ) och släktesfaktorn för Nematod-BQI var främst högre för stationerna med lägst Makrofauna-BQI, se Figur 13. Släktesfaktorn korrelerade även starkt negativt med longitud ( $\rho = -0,65$ ,  $p > 0,001$ ).



Figur 13. Släktesantalsfaktorn av Nematod-BQI mot artantalsfaktorn och abundans faktorn i makrofauna BQI. Till vänster är förhållandet mellan de två visualiserat, och till höger ses procentuell skillnad mellan värdena längs gradienten av Makrofauna-BQI (hela indexet) från vänster, lägst BQI, till höger, högst BQI. Procentuell skillnad har räknats som den absoluta skillnaden mellan ett Nematod-BQI värde och ett Makrofauna-BQI värde på stationsnivå, delat med medelvärdet mellan de två värdena.

### 5.3.2 Nematod-BQI, känslighetsfaktorn och känslighetsvärden

De tre metoder för uträkning av känslighetsvärden vars resultat presenteras här är  $S_{0,05}$ , baserat på antal nematod-släkten,  $DO_{0,05}$  baserat på syremättnad och  $BQI-Sens_{0,33}$ , som baseras på stationsvärdena för Makrofauna-BQI. Se Tabell 4 För beskrivande statistik för känslighetsfaktorn och hela Nematod-BQI indexet uträknat med dessa.

Tabell 4. Medelvärde och standardavvikelse för de uträknade känslighetsfaktorerna och på dem baserade fullständiga index, samt samma värden för makrofauna. Värdena är uppdelat i samtliga provtillfällen, provtillfällen där ingen levande makrofauna hittades samt provtillfällen där levande makrofauna hittades. Lista på känslighetsvärden för de 41 släktena finns i Bilaga 5. Osäkerheten räknades ut baserat på formell F i Leonardsson och Blomqvist (2014), utan replikat osäkerheten.

	Medelvärde Samtliga prov	Medelvärde Utan levande makrofauna	Medelvärde Med levande makrofauna	Osäkerhet i medelvärde för samtliga prov	Medelvärde procentuell skillnad mot makrofauna
<b>Känslighetsfaktor</b>					
BQI-Sens <sub>0,33</sub>	7,9 ± 2,6	4,6 ± 2,9	8,6 ± 1,8	0,73	28 %
DO <sub>0,05</sub>	7,7 ± 4,5	2,4 ± 2,4	8,8 ± 4,1	1,39	37 %
S <sub>0,05</sub>	7,8 ± 3,1	5,2 ± 3,0	8,3 ± 2,8	0,86	37 %
Makrofauna	7,3 ± 4,3	0	8,9 ± 3,0	1,39	-
<b>Fullständigt Index</b>					
BQI-Sens <sub>0,33</sub>	5,2 ± 2,4	2,1 ± 1,8	5,9 ± 2,0	0,66	35 %
DO <sub>0,05</sub>	5,2 ± 3,6	1,1 ± 1,3	6,1 ± 3,4	0,98	45 %
S <sub>0,05</sub>	5,4 ± 3,2	2,6 ± 2,1	6,0 ± 3,1	0,9	47 %
Makrofauna	5,2 ± 3,4	0	6,3 ± 2,6	1,0	-

### Nematod-BQI med känslighetsvärden baserade på släktesantal – $S_{0,05}$

$S_{0,05}$  känslighetsvärdena hade ett spann mellan 1 och 26, och känslighetsfaktorn uträknad baserat på dem hade medelvärden som var lika de för makrofauna (se Tabell 4). Det fanns ingen korrelation mellan likgiltighetsgrad och känslighetsvärde ( $p = 0,9$ ,  $\rho = -0,025$ ). Dock korrelerade känslighetsvärdet starkt negativt med andelen prov släktet förekom i, samt den genomsnittliga relativa abundansen för släktet (Förekomst:  $\rho = -0,89$ ,  $p < 0,001$ . Genomsnittlig relativ abundans:  $\rho = -0,75$ ,  $p < 0,001$ ). Släkten som förkom i fler prover och generellt i högre abundans tenderade alltså att få ett lägre känslighetsvärde räknat med  $S_{0,05}$  metoden.

Känslighetsfaktorn uträknad med dessa känslighetsvärden korrelerar delvis med känslighetsfaktorn för makrofauna ( $\rho = 0,20$ ). Dock visade grafer av värdena plottade mot varandra att  $S_{0,05}$  känslighetsfaktorn följer makrofauna BQI väl upp tills ca värde 10 av makrofauna känslighetsfaktorn, varefter värdena gick ifrån varandra (se Figur 19 i Bilaga 6). En anledning till att detta är att flera av dessa höga värden för känslighetsfaktorn är från stationer där enskilda individer med höga känslighetsvärden förekommer i områden som annars skulle helt avsaknad makrofauna. De var tydligt från en inspektion över makrofauna-data för dessa stationer att så var fallet för vissa av dem. Artantalsfaktorn och särskilt abundansfaktorn i Makrofauna-BQI korrigerar för detta, och de fullständiga indexen korrelerade bättre med varandra ( $\rho = 0,41$ ). Det fullständiga indexet räknat med  $S_{0,05}$  hade även ett lågt medelvärde för prov utan ingen levande makrofauna (se Tabell 4). Nematod-BQI värdena räknat med  $S_{0,05}$  eller  $OD_{0,05}$  skilde sig mer från Makrofauna-BQI i genomsnitt än de räknade med BQI-Sens<sub>0,33</sub>, se Figur 15 samt figurer i Bilaga 5 och 6, Figur 19 och Figur 20) och detta syntes i en högre absolut och procentuell skillnad mot Makrofauna-BQI samt en högre standardavvikelse, Tabell 4.

Nematod känslighetsfaktorn räknat med  $S_{0,05}$  hade även en stark negativ korrelation med longitud ( $\rho = -0,67$ ,  $p > 0,001$ ), vilket beror på att antalet nematodsläkten var högre i de södra delarna av Östersjön (som nämnt tidigare kan denna mångfaldsgradient delvis vara ett resultat av sämre täckning för nematodsläkten i norra delarna av Östersjön i referensdatabaserna). Detta är ännu en förklaring till de låga värden i känslighetsfaktorn vid provtillfällena med hög makrofauna-känslighetsfaktor. Stationer i de nordligaste delarna av Östersjön där makrofaunasamhället främst utgörs av *Monoporeia affinis*, med känslighetsvärde 15, får ett högt värde på känslighetsfaktorn men som dras ner av artantalsfaktorn. Nematod-BQI räknad med  $S_{0,05}$  (hela indexet sammanräknat med släktesfaktorn) hade också en stark negativ korrelation med longitud ( $\rho = -0,70$ ,  $p > 0,001$ ). Det kunde även visas i det låga värde Nematod-BQI räknat med  $S_{0,05}$  hade för vattenförekomsten ”Del av S n Kvarkens utsjövatten”, som ligger i Bottniska viken, se Figur 22 i Bilaga 6. Detta var lägre än både Makrofauna-BQI och Nematod-BQI uträknade med de övriga två känslighetsvärdena,  $DO_{0,05}$  och BQI-Sens<sub>0,33</sub>.

Fördelar med  $S_{0,05}$  känslighetsvärdena är att de är uträknade med samma metod som använts för makrofauna, samt att metoden endast kräver data från nematod-samhället. Att Nematod-BQI uträknat med  $S_{0,05}$  visade en samstämmighet med Makrofauna-BQI visar på potentialen i ett mer självständigt Nematod-BQI. Det är troligtvis den metod, av de presenterade, som har störst potential på längre sikt, speciellt då större mängder data från meiofauna-samhället i Östersjön finns tillgänglig. Baserat på de data som används i projektet så bedöms dock Nematod-BQI med  $S_{0,05}$  ha högre osäkerhet än Nematod-BQI uträknade med känslighetsvärden baserade på Makrofauna-BQI, BQI-Sens<sub>0,33</sub>. Den starka relationen som sågs mellan

$S_{0,05}$  värden och longitud är också problematiskt för dess användning. Andra känslighetsvärden, som de baserade på Makrofauna-BQI, BQI-Sens<sub>0,33</sub>, bedöms därav vara mer lämpliga för ett nematod-övervakningsprogram som skulle initieras idag. Men användning av  $S_{0,05}$  baserat på data från fler prover, och möjligtvis med inkluderingen av flera eller alla meiofauna-grupper, bör utvärderas i framtiden.

### **Nematod-BQI med känslighetsvärden baserade på syremättnad – $DO_{0,05}$**

Nematod känslighetsvärden uträknade baserat på släktens förhållande till syremättnaden hade ett spann mellan 1 och 32. De visade ett tydligt lägre värde för stationer utan makrofauna (2,4 för känslighetsfaktorn 1,1 för hela indexet av Nematod-BQI) och god korrelation med Makrofauna-BQI respektive känslighetsfaktor ( $\rho = 0,51$  för känslighetsfaktorn,  $\rho = 0,61$  för hela indexet, samtliga prov). Nematod-känslighetsfaktorn uträknat med  $DO_{0,05}$  korrelerade inte signifikant med longitud ( $\rho = -0,11$ ,  $p = 0,11$ ). Men vid uträkning av hela Nematod-BQI indexet så fanns en negativ korrelation med longitud ( $\rho = -0,34$ ,  $p > 0,001$ ) vilket beror på att släktesfaktorn i Nematod-BQI negativt korrelerar med longitud. Som nämnt var spridningen samt skillnaden mot Makrofauna-BQI större för  $DO_{0,05}$  och  $S_{0,05}$  än för BQI-Sens<sub>0,33</sub> (se Figur 24 och Figur 25 i Bilaga 7).

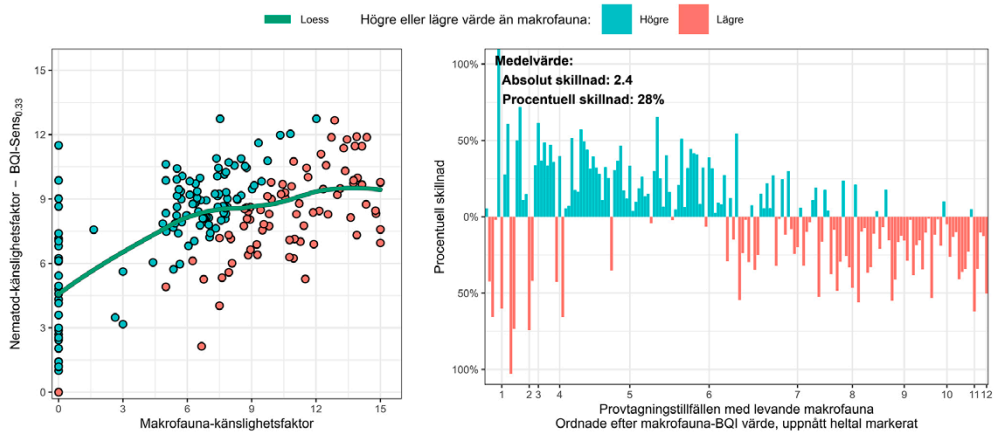
$DO_{0,05}$  känslighetsvärdena för släkten hade även en starkt negativa korrelationer med likgiltighetsgraden, samt också negativa korrelationer med andel förekomst i prov och genomsnittlig relativ abundans (Likgiltighetsgrad:  $\rho = -0,92$ ,  $p > 0,001$ . Förekomst:  $\rho = -0,46$ ,  $p = 0,002$ . Genomsnittlig relativ abundans:  $\rho = 0,52$ ,  $p > 0,001$ ). Släkten som förekom under ett större spann av syremättnad, i fler prover och generellt i högre abundans tenderade alltså att få ett lägre känslighetsvärde räknat med  $DO_{0,05}$  metoden.

Syrehalt i bottenvatten ett inexact mått på syreförhållanden i de bentiska habitaterna. De lägsta värdena (under ca 2 mg/l) bör tyda på syrebrist, men för högre värden lär arternas fördelning främst bero på djupförekomst.  $DO_{0,05}$  känslighetsvärdena är därav sämre lämpade för generell användning än BQI-Sens<sub>0,33</sub> eller  $S_{0,05}$ . De skulle dock kunna användas för att upptäcka indikatorarter för syrebrist, och potentiellt kan denna generalisering av  $S_{0,05}$  metoden användas för övervakning av andra specifika störningar, så som förorening. Relationen mellan känslighetsvärden och likgiltighetsgrad tyder också på att ett högre antal prover och en bättre fördelning av syremättnadsvärden i dessa har potential att förbättra uträkningen.

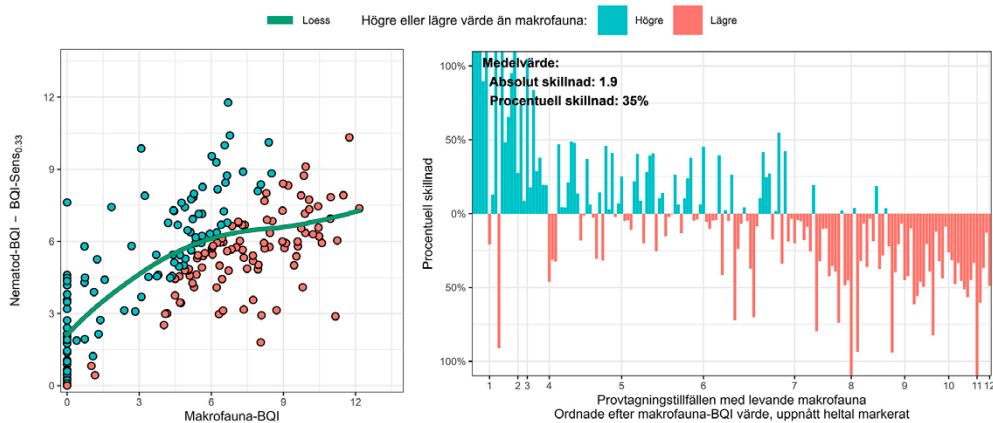
### **Nematod-BQI med känslighetsvärden baserade på BQI – BQI-Sens<sub>0,33</sub>**

BQI-Sens<sub>0,33</sub> känslighetsvärdena för nematod-släkten hade ett spann mellan 1 och 16. Dessa värden räknades ut baserat på släktes förhållande till Makrofauna-BQI på stationerna de förekom. Känslighetsfaktorn och det fullständiga indexet av Nematod-BQI hade bäst korrelation med Makrofauna-BQI av de 3 alternativen till känslighetsvärden ( $\rho = 0,51$  för känslighetsfaktorn,  $\rho = 0,63$  för hela indexet). Det fullständiga indexet hade lägre värde för prov utan makrofauna, Se Tabell 4. De hade också lägst medelvärde i absolut och procentuell skillnad mot Makrofauna-BQI, se Figur 15, och jämförbara figurer för  $DO_{0,05}$  och  $S_{0,05}$  känslighetsvärden i Bilaga 5 och Bilaga 6. Likt för  $DO_{0,05}$  korrelerade känslighetsfaktorn för BQI-Sens<sub>0,33</sub> inte negativt med longitud men det fullständiga indexet gjorde det som på grund av släktesantalsfaktorn (Känslighetsfaktorn,  $\rho = -0,05$ ,  $p = 0,52$ . Hela index,  $\rho = -0,45$ ,  $p > 0,001$ ).

De fanns en ickesignifikant negativ korrelation med likgiltighetsgrad och känslighetsvärde ( $p = 0,1$ ,  $\rho = -0,23$ ). Negativa korrelationer med förekomst och genomsnittliga relativ abundans fanns även och var signifikanta (Förekomst:  $\rho = -0,34$ ,  $p = 0,03$ . Genomsnittlig relativ abundans:  $\rho = -0,40$ ,  $p = 0,01$ ). Även för BQI-Sens<sub>0,33</sub> känslighetsvärdena så tenderade alltså släkten som förekom i fler prover och generellt i högre abundans att få ett lägre känslighetsvärde. Det fanns också en tendens att de som förekom under ett större spann av stations Makrofauna-BQI värden fick ett lägre känslighetsvärde.



Figur 14. Makrofauna-känslighetfaktor mot nematod-känslighetsfaktor när BQI-Sens<sub>0,33</sub> känslighetsvärdena användes. Till vänster är förhållandet mellan de två visualiserat, och till höger ses procentuell skillnad mellan värdena längs gradienten av Makrofauna-BQI (hela indexet) från vänster, lägst BQI, till höger, högst BQI. Procentuell skillnad har räknats som den absoluta skillnaden mellan ett Nematod-BQI värde och ett Makrofauna-BQI värde på stationsnivå, delat med medelvärdet mellan de två värdena.

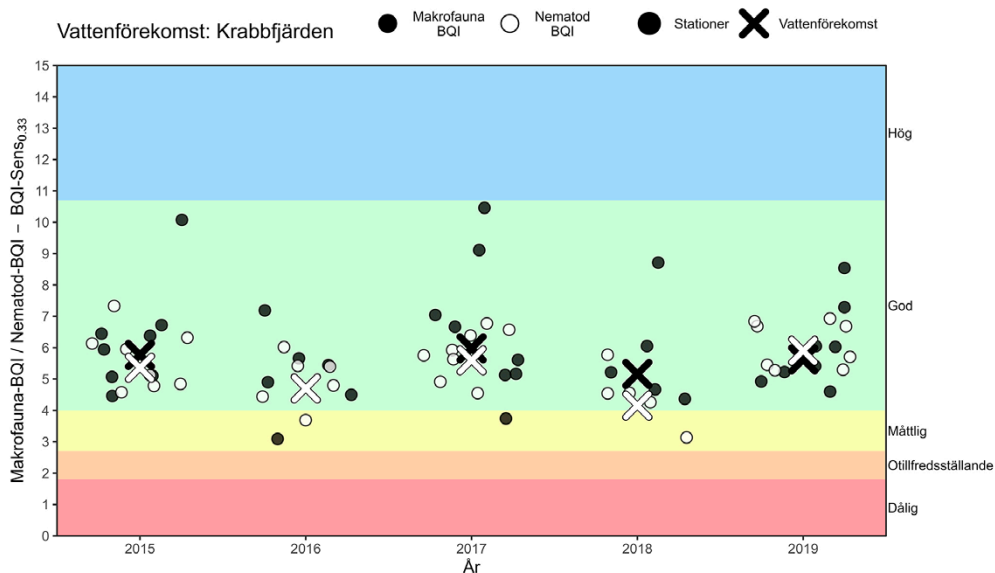


Figur 15. Makrofauna BQI mot Nematod-BQI när BQI-Sens<sub>0,33</sub> känslighetsvärdena användes. Till vänster är förhållandet mellan de två visualiserat, och till höger ses procentuell skillnad mellan värdena längs gradienten av Makrofauna-BQI (hela indexet) från vänster, lägst BQI, till höger, högst BQI. Procentuell skillnad har räknats som den absoluta skillnaden mellan ett Nematod-BQI värde och ett Makrofauna-BQI värde på stationsnivå, delat med medelvärdet mellan de två värdena.

Nematod-BQI uträknat med känslighetsvärdena BQI-Sens<sub>0,33</sub> hade lägst absolut och procentuell skillnad mot Makrofauna-BQI, se Figur 14 och Figur 15. Det är också alternativet med lägst osäkerhet, se Tabell 4, och känslighetsfaktorn i Nematod-BQI uträknat med BQI-Sens<sub>0,33</sub> hade ingen relation till longitud i Östersjön. Den höga samstämmigheten med Makrofauna-BQI gör att samma tröskelvärden för att klassificera ekologisk status bör kunna användas. Efter en initial period av nematod-övervakning, då data insamlats från större antal prover, kan mer precisa och självständiga tröskelvärden för Nematod-BQI sättas. I och med datan som skulle samlas in vid nematod-övervakning skulle mer självständiga känslighetsvärden baserade på nematod och meiofauna-samhället kunna räknas ut. BQI-Sens<sub>0,33</sub>-känslighetsvärdena, som har uträknats baserat på Makrofauna-BQI, möjliggör att Nematod-BQI kan bidra med informativa och tillförlitliga statusklassificeringar medan mängden data över östersjöns meiofauna-samhälle byggs upp. Därav rekommenderas Nematod-BQI med BQI-Sens<sub>0,33</sub> för ett nematod-miljöövervakningsprogram som skulle inledas idag.

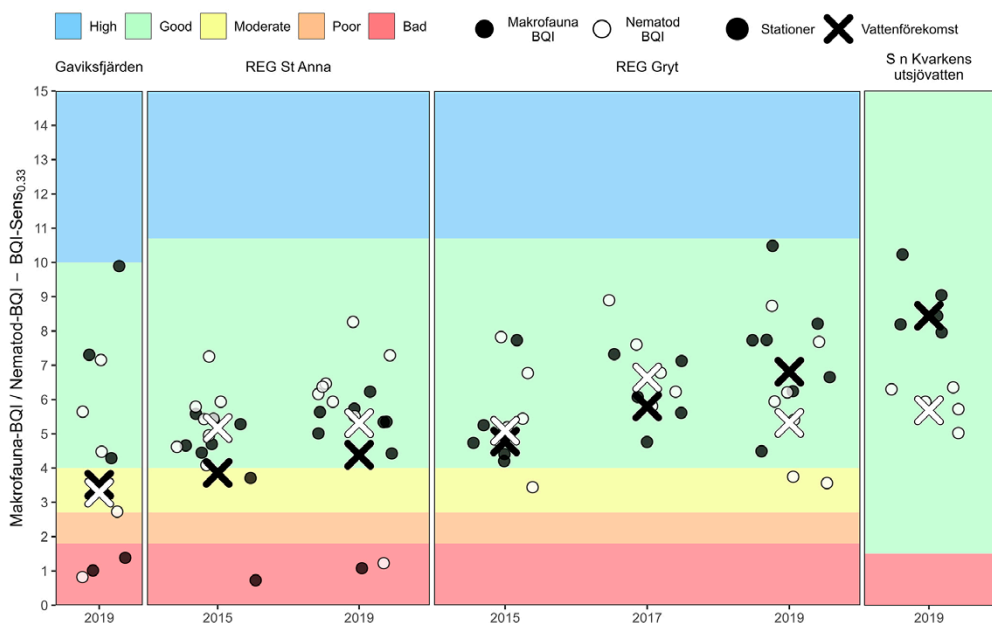
### 5.3.3 Statusklassning med Nematod-BQI – BQI-Sens<sub>0,33</sub>

Nematod-BQI – BQI-Sens<sub>0,33</sub> klassade 11 av 12 vattenförekomster som kunde klassas enligt bedömningsgrunden likadant som Makrofauna-BQI, se Figur 16 och Figur 17. Potentialen för statusklassning i områden utan makrofauna kan ses i Figur 18, dock bör noteras att de flesta av dessa stationer är för djupa för att inkluderas i bedömningsgrunden.

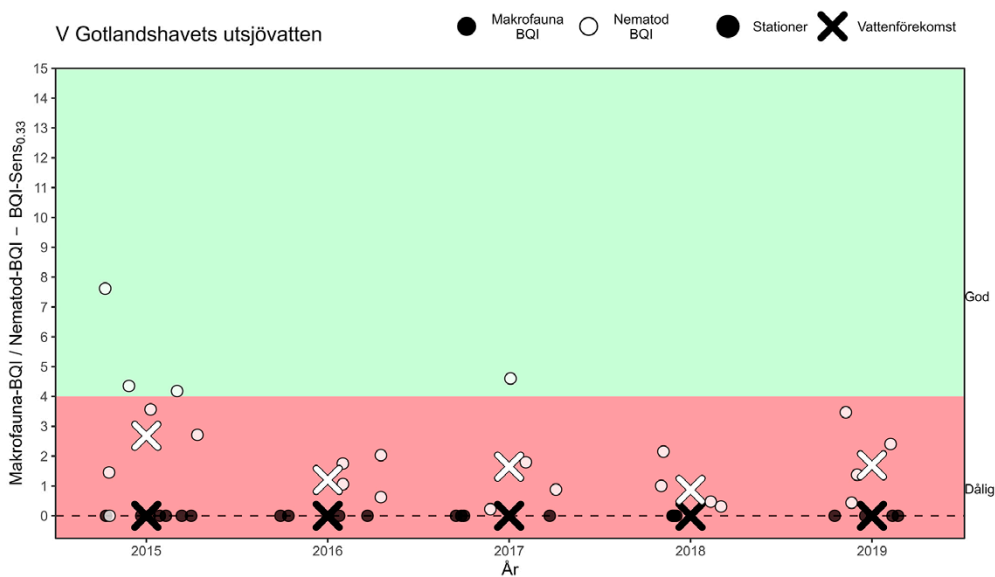


Figur 16. År för vattenförekomsten Krabbfjärden. Alla bedömda enligt bedömningsgrunden. Grafen visar stationsvärden och medelvärden (20:e percentilen) för ytvattenförekomsterna. BQI-Sens<sub>0,33</sub> användes.





Figur 17. År inom vattenförekomster. Alla bedömda enligt bedömningsgrunden. Grafen visar Stationsvägen och medelvärden (20:e percentilen) för ytvattenförekomsterna. BQI-Sens0.33 användes.



Figur 18. År inom Del av V Gotlandshavets utsjövattnen. Det bör noteras att de flesta av dessa utgör dock inte del av nuvarande stationskluster samt ingår inte i bedömningsgrunderna. Grafen visar stationsväden och medelvärden (20:e percentilen) för ytvattenförekomsten BQI-Sens<sub>0.33</sub>.

### 5.3.4 Övriga index

**Tabell 5** Medelvärde och standardavvikelse för övriga index. Värdena är uppdelat i samtliga provtillfällen, provtillfällen där ingen levande makrofauna hittades samt provtillfällen där levande makrofauna hittades. För *Nematode-Copepode ratio* indikerar högre värden och avsaknaden av copepoder på sämre ekologisk status. Samtliga index visade alltså på sämre ekologisk status för stationer där levande makrofauna saknades.

	Medelvärde Samtliga prov	Medelvärde Utan levande makrofauna	Medelvärde Med levande makrofauna
<i>Maturity Index</i>	2,4 ± 0,48	2,0 ± 0,74	2,5 ± 0,35
Ridall och Ingels (2021) värden, omräknad.	20,4 ± 6,17	14,0 8,01	21,6 ± 4,94
<i>Nematode-Copepode ratio</i>	245 ± 829* * 21 % av proven saknade copepoder	515 ± 795* * 64 % av proven saknade copepoder	223 ± 831* * 12 % av proven saknade copepoder
Shannon-Wieners index	1,80 ± 0,60	1,1 ± 0,65	1,9 ± 0,50

#### Shannon-Wieners index

Shannon-Wieners index för nematoder korrelerade väl med Makrofauna-BQI, och hade också lägre värden för stationer utan makrofauna. Jämfört med tröskelvärdena föreslagna i Moreno m.fl. (2011) klassades dock samtliga vattenförekomster under god status, se Tabell 5.

#### *Maturity Index*

*Maturity Index* korrelerade med Makrofauna-BQI ( $\rho = 0,25$ ,  $p > 0,001$ ) och visade lägre värden för provtagningstillfällen utan levande makrofauna. *Maturity Index* korrelerade även negativt med longitud ( $\rho = -0,28$ ,  $p > 0,001$ ). Jämfört med tröskelvärdena föreslagna i Moreno m.fl. (2011) klassades 11 % av vattenförekomster till hög och 18 % till god status. Majoriteten, ca 70 %, klassades under god status, se Tabell 6.

**Tabell 6.** Statusklassningar baserat på *Maturity Index* och Shannon-Wieners index.

	Hög	God	Måttlig	Otillfredsställande	Dålig
<i>Maturity Index</i>	11 %	18 %	30 %	20 %	21 %
Shannon-Wieners index	0 %	0 %	7 %	80 %	13 %

Dessa låga klassningar av ekologisk status visar att de tröskelvärden för *Maturity Index* och Shannon-Wieners index som föreslås i Moreno m.fl. (2011) ej kan appliceras i Östersjön. Nya tröskelvärden måste föreslås för dessa index i Östersjön om de ska användas.

#### Nematode-Copepode ratio

*Nematode-Copepod ratio*, för vilket högre värden innebär sämre ekologisk status, korrelerade negativt med macrofauna-BQI ( $\rho = -0,33$ ,  $p > 0,001$ ) och hade medelvärdet på 244 i prov där både nematoder och copepoder förekom. *Nematode-Copepod ratio* korrelerade även negativt med longitud ( $\rho = -0,29$ ,  $p > 0,001$ ). I 41 av de prov där nematoder förekom dock inte sekvensläsningar frilevande copepoder (ordning Harpacticoida), detta förekommer dock även när morfologiska metoder används (Raffaelli och Mason, 1981; Amjad och Gray, 1983). Prov utan copepoder indikerar dålig ekologisk status.

*Nematode-Copepod ratio* är ett av de tidigast föreslagna indexen för nematod-övervakning och har främst använts för övervakning av föroreningar. Indexet visade sig kunna särskilja stationer där makrofauna saknades, genom högre värden och att frilevande copepoder i lång högre grad saknades från dessa. Användning av *Nematode-Copepod ratio* har varit omdiskuterad sedan det förslogs (se till exempel, Coull m.fl. (1981) och Warwick, (1981), men indexet har nyligen visats kunna användas framgångsrikt i Östersjön (Berezina och Petukhov, 2023). Då tröskelvärden saknas för *Nematode-Copepod ratio* skulle sådana behöva föreslås för Östersjön om indexet ska användas.

### Användning av värden baserat på expertbedömning

En känslighetsfaktor tillika index baserat på Ridall och Ingels (2021) värden korrelerade väl känslighetsfaktorn och makrofauna BQI. En korrelation fanns med denna känslighetsfaktor och Makrofauna-BQI ( $\rho = 0,37$ ,  $p > 0,001$ ) visar på nematoders användning som indikatorer för påverkan av miljön. Det visar att det finns ett samband mellan forskningen om nematoders känslighet och tolerans och nematodsläktens fördelning i Östersjön gentemot ekologisk status.

En implikation av dessa resultat är att känslighetsvärden för nematoder skulle kunna baseras på en expertbedömning utifrån litteraturen om ett nematod-övervakningsprogram skulle implementeras där tidigare provtagning och data inte finns tillgänglig.

## 5.4 Fortsatt arbete inom Arbetspaket 3

Ett första steg i att utvärdera de metoder som utvecklats i NEMOte BARCODing är validering av den framtagna formeln och uträknade känslighetsvärdena för Nematod-BQI med externa data. Vi vill testa om dessa kan användas för stationer och prov som inte använts för uträkningen och ändå ge jämförbara resultat. Det måste dock hittas en datamängd från stationer i Östersjön som innehåller data över både nematod och makrofauna-samhället. Om metoden visar goda resultat även för oberoende data så bör känslighetsvärdena räknas om med ett större antal prover, då antalet som användes i projektet bedöms vara lägre än vad som är optimalt.

En sak som är genomförbart i närtid är utforskningen av att generalisera metoden till hela meiofauna-samhället. Detta skulle kunna vara fördelaktigt om meiofauna mångfalden i allmänhet är mindre påverkad av salinitet, eller andra gradienter längs Östersjön, än nematoder. Detta indikeras av de korrelationer vi gjort med longitud, men bör utforskas vidare. Preliminära analyser som gjorts för hela meiofauna-samhället har tyder på att en generalisering av metoderna skulle fungera väl. Men överväganden bör också göras om alla meiofauna-grupper ska inkluderas, och resultat för olika fylum bör också utforskas för sig.

Kontinuerlig utvärdering av metoderna som presenterats i NEMOte BARCODing behövs och ett uttömmande arbete har inte rymts inom projektet. Vissa förberedelser för framtida arbete och analyser kommer dock att utforskas i den mån det är möjligt. Modellering av indexen för att mäta effekten av miljövariabler, så som djup och salinitet, bör även göras, Leonardsson m.fl. (2016) utgör ett exempel på metod för detta. Ett större antal prover skulle dock vara fördelaktigt för denna modellering. En mer rigorös bedömning av variansen och osäkerheten i Nematod-BQI bör även påbörjas. Då vi har prover från flera delar av Östersjön, stationskluster med olika

antal stationer och prov för olika antal år från stationer bör vissa slutsatser kunna dras genom jämförelsen av dessas varians.

Osäkerheten i just känslighetsvärden är också viktigt för miljöövervakningsindex (Chuseve och Daunys, 2017) och något som tagits hänsyn till i den stratifieringsmetod för uträkning av känslighetsvärden som presenterades i Leonardsson m.fl. (2015). Denna metod bör utforskas för Nematod-BQI känslighetsvärden i Östersjön för att förbättra precisionen och bedöma osäkerheten. Även här skulle ett större antal prover vara fördelaktigt, och en indelning av Östersjön i påverkade och icke-påverkade områden skulle behöva göras. Detta är komplext i Östersjön eftersom hela ekosystemet är påverkat av övergödning (Bonsdorff m.fl., 1991).

## 5.5 Diskussion

### Nematoder som indikatorer för ekologisk status

Nematoder har både på land och i sjö, flod och hav visat sig kunna effektivt användas som en indikator på miljöförändringar (Balsamo m.fl., 2012, Alves m.fl., 2013; Ridall och Ingels, 2021; Martinez m.fl., 2023). De frilevande nematoderna har använts för miljöövervakning i åtminstone 40 år (Ridall och Ingels, 2021) och metoder för bedömning av ekosystemhälsa från nematod-samhället har under denna tid också utvecklats. Några exempel på verktyg i nematod-övervakningens tidiga historia är användningen av specifika indikator taxa (Zullini och Peretti, 1986), förhållandet mellan nematod-klasser (Zullini, 1976), andelen omnivorer i samhället (Wasilewska, 1974) och generella diversitetsmönster (Lamshead m.fl., 1983). Forskningen om deras användning har fortsatt (Ridall och Ingels, 2021) och även ökat under de senaste åren (di Montanara m.fl., 2022). Våra resultat inom Arbetspaket 3 ger fog för nematodernas rykte att vara goda indikatororganismer.

Både det Nematod-BQI som utvecklades, och andra index som föreslagits för nematoder och utforskades inom projektet, *Maturity Index* (Bongers m.fl., 1991), Shannon-Wiener index och *Nematode-Copepod ratio* (Raffaelli och Mason, 1981), samt värden från sammanställning av litteratur över nematodkänslighet (Ridall och Ingels 2021) visade alla en samstämmighet med Makrofauna-BQI, som trots brister är ett bra mått på breda mönster i ekologisk status. Dessa index visade också förmåga att särskilja stationer där makrofauna saknades helt, och därav bedöms vara kraftigt påverkade, genom att de hade lägre värden för dessa stationer.

Dessa resultat visar inte bara på att nematoders potential som indikatorer på ekosystemhälsa, det visar också på streckkodningsmetoders praktiska potential för bedömning av ekosystemhälsa. Att streckkodningsdata kan användas i bentiska index har även i andra studier visats för nematoder (Schenk m.fl., 2020) och också för makrofauna (Aylagas m.fl., 2018). Bottenfaunasamhällets svar på miljöförändringar och störning har ett väl utarbetat teoretiskt ramverk i Pearson och Rosenberg (1978), och provtagning av bentiska miljöer är baserat på detta en väletablerad del av havsmiljöers övervakning (Heip, 1995). Våra resultat visar att detta välprövade miljöövervakningsarbete kan utvidgas till provtagning av nematoder och att streckkodningsmetoder är en passande metod för detta.

Verktyg för att klassificera ekologisk status, nematod-index, är dock nödvändiga i övervakning, och tröskelvärden för dessa behöver sättas. Våra resultat visar att de tröskelvärden som föreslagits av Moreno m.fl. (2011) för *Maturity Index* och Shannon Wiener-index i medelhavet ej var passande i Östersjön. Statusklassgränser kan

oftast ej vara densamma för olika miljöer (Leonardsson m.fl., 2009), men för nya tröskelvärden så är tillgång till stora mängder existerande data fördelaktigt (Rosenberg m.fl., 2004), vilket saknas för nematod-samhället. I Östersjön är sättandet av nya tröskelvärden också komplicerat av att goda referensområden saknas (Bonsdorff m.fl., 1991).

På grund av detta valde vi i NEMOte BARCODing att utveckla ett Nematod-BQI baserat på det existerande Makrofauna-BQI, med potential att använda existerande tröskelvärden. Samtidigt vi har också utforskat framtida möjligheter för detta Nematod-BQI att bli mer självständigt i sin utformning. Detta är i linje med föreslag för integrering av DNA-streckkodningsmetoder i miljöövervakning som presenteras i Pawlowski m.fl (2018). Pawlowski m.fl (2018) ritade en karta för denna process, och föreslår att streckkodningsdata bör integreras i länders nuvarande index och miljöövervakningsverktyg som ett första steg. Detta tillåter en jämförelse och harmonisering med traditionella metoder inom varje lands miljöövervakningsprogram, för att sedan kunna jämföra och optimera streckkodningsbaserade verktyg på internationell skala (Pawlowski m.fl., 2018).

### Statusklassningsverktyg, Nematod-BQI

Baserat på Makrofauna-BQI och de uträkningsmetoder som använts för makrofauna-känslighetsvärden (Rosenberg m.fl., 2004; Leonardsson m.fl., 2009, 2015) så har vi tagit fram en formel för ett Nematod-BQI, och känslighetsvärden för nematod-släkten som är abundanta i Östersjön. Nematod-känslighetsvärden uträknade empiriskt baserat på stationers Makrofauna-BQI, BQI-Sens<sub>0,33</sub>, rekommenderas för ett initialt nematodövervakningsprogram då Nematod-BQI bedömdes ha högst tillförlitligt med dessa värden. Artantalsfaktorn och abundansfaktorn i Makrofauna-BQI (Leonardsson m.fl., 2009) modifierades och använder istället antalet nematod-släkten. Släktesfaktorn är, likt abundansfaktorn i Makrofauna-BQI (Leonardsson m.fl., 2009), utformad för att Nematod-BQI ska kunna ge tillförlitliga statusklassningar av stationer som är kraftigt påverkade och har låg abundans, där status annars lätt kan överskattas. Nematod-BQI bestraffar stationer med väldigt lågt antal släkten, vilket gör indexet mer robust mot metod-fel som kontaminering och PCR-artefakter. Nematod-BQI visade god samstämmighet med Makrofauna-BQI och de två indexen klassade generellt vattenförekomster likadant med existerande tröskelvärden.

Statusen för de vattenförekomster som kunde klassas enligt bedömningsgrunden (HaV, 2020) var dock i de flesta fall god status, som täcker ett stort spann av BQI värden. Förmågan att särskilja av områden med god status från de med måttlig eller lägre är en viktig egenskap hos miljöövervakningsindex, då klassningar under god status har förvaltningsmässiga och juridiska konsekvenser (Josefson m.fl., 2009). Men det som bäst visar potentialen hos Nematod-BQI är att indexet kan användas i kraftigt påverkade stationer, mätt med avsaknaden av makrofauna, och lyckas klassificera dessa som stationer med låg ekologisk status. Förutom att detta ger fog för Nematod-BQI:s förmåga att spegla generella mönster i ekosystemhälsa så stödjer det också en av förhoppningarna som vi hade om ett Nematod-BQI. Att det kan användas för att bedöma skillnader i ekologisk status även för de djupare syrefattiga havsbottnarna i Östersjön där makrofauna saknas (Norkko m.fl., 2015). Och att Nematod-BQI därav kan användas för att snabbare upptäcka återhämtning i ekosystem hälsa i dessa habitat.

## Vad Nematod-BQI kan bidra med

Som diskuterat tidigare i rapporten så skulle det vara fördelaktigt att kunna ha en biologisk indikator på ekosystemhälsa i Östersjöns syrefattiga miljöer. Övergödning minskar förhoppningsvis i linje med Baltic Sea Action Plan (HELCOM, 2021), men det kommer också ta tid för de syrefria bottenarna att återhämta sig (Kuliński m.fl., 2022; Meier m.fl., 2022). Ett mått på försämring och återhämtning av ekosystemhälsa i kraftigt syrefattiga miljöer skulle förbättra utvärderingar av åtgärder och stärka den målbaserade förvaltningen relaterat till övergödning i Östersjön. Vårt resultat indikerar att Nematod-BQI har potential att möjliggöra detta, men hur väl detta fungerar i praktisk miljöövervakning återstår att se. Nematoder lever, är ekologiskt relevanta och varierar i samhällskomposition på dessa syrefattiga bottenar (Broman m.fl., 2020). Men ett ekosystems väg till återhämtning är också komplext, och de förändringar som sker i samhällsstrukturen vid återhämtning är inte en spegelbild av dess historiska tillstånd (Steckbauer m.fl., 2011; Ehrnsten m.fl., 2020). Fortsatt insamling av prover från dessa syrefria miljöer, och modellering av indexet mot mönster i syremättnad inom dessa, behövs för att säga till vilken grad Nematod-BQI kan bedöma skillnader påverkan från syrebrist i Östersjöns döda zoner.

Vid implementeringen av ett nematod-övervakningsprogram så föreslår vi därav att syrefattiga utsjöområden i Egentliga Östersjön (Kuliński m.fl., 2022) är ett av detta programs fokusområden. Vissa av de provtagna stationer som är syrefria, till exempel de som visas i Figur 18, är inte del av nuvarande nationella miljöövervakningsprogrammet, utan tidigare miljöövervakningsstationer men som fortfarande provtas i samband med miljöövervakningen. Det har bedömts vara ineffektivt att provta makrofauna i dessa djupare stationer i syfte att övervaka syrefria bottenar (Leonardsson och Blomqvist, 2014). Men den information som provtagning av nematoder från dessa stationer skulle bidra med kan vara en anledning att återuppta stationerna i miljöövervakningsprogram.

Fortsatt provtagning av nematoder i Östersjön är även det som bäst kommer kunna belysa Nematod-BQI:s potential i mer generellt hänseende. Kustområden bör självklart också inkluderas i ett nematod-övervakningsprogram. Nematod-BQI kan tillföra information om ekosystemets hälsa även i mindre påverkade områden och data från dessa är nödvändigt för fortsatt utvecklingen av statusklassningsverktygen. Nematod-BQI har också speciell potential att förbättra miljöövervakning av Bottenvikens kustområden, där det naturligt låga antalet makrofauna-arter (Elmgren m.fl., 1984) gör att Makrofauna-BQI inte är tillförlitligt (Jenny Caruso m.fl., 2013). Antalet nematod-släkter hade likt antalet makrofauna-arter i Östersjön en negativ relation till longituden, och det är möjligt att nematoder har liknande problem som makrofauna gällande statusbedömning av områden med låg salinitet (Zettler m.fl., 2007; Dauvin och Ruellet, 2009). Som nämnt innan kan detta dock delvis bero på brister i referensdatabaserna (Broman m.fl., 2019) och den högre mångfalden i absolut antal taxa bör fortfarande leda till mer robust statusbedömning. En intressant resultat från NEMOte BARCODing var också att meiofauna i allmänhet inte delade denna relation mellan longitud och mångfald i Östersjön, och utvidgningen av Nematod-BQI till ett bredare meiofauna-BQI bör därav övervägas.

## Framtida utveckling av Nematod-BQI

Inkludering av all meiofauna, data om vilka ändå samlas in i samband med provtagning av nematoder, skulle kunna innebära en förbättring i och med den större mångfalden. Om det bekräftas att meiofauna i allmänhet ej visar några kraftiga

mönster i antal släkten längs salthaltsgradienten i Östersjön skulle övervakning av dessa potentiellt kunna ge mer generaliserbara indexvärden för hela Östersjön. Det behöver dock utforskas vidare teoretiskt och praktiskt. Meiofauna i allmänhet är mindre utforskat som indikatorer på ekosystemhälsa än nematoder (Balsamo m.fl., 2012). Som nämns i metodbeskrivningen skulle släktesantalsfaktorn då behöva korrigeras för det högre antalet inkluderade släkten och det skulle också påverka uträkningen av  $S_{0.05}$ . Om metoderna för Nematod-BQI kan utvidgas till meiofauna i allmänhet kommer att delvis besvaras i fortsatt arbete inom projektet, och preliminära resultat har redan indikerat att det skulle kunna fungera väl.

Uträkning av känslighetsvärden, likt de använt i BQI och andra bentiska index, är ett viktigt bidrag till utvecklingen av meiofauna-index (Diaz m.fl., 2004; Leonardsson m.fl., 2009; Pinto m.fl., 2009). Utveckling av metoder för ekologiskt relevanta data-analys som dessa för streckkodningsdata är också nödvändigt för att metoderna ska förbättra vår kunskap om ekosystemens dynamik (Bik m.fl., 2012). Validering fortsatt utveckling av metoderna i Arbetsspaket 2 är därav viktigt. Skillnader mellan index uppstår oftast när dominanta taxa klassats olika (Labruno m.fl., 2012). En skillnad från metoden som använts för makrofauna (Rosenberg m.fl., 2004) är att känslighetsvärdena räknas ut med relativ i stället för absolut abundans. Medelvärdet av relativa abundans ökar exponentiellt när taxaantalet närmar sig 1 (eftersom värdena är multiplikativt invers för varandra), och detta gör att släkten som förekommer på kraftigt påverkade stationer med få släkten kommer få ett extra lågt känslighetsvärde. Att klassa allmänt abundanta och likgiltiga taxa som de mest toleranta, vilket skulle kunna vara resultatet, är ofördelaktigt (Leonardsson m.fl., 2015), då det förhindrar en särskiljning mellan kraftigt och måttligt påverkade miljöer. Likgiltighetsgrad hade ingen större effekt på de i projektet föreslagna känslighetsvärdena, BQI-Sens<sub>0.33</sub>, eller  $S_{0.05}$  värdena, trots det låga antalet prover. Men släkten som förekommer i fler prover tenderade att få lägre känslighetsvärde. Precisionen för nematod-känslighetsvärden skulle förbättras om ett högre antal prov användes uträkning, likt de för makrofauna (Rosenberg m.fl., 2004; Leonardsson m.fl., 2009, 2015). Även här är fortsatt av provtagning av Östersjön meiofauna-samhälle det som skulle bäst bidra till utveckling av Nematod-BQI och andra meiofauna-baserade miljöövervakningsverktyg.

På lång sikt kan uträkningen av känslighetsvärden eller index ta hjälp av mer resursintensiva metoder som maskininlärning (Pawlowski m.fl., 2018; Fontaine m.fl., 2023) och med utveckling av datahanteringskapacitet och mängden tillgänglig data kommer nästintill oändliga metoder finnas för att räkna ut och räkna om dessa värden. Det är dock viktigt att bibehålla medvetenhet om vilka underliggande ekologiska förhållandena som övervakas, annars riskerar syftet i miljöövervakning gå förlorat i abstrakta siffror.

### **Övervakning av ekosystemhälsa eller övervakning av specifik belastning**

En viktig fråga är om det som ska övervakas är en särskild störning av ekosystemet, syrebrist, övergödning eller föroreningar, eller om det är ekosystemhälsan som helhet (Ridall och Ingels, 2021). Övervakning bör gå mot övervakning av hela ekosystemets hälsa för att kunna ta in komplexiteten och göra korrekta bedömningar (Semprucci m.fl., 2015; Ridall och Ingels, 2021). Meiofauna har föreslagits som en storleksklass med både fördelarna av känd och förstådd ekologisk information som kan studeras åt enda sidan, och snabbt svar på miljöförändringar åt andra sidan, något som kan bättre låta oss övervaka flera komplexa störningarna av ekosystem

samtidigt (Lallias m.fl., 2015). Övervakning av specifika störningar kan dock vara nödvändigt vid till exempel punktbelastning. Nematod-samhället har använts som indikatorer på många olika specifika belastningar, särskilt kemiska föroreningar (Ridall och Ingels, 2021). Nematoder, och meiofauna i allmänhet, har alltså potential att bidra till både undersökande övervakning av specifika belastningar, och till operativ och kontrollerande övervakning. Viktning av index och känslighetsvärden skulle kunna göras för att belysa olika aspekter av ekosystemhälsa.

Utvecklingen av de olika index i *Maturity Index* familjen, som viktas olika beroende på om det är indikation av övergödning eller hälsan hos ekosystemets struktur som är av intresse, är ett lärorikt exempel på hur olika aspekter av belastningar och ekosystemets hälsa kan bedömas vid nematod-övervakning (Ferris m.fl., 2001; Ferris och Bongers, 2009). De är också en påminnelse om hur kunskap om organismernas ekologi kan bidra till miljöövervakning.

### Expertbedömning inom nematod-övervakning

*Maturity Index*, som visat sig fungera väl för övervakning av nematod-samhällen (Ferris och Bongers, 2009; Moreno m.fl., 2011), är baserat på kunskap om nematodernas livshistoria och ekologi. Både användningen av taxonomiska grupperingar, på ekologiskt relevant nivå, och funktionella grupper av nematoder har visat sig vara användbar i bedömningen av ekosystemhälsa baserat på nematod-samhället (Semprucci m.fl., 2015; Baldrighi m.fl., 2021; Beauchard m.fl., 2021). Empiriskt uträknade känslighetsvärden är att föredra då de oftast är mer tillförlitliga, men expertbedömning kan vara nödvändigt om data saknas eller av praktiska hinder (Leonardsson m.fl., 2009). Vi testade i NEMOte BARCODing att använda värden från Ridall och Ingels (2021) vilka baserar sig på den existerande litteraturen om marina nematoder känslighet, och våra resultat indikerar att den existerande kunskapen om nematoders känslighet är tillräckligt stor för att expertbedömning skulle vara möjlig om nödvändigt.

Den värdefulla informationen som information om släktenas livshistoria och funktionella roll i ekosystemet kan ge (Balsamo m.fl., 2012) visar på nödvändigheten att hålla kunskap om nematodernas faktiska ekologi vid liv. Miljöövervakning av nematoder och meiofauna i allmänhet hjälpa fylla de kunskapsluckor som finns om ekosystemens verkliga mångfald, stärka potentialen till forskning om meiofauna, och facilitera att denna kunskap utvecklas och bibehålls.

### Förhållandet mellan makrofauna och meiofauna-övervakning

Meiofauna spelar en central roll i ekosystemprocesser (Schratzberger och Ingels, 2018) och är därav inte bara en indikator på ekosystemhälsa utan också en livsviktig del i denna. I Östersjön finns svårigheter med att bedöma belastning på grund av *Shifting baselines* fenomenet (Pauly, 1995) där referensområden saknas för hela havet redan är påverkat (Bonsdorff m.fl., 1991; Villnäs och Norkko, 2011). Att fastställa den nuvarande hälsan hos meiofauna-samhället skulle, utöver att förbättra vår bedömning i närtid, göra att vi i framtiden undviker problem med ovetskap om deras historiska tillstånd (Ridall och Ingels, 2021).

Men införandet av meiofauna-miljöövervakningsprogram ger upphov till frågan om vad dess roll ska vara i förhållande till makrofauna-övervakning. Som nämnt är en fördel med sekvenseringsbaserad övervakning att den har potential att vara mer kostnadseffektiv än traditionell miljöövervakning. En detaljerad kostnadsanalys har



inte genomfördes inom projektet men kostnadseffektiviteten hos sekvenseringsmetoder har bedömts och diskuterats i flera studier (till exempel: Fonseca m.fl. (2010), Gibson m.fl. (2014), Aylagas m.fl. (2018) och Hering m.fl. (2018). Förändringar av övervakningsprogram är kostsamma då de kräver att nya metoder används parallellt med gamla under en tid för utvärdering och kalibrering av resultat och för att möjliggöra jämförelser med historiska data, men metodutveckling är också nödvändigt för långsiktig kostnadseffektivisering och förbättringar av tillförlitligheten (Magurran m.fl., 2010; Nygård m.fl., 2020).

Makrofauna och meiofauna-provtagning behöver dock inte utesluta varandra. Parallella övervakningsprogram med meiofauna och makrofauna, där de kan senare skiljas åt och fylla olika roller, skulle möjliggöra en långsiktig kostnadseffektivitet inom miljöövervakning. Det skulle också utgöra en säkerställning av statusbedömningar, samt att begynnande försämring eller återhämtning av ekosystemhälsa upptäcks tidigare. Utöver kostnadsaspekter, kan provtagning av de två organismgrupperna bedömas utifrån roll i framtida miljöövervakning, till exempel övervakning av syrefattiga miljöer med nematoder, samt tillförlitligheten och vilka synergieffekter som finns.

Som nämnt kan de mindre dramatiska förändringarna som sker i nematod-samhället (på grund utav ett större absolut antal individer) bidra med statistisk säkerhet i övervakning. En fråga är dock hur mycket den högre spatiala variationen av meiofauna (Schratzberger, 2012) kommer göra att denna måste skilja sig i upplägg från makrofauna-övervakning. Mängden sediment-provvolym påverkar exempelvis kvalitén på streckkodningsstudier (Nascimento m.fl., 2018). När tillförlitlighet och provtagningsupplägg för övervakning av de två organismgrupperna jämförs bör båda dessa aspekter (spatial variation och graden av dramatiska förändringar i samhället) vägas i hur de påverkar osäkerheten i mätvärden och hur denna osäkerhet förhåller sig till försiktighetsprincipen som bör ligga till grund för miljöövervakning (Carstensen, 2007).

Samtidigt skulle parallell provtagning av meiofauna och makrofauna möjliggöra gynnsam korsvalidering av verktyg och metoder, så som uträkning av känslighetsvärden. Korsvalidering är viktigt för den fortsatta utvecklingen av miljöövervakningsverktyg, och har föreslagits för skandinaviska benthos-index (Perus m.fl., 2007) och streckkodnings-index internationellt (Pawlowski m.fl., 2018). Data från meiofauna-samhället utgör även ett potentiellt underlag för uträkning av empiriska känslighetsvärden för makrofauna i Östersjön, som tidigare inte varit möjlig på grund utav de låga antalet arter (Zettler m.fl., 2007; Leonardsson m.fl., 2009). Ett sammanräknat antal av meiofauna och makrofauna taxa, potentiellt med streckkodningsdata från även för makrofauna, skulle kunna användas för att räkna ut  $S_{0.05}$  känslighetsvärden för båda organismgrupperna i Östersjön.

I och med etablering av streckkodningsmetoder för övervakning av nematoder i synnerhet, och dess användning för övervakning av ekosystem och mångfald i allmänhet, så kommer potentialen för mer självständiga, sekvenseringsbaserade metoder att öka. Speciellt om ett lyckat arbete med att harmonisera och optimera dessa metoder på internationell skala sker (Pawlowski m.fl., 2018). Vi har diskuterat framtida utvecklingar av Nematod-BQI i denna riktning, känslighetsvärden uträknade med endast nematod-data,  $S_{0.05}$ , och differentiering av tröskelvärden för makrofauna och meiofauna. Ett alternativ till att särskilja taxonomiska grupper och storleksklasser är att mäta ekologisk status med hjälp av index baserade på biologisk mångfald i större skala, speciellt i och med DNA-metoders potential att

möjliggöra detta (Porazinska m.fl., 2010; Bik m.fl., 2012). Som ett resultat av det lyckade arbetet med NEMOte BARCODing så har vi fått finansiering för ett nytt projekt som syftar till att utforska just detta, utvecklandet av index på biologisk mångfald för bedömning av ekosystemhälsa i stor skala med DNA-metoder. Projektet har nyligen påbörjats och är en del av EU programmet Biodiversa+ (Biodiversa+, 2023). Detta projekt kommer utgöra en fortsättning på, och framför allt en vidareutveckling av koncepten som presenterats i NEMOte BARCODing.

### **Slutsats, nematod-övervakning av Östersjön**

I Arbetsspaket 3 har vi utvecklat de verktyg som möjliggör nyttjandet av fördelarna nematod-övervakning. Ett övervakningsprogram baserat på DNA-streckkodningsmetoder användandet av ett Nematod-BQI ( $BQI_{nem}$ ), eller ett bredare index som inkluderar all meiofauna ( $BQI_{meio}$ ), skulle bidra med en robust metod för statusbedömning. Det skulle möjliggöra kostnadseffektivisering vid behov i miljöövervakning av Östersjön, samt bidra till forskning och kunskap om den verkliga mångfalden i svenska havsmiljöer. Praktisk utvärdering och optimering av streckkodningsbaserade metoder inom miljöövervakning är dock beroende av att de används inom verksamheten. Bred användningen av DNA-sekvensering i miljöövervakningssyften kommer leda till skalfördelar, och att inkludera metoderna i fler miljöövervakningsprogram idag kommer bidra till att denna långsiktiga potential realiserar. Därför rekommenderar vi att ett nematod-miljöövervakningsprogram inleds i Östersjön, och föreslår ett upplägg till pilotprogram för denna miljöövervakning.

# 6. Förslag. Pilotprogram för nematod-övervakning

## Bakgrund, framtida miljöövervakning

Forskning om den praktiska användningen av sekvenseringsmetoder och DNA-streckkodning inom miljöövervakning har ökat och metoderna har föreslagits vara effektiva för detta syfte, men hittills har inget bredd omfamnande av metoderna inom övervakning gjorts (Aylagas m.fl., 2018). Det finns många potentiella fördelar med streckkodningsbaserade metoder inom miljöövervakning. Till exempel kan det låta oss provta flera organismgrupper samtidigt, med enig metod, vilket skulle höja informationsvärdet i miljöövervakningen. Och användningen av sekvenseringsmetoder i fler övervakningsprogram, så väl som inom flera samhällsområden i bredare bemärkelse, gör att det finns stor möjlighet till effektivisering och skal-fördelar. Implementering av metoderna i praktisk verksamhet idag är nödvändiga för deras framtidsutveckling, men det behövs också tydliga appliceringsområden där användningen bidrar till nuvarande verksamhet och kan utvärderas (Pawlowski m.fl., 2018). Med denna bakgrund, och med de resultat och metodutvecklingar som presenterats i NEMOte BARCODing, anser vi att implementeringen av ett nematod-övervakningsprogram i Östersjön med DNA-streckkodning både är möjligt och något som skulle bidra med värdefull information. Vi har föreslår därför följande upplägg till ett pilotprogram för miljöövervakning av nematoder i Östersjön.

## Förslag, metodprotokoll för nematod-övervakning med streckkodning

Tabell 7a. Föreslaget protokoll för metastreckkodningsmetoder vid initial implementering av ett nematod-miljöövervakningsprogram. Förberedande steg i fält och labb.

Steg	Kommentar
Provtagning av översta 2 cm sediment i fält	Med kajakhämtare (50 cm <sup>2</sup> ), Förvaring i -20 °C
Densitetsextraktion av meiofauna	Levasil, Förvaring i -20 °C
DNA extraktion, slutgiltig volym 4 ml.	Förvaring i tillhörande elueringsbuffert, -20 °C
Kvantifiering av DNA mängd	Med Nanodrop
Renande av 100 µl extraherat DNA	Förvaring i tillhörande elueringsbuffert, -20 °C
Kvantifiering av DNA mängd	Med Nanodrop

Tabell 7b. Föreslaget protokoll för metastreckkodningsmetoder vid initial implementering av ett nematod-miljöövervakningsprogram. Biblioteksförberedelse och sekvensering.

Steg	Specifikation	Kommentar/referens
<b>PCR 1. Markörgens-amplifiering</b>		
<b>Primerpar</b>	<b>Framåt-primern:</b> TAREuk454FWD1 (5'CCAGCA(G/C)C(C/T)GCGGTAATTCC-3') <b>Bakåt-primern:</b> TAREukREV3 (5'ACTTTCGTTCTTGAT(C/T)(A/G)A-3')	(Stoeck m.fl., 2010)
<b>Föreberedelse av replikat</b>	3 replikat per prov + negativ kontroll <b>Total volym per replikat 25 µl:</b> 12,5 µl Q5 High-Fidelity Master Mix X2 0,5 µl Framåt-primern 0,5 µl Bakåt-primern 5 µl DNA-templatt 6,5 µl PCR-vatten (molekylär grad)	
<b>Termocyklerprogram</b>	Initiering 98 °C i 30 sek <b>15 denatureringscykler:</b> 98 °C, 10 sek, Hybridisering, 50 °C i 30 sek Elongering vid 72 °C 30 sek 10 min avslutande vid 72 °C	
<b>Gelelektrofores</b>		
<b>TASP-rengöring</b>	Replikat från PCR-1 0,1 ml Exonukleas I 0,2 ml Alkaliskt fosfat 15 minuters inkubering i 37 °C 15 minuters inkubering i 74 °C	
<b>PCR 2. Indexering</b>		
<b>Indexeringsprimers</b>	Nextera XT indexprimers Unikt indexerings-primerpar används för varje prov	
<b>Föreberedelse av replikat</b>	3 replikat per prov + negativ kontroll <b>Total volym per replikat 25 µl:</b> 5 µl Renad PCR-produkt från PCR-1 0,5 µl (indexerings) Framåt-primer 0,5 µl (indexerings) Bakåt-primer 12,5 µl Q5 High-Fidelity Master Mix X2 6,5 µl PCR-vatten (molekylär grad)	
<b>Termocyklerprogram</b>	Initiering 95°C i 3 min <b>15 denatureringscykler:</b> 95 °C, 30 sek, Hybridisering, 55 °C i 30 sek Elongering, 72 °C 30 sek 10 min avslutande vid 72°C.	
<b>Gelelektrofores</b>		
<b>Renande av PCR-produkt</b>	Med Agencourt AMPure XP Replikat sammanförs	
<b>Kvantifiering av DNA</b>	Med Qubit (Samt Nanodrop som stöd)	
<b>Sammanförande av slutgiltigt streckkodningsbibliotek, med en enhetlig molar mängd DNA från samtliga prover. Sekvensering med Illumina Miseq</b>		

## Förslag till Provtagningsupplägg

Årligen bör pilotprojektet sikta på att provta:

- 2 Stationskluster i kustområden av Egentliga Östersjön
- 2 Stationskluster i utsjöområden av Egentliga Östersjön
- 1 Stationskluster i kustområden av Bottniska viken
- 1 Stationskluster i utsjöområden av Bottniska viken

Föreslag på stationskluster:

Egentliga Östersjön:

- NAT Askö (Krabbfjärden)
- NAT Mysingen (Mysingen)
- NAT Västervik (Del av V Gotlandshavets utsjövatten)
- NAT När (Del av Ö Gotlandshavets utsjövatten)

Bottenviken:

- NAT8 (Gussöfjärden och Rånefjärden)
- NAT5 (Del av Bottenvikens utsjövatten)

Med 10 provtagna stationer vardera.

Då samtliga stationskluster ej provtas årligen så kan vissa stationskluster skifta mellan år, men målet bör vara att ta prover från 6 stationskluster totalt årligen.

Från varje station bör 3 prov av sedimentprover tas, för att utvärdera variationen samt osäkerheten i nematod-övervakning.

Som kvalitetssäkrings bör 2 prov årligen tas för morfologisk identifiering av 100 individer. Förslagsvis 1 från Egentliga Östersjön, samt 1 från Bottniska viken med station slumpad inom dessa.

Utöver dessa bör det siktas på att ta årligen ta prover från stationerna:

- 5139 N ÖLANDS NORRA UDDE
- 6007 S LANDSORT
- 6008 SO LANDSORT
- BY2 ARKONA
- BY38 KARLSÖDJ
- BY5 BORNHOLMSDJ
- C10
- HBP215
- IVB2
- TORH22

Då flera av dem är placerade i syrefriabottnar där makrofauna saknas kan information om nematod-samhället på dessa ge oss värdefull och mer precis information om ekosystemens hälsa och potential för återhämtning. Det skulle också tillåta en utvärdering av nematod-övervakning i detta hänseende, och spridningen av stationerna är gynnsam för att provta och bedöma nematodmångfalden i Östersjön.

## Förslag till statusklassningsverktyg – Nematod-BQI – BQI-Sens<sub>0.33</sub>

Vi förslår att följande index används som verktyg för statusklassning i ett pilotprogram för övervakning av nematoder.

$$BQI_{nem} = \left[ \sum_{i=1}^{S_{klassade}} \frac{N_i}{N_{klassade}} \times \text{Känslighetsvärde}_i \right] \times \log_{10} \left( \frac{S}{3.5} + 1 \right) \times \left( \frac{S}{S + 2.5} \right)$$

Där  $S_{klassade}$  är antalet taxa med känslighetsvärde,  $N_i$  är antalet sekvensläsningar av släkte  $i$ ,  $N_{klassade}$  är det totala antalet sekvensläsningar för släkten med känslighetsvärde,  $\text{Känslighetsvärde}_i$  är känslighetsvärdet för släkten  $i$ ,  $S$  är antalet släkten.

Vi föreslår även att de känslighetsvärden som benämns BQI-Sens<sub>0.33</sub> i Tabell 19 i Bilaga 5 används för uträkningen av känslighetsfaktorn.

### Avslutande reflektioner

Vi har sökt att ge klara förslag och rekommendationer gällande vilka metoder som ska användas för detta pilotprogram. De är behövs dock självklart optimeras över tid. Många frågor återstår gällande säkerheten och variationen i ett Nematod-BQI. Därav har det föreslagits att 3 prov tas från stationer i den initiala fasen av nematodövervakning, så att denna osäkerhet kan bedömas (Leonardsson m.fl., 2015). Det kan visa sig att 1 prov per station med mer stationer är det optimala för nematodprovtagning i Östersjön, likt det är för makrofauna (Cuff och Coleman, 1979). Det kan också visa sig att mer utspridda stationer, snarare än stationskluster (Leonardsson och Blomqvist, 2014), är mer lämpligt för nematoder.

Om detta pilotprogram genomförs med ett upplägg som vilar på existerande miljöövervakningsstruktur, likt den provtagning som genomförts inom NEMOte BARCODing, så skulle det vara en mycket kostnadseffektiv början på ett nematodövervakningsprogram. Fältprover som samlas in för framtida sekvensering skulle vara till nytta, även om de ej kan sekvenseras i närtid.

Om det visar sig att användning av meiofauna i allmänhet är mer användbart än bara just nematoder så behöver vissa justeringar av indexformel och omräkning av känslighetsvärden göras, men provtagningsupplägget skulle vara densamma. Data om hela meiofauna-samhället fås också vid streckkodning av nematod-samhället, så insamlade data inom ett nematod-pilotprogram skulle även förbättra möjligheten för ett allmänt meiofauna-BQI. På längre sikt finns gott utrymme för utveckling av metoderna, och aspekter i denna potentiella utveckling har rörts vid i de diskussionsdelarna av varje Arbetspaket. Implementeringen av ett pilotprogram för övervakning av nematoder skulle vara den bästa garanten för att facilitera denna utveckling av Nematod-BQI och meiofauna-övervakning med DNA-streckkodning, då det ger denna utveckling fasta ramar och ett klart syfte.

## 7. Slutsatser

NEMOte BARCODing har lett till förbättringar av infrastruktur, metoder och verktyg som krävs för att möjliggöra övervakning av nematoder med DNA-streckkodning. I Arbetsspaket 1 så förbättrade projektet de existerande referensdatabaserna för 18S och 28S markörgenerna hos 110 nematod-arter i Östersjön, något som är centralt för att ge god representation av nematod-samhället genom DNA-streckkodning.

I Arbetsspaket 2 så utvärderades sekvenseringsmetoder i dess förmåga att spegla kvantitativa förhållanden i nematod-samhället. Metoderna för streckkodning av nematoder utvärderades även. Streckkodning av 18S-rRNA markörgenen med TAREuk primerparen visade sig ge en tillfredställande bild av nematod-samhället, medan de testade 28S primerparen visade sig vara bristfällig. Därav rekommenderar vi att 18S-streckkodning med de i rapporten testade primerparen (Primerpar: TAREuk, Stoeck m.fl., 2010) används vid övervakning av nematoder i Östersjön. DNA-streckkodnings potential för att även användas på makrofauna-samhället utforskades även och streckkodning av COI genomfördes för detta, med delade resultat (Primerpar: mlCOIint, Leray m.fl., 2013). De visade både på god korrelation mellan sekvensläsningar och biomassa eller abundans för del flesta arter. Men också på metod-bias vilket ledde till stor överskattning av ett specifikt släkte, *Marenzelleria*. Vi bedömer att fortsatt optimering och justering av index som BQI behövs för streckkodning av makrofauna ska kunna användas i övervakning.

I Arbetsspaket 3 har NEMOte BARCODing utvecklat det verktyg som föreslås användas för statusklassning inom ett nematod-miljöövervakningsprogram, Nematod-BQI. Detta index utvecklades med data från DNA-streckkodning av nematoder och möjliggör statusklassning baserat på densamma. En rad andra index som tidigare presenterats som alternativ för miljöövervakning av nematoder testades även, och framtida utveckling av statusklassning och verktyg med meiofauna och streckkodningsmetoder diskuterades.

Genom dessa tre Arbetsspaket har NEMOte BARCODing testat, utvecklat och tagit fram metoder och verktyg för genomförande av nematod-miljöövervakning. För att ta vara på dessa framsteg och de möjligheter det öppnar upp så föreslås ett pilot-program för nematod-övervakning. Ett sådant program skulle bidra till nuvarande miljöövervakning genom att tillföra information, öka precisionen i statusbedömningar samt potentiellt möjliggöra kostnadseffektiviseringar. Det skulle också bidra till fortsatt forskning om hur metoderna kan effektiviseras. Som diskuterats behövs kontinuerlig jämförelse och förbättring av metoderna, till exempel optimering av streckkodningsprotokoll för Östersjöns makrofauna. Fortsatt utveckling av streckkodningsbaserade index, speciellt multitrofiska index, är också centralt för metodernas användning inom miljöövervakning. Vi hoppas att denna rapport kommer bidra både till framtida utveckling av miljöövervakningen och till forskning om praktisk applicering av streckkodningsmetoder.

På lång sikt har miljöövervakning med DNA-metoder stor utvecklingspotential och möjliga skalfördelar. För att tillgodose det nuvarande och det framtida behovet av miljöövervakningar, lösa brister och möta nya utmaningar behövs både utveckling av existerande metoder och nya robusta metoder. Streckkodning av de frilevande nematoderna kan bidra till detta, och nematod-samhället har mycket att säga oss om ekosystemens mångfald och hälsa.

# Tack

NEMOte BARCODing vill tacka för hjälpen från Prof. Jonas Gunnarsson, Dr. Caroline Raymond och Dr. Jan Albertsson med insamlingen av sedimentproverna som detta projekt byggde på. Vi vill också tacka för finansieringen från Naturvårdsverket i samarbete med HaV (projektnummer NV-802-0151-18).



# Källhänvisning

- Ahmed, M., Boström, S., och Holovachov, O., 2020. Revision of the genus *Cobbionema* Filipjev, 1922 (Nematoda, Chromadorida, Selachinematidae). *European Journal of Taxonomy*, Nr. 702.
- Alves, A.S., Adão, H., Ferrero, T.J., Marques, J.C., Costa, M.J., och Patrício, J., 2013. Benthic meiofauna as indicator of ecological changes in estuarine ecosystems: The use of nematodes in ecological quality assessment. *Ecological Indicators*, Vol. 24, s. 462–475.
- Amjad, S. och Gray, J., 1983. Use of the Nematode-Copepod ratio as an index of organic pollution. *Marine pollution bulletin*, Vol. 14, Nr. 5, s. 178–181.
- Andersen, J., A, A., Bergström, P., Bergström, L., Blomqvist, M., Carstensen, J., Drakare, S., Ecke, F., Hallstan, S., H, H., Holmgren, K., M, J., .K, J., Kahlert, M., Karlson, B., C, K., Karlsson, M., Krause-Jensen, D., K, L., och Wikström, S., 2016. *Ecological Assessment of Swedish Water Bodies; development, harmonization and integration of biological indicators*.
- Ankar, S. och Elmgren, R., 1978. The benthic macro- and meiofauna of the Askö- Landsort Area—A stratified sampling survey. *Contributions From the Askö Laboratory University of Stockholm Sweden*, Vol. 11, s. 1–115.
- Appeltans, W., Ah Yong, S., Anderson, G., Angel, M., Artois, T., Bailly, N., Bamber, R., Barber, A., Bartsch, I., Berta, A., Blazewicz-Paszkwycz, M., Bock, P., Boxshall, G., Boyko, C., Brandao, S., Bray, R., Bruce, N., Cairns, S., Chan, T., Cheng, L., Collins, A., Cribb, T., Curini-Galletti, M., Dahdouh-Guebas, F., Davie, P., Dawson, M., De Clerck, O., Decock, W., De Grave, S., de Voogd, N., Domning, D., Emig, C., Erseus, C., Eschmeyer, W., Fauchald, K., Fautin, D., Feist, S., Fransen, C., Furuya, H., Garcia-Alvarez, O., Gerken, S., Gibson, D., Gittenberger, A., Gofas, S., Gomez-Daglio, L., Gordon, D., Guiry, M., Hernandez, F., Hoeksema, B., Hopcroft, R., Jaume, D., Kirk, P., Koedam, N., Koenemann, S., Kolb, J., Kristensen, R., Kroh, A., Lambert, G., Lazarus, D., Lemaitre, R., Longshaw, M., Lowry, J., Macpherson, E., Madin, L., Mah, C., Mapstone, G., McLaughlin, P., Mees, J., Meland, K., Messing, C., Mills, C., Molodtsova, T., Mooi, R., Neuhaus, B., Ng, P., Nielsen, C., Norenburg, J., Opresko, D., Osawa, M., Paulay, G., Perrin, W., Pilger, J., Poore, G., Pugh, P., Read, G., Reimer, J., Rius, M., Rocha, R., Saiz-Salinas, J., Scarabino, V., Schierwater, B., Schmidt-Rhaesa, A., Schnabel, K., Schotte, M., Schuchert, P., Schwabe, E., Segers, H., Self-Sullivan, C., Shenkar, N., Siegel, V., Sterrer, W., Stohr, S., Swalla, B., Tasker, M., Thuesen, E., Timm, T., Todaro, M., Turon, X., Tyler, S., Uetz, P., van der Land, J., Vanhoorne, B., van Ofwegen, L., van Soest, R., Vanaverbeke, J., Walker-Smith, G., Walter, T., Warren, A., Williams, G., Wilson, S., och Costello, M., 2012. The Magnitude of Global Marine Species Diversity. *Current biology*, Vol. 22, Nr. 23, s. 2189–2202.
- Arbizu, P.M., 2023. pairwiseAdonis.
- Armenteros, M., Pérez-García, J.A., Ruiz-Abierno, A., Díaz-Asencio, L., Helguera, Y., Vincx, M., och Decraemer, W., 2010. Effects of organic enrichment on nematode assemblages in a microcosm experiment. *Marine Environmental Research*, Vol. 70, Nr. 5, s. 374–382.

- Aylagas, E., Borja, Á., Muxika, I., och Rodríguez-Ezpeleta, N., 2018. Adapting metabarcoding-based benthic biomonitoring into routine marine ecological status assessment networks. *Ecological Indicators*, Vol. 95, s. 194–202.
- Aylagas, E., Borja, A., och Rodriguez-Ezpeleta, N., 2014. Environmental Status Assessment Using DNA Metabarcoding: Towards a Genetics Based Marine Biotic Index (gAMBI). *Plos one*, Vol. 9, Nr. 3.
- Aylagas, E., Mendibil, I., Borja, Á., och Rodríguez-Ezpeleta, N., 2016. Marine Sediment Sample Pre-processing for Macroinvertebrates Metabarcoding: Mechanical Enrichment and Homogenization. *Frontiers in Marine Science*, Vol. 3.
- Baldrighi, E., Vasapollo, C., Grassi, E., Alvisi, F., Cesaroni, L., Balsamo, M., och Semprucci, F., 2021. Meiobenthic assemblages as ecological indicator of natural variability induced by ecosystem engineers. *Regional studies in marine science*, Vol. 45, s. 101824.
- Balsamo, M., Semprucci, F., Frontalini, F., och Coccioni, R., 2012. Meiofauna as a Tool for Marine Ecosystem Biomonitoring. *Marine Ecosystems*. A. Cruzado, red.
- Beauchard, O., Brind'Amour, A., Schratzberger, M., Laffargue, P., Hintzen, N., Somerfield, P., och Piet, G., 2021. A generic approach to develop a trait-based indicator of trawling-induced disturbance. *Marine ecology progress series*, Vol. 675, s. 35–52.
- Bell, T.G. och Kramvis, A., 2013. Fragment Merger: An Online Tool to Merge Overlapping Long Sequence Fragments. *Viruses*, Vol. 5, Nr. 3, s. 824–833.
- Berezina, N. och Petukhov, V., 2023. Bioindication of Bottom Sediments of the Gulf of Finland by the Composition of Meiobenthos in Combination with Biotesting and Chemical Analysis. *Oceanology*, Vol. 63, Nr. 3, s. 352–362.
- Bik, H.M., Fournier, D., Sung, W., Bergeron, R.D., och Thomas, W.K., 2013. Intra-Genomic Variation in the Ribosomal Repeats of Nematodes. *Plos one*, Vol. 8, Nr. 10, s. e78230.
- Bik, H.M., Hawkins, L.E., Hughes, J.A., och Lambshead, J.D., 2009. Rapid decline of PCR amplification from genomic extracts of DESS-preserved, slide-mounted nematodes. *Nematology*, Vol. 11, Nr. 6, s. 827–834.
- Bik, H.M., Porazinska, D.L., Creer, S., Caporaso, J.G., Knight, R., och Thomas, W.K., 2012. Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, Vol. 27, Nr. 4, s. 233–243.
- Biodiversa+ [internet], 2023. *Biodiversa +*. Tillgängligt: <https://www.biodiversa.eu/> [Hämtad 2023-11-3].
- Bista, I., Carvalho, G.R., Tang, M., Walsh, K., Zhou, X., Hajibabaei, M., Shokralla, S., Seymour, M., Bradley, D., Liu, S., Christmas, M., och Creer, S., 2018. Performance of amplicon and shotgun sequencing for accurate biomass estimation in invertebrate community samples. *Molecular Ecology Resources*, Vol. 18, Nr. 5, s. 1020–1034.
- Bold Systems v4 [internet], 2023. Tillgängligt: <https://boldsystems.org/> [Hämtad 2023-10-29].

- Bonaglia, S. och Nascimento, F.J.A., 2023. Meiofauna Shaping Biogeochemical Processes. *New Horizons in Meiobenthos Research: Profiles, Patterns and Potentials*. O. Giere och M. Schratzberger, red., s. 33–54.
- Bonaglia, S., Nascimento, F.J.A., Bartoli, M., Klawonn, I., och Brüchert, V., 2014. Meiofauna increases bacterial denitrification in marine sediments. *Nature Communications*, Vol. 5, Nr. 1, s. 5133.
- Bongers, T., 1990. The maturity index – An ecological measure of environmental disturbance based on Nematode species composition. *Oecologia*, Vol. 83, Nr. 1, s. 14–19.
- Bongers, T., Alkemade, R., och Yeates, G., 1991. Interpretation of disturbance-induced maturity decrease in marine Nematode assemblages by means of the maturity index. *Marine ecology progress series*, Vol. 76, Nr. 2, s. 135–142.
- Bonsdorff, E., Aarnio, K., och Sandberg, E., 1991. Temporal and Spatial Variability of Zoobenthic Communities in Archipelago Waters of the Northern Baltic Sea- Consequences of Eutrophication? *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, Vol. 76, Nr. 3, s. 433–449.
- Borja, A., Franco, J., och Pérez, V., 2000. A Marine Biotic Index to Establish the Ecological Quality of Soft-Bottom Benthos Within European Estuarine and Coastal Environments. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 40, Nr. 12, s. 1100–1114.
- Bourlat, S.J., Haenel, Q., Finnman, J., och Leray, M., 2016. Preparation of Amplicon Libraries for Metabarcoding of Marine Eukaryotes Using Illumina MiSeq: The Dual-PCR Method. *Marine Genomics*. S.J. Bourlat, red., Vol. 1452, s. 197–207.
- Broman, E., Holmfeldt, K., Bonaglia, S., Hall, P., och Nascimento, F., 2021. Cyanophage Diversity and Community Structure in Dead Zone Sediments. *mSphere*, Vol. 6, Nr. 2, s. e00208-21.
- Broman, E., Raymond, C., Sommer, C., Gunnarsson, J.S., Creer, S., och Nascimento, F.J.A., 2019. Salinity drives meiofaunal community structure dynamics across the Baltic ecosystem. *Molecular Ecology*, Vol. 28, Nr. 16, s. 3813–3829.
- Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A., och Holmes, S., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, Vol. 13, Nr. 7, s. 581–583.
- Cannoodt, R. och Saelens, W., 2022. dyngen: A Multi-Modal Simulator for Spearheading Single-Cell Omics Analyses.
- Carstensen, J., 2007. Statistical principles for ecological status classification of Water Framework Directive monitoring data. *Marine pollution bulletin*, Vol. 55, Nr. 1–6, s. 3–15.
- Cederwall, A.H. och Elmgren, R., 1990. Biological Effects of Eutrophication in the Baltic Sea, Particularly the Coastal Zone. *Ambio*, Vol. 19, Nr. 3, s. 109–112.
- Chuseve, R. och Daunys, D., 2017. Can benthic quality assessment be impaired by uncertain species sensitivities? *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 116, Nr. 1–2, s. 332–339.

Conley, D.J., Carstensen, J., Aigars, J., Axe, P., Bonsdorff, E., Eremina, T., Haahti, B.-M., Humborg, C., Jonsson, P., Kotta, J., Lännegren, C., Larsson, U., Maximov, A., Medina, M.R., Lysiak-Pastuszek, E., Remeikaitė-Nikienė, N., Walve, J., Wilhelms, S., och Zillén, L., 2011. Hypoxia Is Increasing in the Coastal Zone of the Baltic Sea. *Environmental Science & Technology*, Vol. 45, Nr. 16, s. 6777–6783.

Coomans, A., 2000. Nematode systematics: past, present and future. *Nematology*, Vol. 2, Nr. 1, s. 3–7.

Coull, B., 1999. Role of meiofauna in estuarine soft-bottom habitats. *Australian journal of ecology*, Vol. 24, Nr. 4, s. 327–343.

Coull, B.C., Hicks, G.R.F., och Wells, J.B.J., 1981. Nematode-Copepod ratios for monitoring pollution – A rebuttal. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 12, Nr. 11, s. 378–381.

Creer, S., Fonseca, V.G., Porazinska, D.L., Giblin-Davis, R.M., Sung, W., Power, D.M., Packer, M., Carvalho, G.R., Blaxter, M.L., Lamshead, P.J.D., och Thomas, W.K., 2010. Ultrasequencing of the meiofaunal biosphere: practice, pitfalls and promises. *Molecular Ecology*, Vol. 19, Nr. s1, s. 4–20.

Cuff, W. och Coleman, N., 1979. Optimal Survey Design: Lessons from a Stratified Random Sample of Macrobenthos. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, Vol. 36, Nr. 4, s. 351–361.

Dauvin, J. och Ruellet, T., 2009. The estuarine quality paradox: Is it possible to define an ecological quality status for specific modified and naturally stressed estuarine ecosystems? *Marine pollution bulletin*, Vol. 59, Nr. 1–3, s. 38–47.

Dell’Anno, A., Carugati, L., Corinaldesi, C., Riccioni, G., och Danovaro, R., 2015. Unveiling the Biodiversity of Deep-Sea Nematodes through Metabarcoding: Are We Ready to Bypass the Classical Taxonomy? *Plos one*, Vol. 10, Nr. 12, s. e0144928.

Diaz, R.J. och Rosenberg, R., 2008. Spreading Dead Zones and Consequences for Marine Ecosystems. *Science*, Vol. 321, Nr. 5891, s. 926–929.

Diaz, R.J., Solan, M., och Valente, R.M., 2004. A review of approaches for classifying benthic habitats and evaluating habitat quality. *Journal of Environmental Management*, Vol. 73, Nr. 3, s. 165–181.

Ehrnsten, E., Norkko, A., Müller-Karulis, B., Gustafsson, E., och Gustafsson, B.G., 2020. The meagre future of benthic fauna in a coastal sea—Benthic responses to recovery from eutrophication in a changing climate. *Global Change Biology*, Vol. 26, Nr. 4, s. 2235–2250.

Elbrecht, V. och Leese, F., 2017. Validation and Development of COI Metabarcoding Primers for Freshwater Macroinvertebrate Bioassessment. *Frontiers in Environmental Science*, Vol. 5.

Elbrecht, V., Vamos, E.E., Meissner, K., Aroviita, J., och Leese, F., 2017. Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, Vol. 8, Nr. 10, s. 1265–1275.

Elmgren, R., Rosenberg, R., Andersin, A.-B., Evans, S., Kangas, P., Lassig, J., Leppäkoski, E., och Varmo, R., 1984. Benthic macro- and meiofauna in the Gulf of Bothnia (Northern Baltic).

Europaparlamentets och rådets direktiv 2000/60/EC, 2000. *Europaparlamentets och rådets direktiv 2000/60/EG av den 23 oktober 2000 om upprättande av en ram för gemenskapens åtgärder på vattenpolitikens område*. OJ L.

Europaparlamentets och rådets direktiv 2008/56/EG, 2008. *Europaparlamentets och rådets direktiv 2008/56/EG av den 17 juni 2008 om upprättande av en ram för gemenskapens åtgärder på havsmiljöpolitikens område (Ramdirektiv om en marin strategi)*. OJ L.

Ferris, H. och Bongers, A.M.T., 2009. Indices Developed Specifically for analysis of Nematode Assemblages. *Nematodes as Environmental Indicators*.

Ferris, H., Bongers, T., och de Goede, R., 2001. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *APPLIED SOIL ECOLOGY*, Vol. 18, Nr. 1, s. 13–29.

Fleischer, D. och Zettler, M.L., 2009. An adjustment of benthic ecological quality assessment to effects of salinity. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 58, Nr. 3, s. 351–357.

Fonseca, V.G., Carvalho, G.R., Sung, W., Johnson, H.F., Power, D.M., Neill, S.P., Packer, M., Blaxter, M.L., Lamshead, P.J.D., Thomas, W.K., och Creer, S., 2010. Second-generation environmental sequencing unmasks marine metazoan biodiversity. *Nature Communications*, Vol. 1, Nr. 1, s. 98.

Fontaine, L., Pin, L., Savio, D., Friberg, N., Kirschner, A.K.T., Farnleitner, A.H., och Eiler, A., 2023. Bacterial bioindicators enable biological status classification along the continental Danube river. *Communications Biology*, Vol. 6, Nr. 1, s. 1–11.

Gammal, J., Norkko, J., Pilditch, C.A., och Norkko, A., 2017. Coastal Hypoxia and the Importance of Benthic Macrofauna Communities for Ecosystem Functioning. *Estuaries and Coasts*, Vol. 40, Nr. 2, s. 457–468.

Gibson, J., Shokralla, S., Porter, T.M., King, I., van Konynenburg, S., Janzen, D.H., Hallwachs, W., och Hajibabaei, M., 2014. Simultaneous assessment of the macrobiome and microbiome in a bulk sample of tropical arthropods through DNA metasytematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 111, Nr. 22, s. 8007–8012.

Giere, O., 2009. *Meiobenthology. The Microscopic Motile Fauna of Aquatic Sediments*.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*. Oxford, s. 95–98.

Harrell, F.E.J., 2023. Hmisc: Harrell Miscellaneous.

HaV, 2012. *Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter om vad som kännetecknar god miljöstatus samt miljö kvalitetsnormer med indikatorer för Nordsjön och Östersjön; HVMFS 2012:18*.

HaV, 2019. *Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter om klassificering och miljö kvalitetsnormer avseende ytvatten; HVMFS 2019:25*.

HaV, 2020. *Bedömningsgrunder för ytvattenförekomster. Bottenfauna i kustvatten och vatten i övergångszon*.

- Heip, C., 1995. Eutrophication and Zoobenthos dynamics. *Ophelia*, Vol. 41, Nr. 1, s. 113–136.
- HELCOM, 2021. Baltic Sea Action Plan – 2021 update. *Helsinki Commission, Finland*.
- 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., och Kelly, M., 2018. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research*, Vol. 138, s. 192–205.
- Holovachov, O., Haenel, Q., Bourlat, S.J., och Jondelius, U., 2017. Taxonomy assignment approach determines the efficiency of identification of OTUs in marine nematodes. *Royal Society Open Science*, Vol. 4, Nr. 8, s. 170315.
- Holterman, M., Korthals, G., Doroszuk, A., van Megen, H., Bakker, J., Bongers, T., Helder, J., och van der Wurff, A., 2011. A strategy in searching for stress tolerance-correlated characteristics in nematodes while accounting for phylogenetic interdependence. *Nematology*, Vol. 13, Nr. 3, s. 261–275.
- Holterman, M., van der Wurff, A., van den Elsen, S., van Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., och Helder, J., 2006. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Molecular biology and evolution*, Vol. 23, Nr. 9, s. 1792–1800.
- Hovmöller, R., Forshage, M., och Ronquist, F., 2017. Streckkodning av den svenska floran och faunan – förutsättningar och utmaningar. *PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2017:1. Naturhistoriska riksmuseets småskriftserie*.
- Jenny Caruso, Agneta Christensen, Fredrik Gunnarsson, Lennart Johansson, Malin Kronholm, Ragnar Lagergren, Emanuel Nandorf, Jan Petersson, Anders Rimne, Juha Salonsaari, och Katarina Vartia, 2013. Kokbok för kartläggning och analys 2013–2014 – Hjälpredda klassificering av ekologisk status.
- Josefson, A., Blomqvist, M., Hansen, J., Rosenberg, R., och Rygg, B., 2009. Assessment of marine benthic quality change in gradients of disturbance: Comparison of different Scandinavian multi-metric indices. *Marine pollution bulletin*, Vol. 58, Nr. 9, s. 1263–1277.
- Keeley, N., Wood, S.A., och Pochon, X., 2018. Development and preliminary validation of a multi-trophic metabarcoding biotic index for monitoring benthic organic enrichment. *Ecological Indicators*, Vol. 85, s. 1044–1057.
- Kelly, R.P., Port, J.A., Yamahara, K.M., och Crowder, L.B., 2014. Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm. *Plos one*, Vol. 9, Nr. 1, s. e86175.
- Kuliński, K., Rehder, G., Asmala, E., Bartosova, A., Carstensen, J., Gustafsson, B., Hall, P.O.J., Humborg, C., Jilbert, T., Jürgens, K., Meier, H.E.M., Müller-Karulis, B., Naumann, M., Olesen, J.E., Savchuk, O., Schramm, A., Slomp, C.P., Sofiev, M., Sobek, A., Szymczycha, B., och Undeman, E., 2022. Biogeochemical functioning of the Baltic Sea. *Earth System Dynamics*, Vol. 13, Nr. 1, s. 633–685.

Labrune, C., Romero-Ramirez, A., Amouroux, J.M., Duchene, J.C., Desmalades, M., Escoubeyrou, K., Buscail, R., och Gremare, A., 2012. Comparison of ecological quality indices based on benthic macrofauna and sediment profile images: A case study along an organic enrichment gradient off the Rhone River. *Ecological Indicators*, Vol. 12, Nr. 1, s. 133–142.

Lallias, D., Hiddink, J.G., Fonseca, V.G., Gaspar, J.M., Sung, W., Neill, S.P., Barnes, N., Ferrero, T., Hall, N., Lamshead, P.J.D., Packer, M., Thomas, W.K., och Creer, S., 2015. Environmental metabarcoding reveals heterogeneous drivers of microbial eukaryote diversity in contrasting estuarine ecosystems. *The ISME Journal*, Vol. 9, Nr. 5, s. 1208–1221.

Lamshead, P.J.D., Platt, H.M., och Shaw, K.M., 1983. The detection of differences among assemblages of marine benthic species based on an assessment of dominance and diversity. *Journal of Natural History*, Vol. 17, Nr. 6, s. 859–874.

Leonardsson, K. och Blomqvist, M., 2014. *Utvärdering av bottenfaunakluster längs svenska ostkusten*. Göteborg: Havs- och vattenmyndigheten, Nr. 978-91-87967-10-8 (ISBN).

Leonardsson, K., Blomqvist, M., Magnusson, M., Wikstrom, A., och Rosenberg, R., 2015. Calculation of species sensitivity values and their precision in marine benthic faunal quality indices. *Marine pollution bulletin*, Vol. 93, Nr. 1–2, s. 94–102.

Leonardsson, K., Blomqvist, M., och Rosenberg, R., 2009. Theoretical and practical aspects on benthic quality assessment according to the EU-Water Framework Directive – examples from Swedish waters. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 58, Nr. 9, s. 1286–1296.

Leonardsson, K., Blomqvist, M., och Rosenberg, R., 2016. Reducing spatial variation in environmental assessment of marine benthic fauna. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 104, Nr. 1–2, s. 129–138.

Leray, M., Yang, J.Y., Meyer, C.P., Mills, S.C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J.T., och Machida, R.J., 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, Vol. 10, s. 34.

Magurran, A.E., Baillie, S.R., Buckland, S.T., Dick, J.McP., Elston, D.A., Scott, E.M., Smith, R.I., Somerfield, P.J., och Watt, A.D., 2010. Long-term datasets in biodiversity research and monitoring: assessing change in ecological communities through time. *Trends in Ecology & Evolution*, Vol. 25, Nr. 10, s. 574–582.

Martinez, L., Wu, S., Baur, L., Patton, M., Owen-Smith, P., Collins, S., och Rudgers, J., 2023. Soil nematode assemblages respond to interacting environmental changes. *Oecologia*, Vol. 202, Nr. 3, s. 481–495.

Meier, H.E.M., Kniebusch, M., Dieterich, C., Gröger, M., Zorita, E., Elmgren, R., Myrberg, K., Ahola, M.P., Bartosova, A., Bonsdorff, E., Börgel, F., Capell, R., Carlén, I., Carlund, T., Carstensen, J., Christensen, O.B., Dierschke, V., Frauen, C., Frederiksen, M., Gaget, E., Galatius, A., Haapala, J.J., Halkka, A., Hugelius, G., Hünicke, B., Jaagus, J., Jüssi, M., Käyhkö, J., Kirchner, N., Kjellström, E., Kulinski, K., Lehmann, A., Lindström, G., May, W., Miller, P.A., Mohrholz, V., Müller-Karulis, B., Pavón-Jordán, D., Quante, M., Reckermann, M., Rutgersson, A., Savchuk, O.P., Stendel, M., Tuomi, L., Viitasalo, M., Weisse, R., och Zhang, W., 2022. Climate change in the Baltic Sea region: a summary. *Earth System Dynamics*, Vol. 13, Nr. 1, s. 457–593.

- Modig, H. och Ólafsson, E., 1998. Responses of Baltic benthic invertebrates to hypoxic events. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Vol. 229, Nr. 1, s. 133–148.
- Moens, T. och Vincx, M., 1997. Observations on the feeding ecology of estuarine nematodes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, Vol. 77, Nr. 1, s. 211–227.
- di Montanara, A., Baldrighi, E., Franzo, A., Catani, L., Grassi, E., Sandulli, R., och Semprucci, F., 2022. Free-living nematodes research: State of the art, prospects, and future directions. A bibliometric analysis approach. *Ecological Informatics*, Vol. 72, s. 101891.
- Moreno, M., Semprucci, F., Vezzulli, L., Balsamo, M., Fabiano, M., och Albertelli, G., 2011. The use of nematodes in assessing ecological quality status in the Mediterranean coastal ecosystems. *Ecological indicators*, Vol. 11, Nr. 2, s. 328–336.
- Nascimento, F., Karlson, A., och Elmgren, R., 2008. Settling blooms of filamentous cyanobacteria as food for meiofauna assemblages. *Limnology and Oceanography*, Vol. 53, Nr. 6, s. 2636–2643.
- Nascimento, F.J.A., Lallias, D., Bik, H.M., och Creer, S., 2018. Sample size effects on the assessment of eukaryotic diversity and community structure in aquatic sediments using high-throughput sequencing. *Scientific Reports*, Vol. 8, Nr. 1, s. 11737.
- Nascimento, F.J.A., Näslund, J., och Elmgren, R., 2012. Meiofauna enhances organic matter mineralization in soft sediment ecosystems. *Limnology and Oceanography*, Vol. 57, Nr. 1, s. 338–346.
- Nemaplex [internet], 2023. Tillgängligt: <http://nemaplex.ucdavis.edu/> [Hämtad 2023-10-20].
- Norkko, J., Gammal, J., Hewitt, J.E., Josefson, A.B., Carstensen, J., och Norkko, A., 2015. Seafloor Ecosystem Function Relationships: In Situ Patterns of Change Across Gradients of Increasing Hypoxic Stress. *Ecosystems*, Vol. 18, Nr. 8, s. 1424–1439.
- Nunn, G.B., 1992. *Nematode molecular evolution: an investigation of evolutionary patterns among nematodes based upon DNA sequences*. University of Nottingham.
- Nygård, H., Lindegarth, M., Darr, A., Dinesen, G.E., Eigaard, O.R., och Lips, I., 2020. Developing benthic monitoring programmes to support precise and representative status assessments: a case study from the Baltic Sea. *Environmental Monitoring and Assessment*, Vol. 192, Nr. 12, s. 795.
- Näslund, J., Nascimento, F.J., och Gunnarsson, J.S., 2010. Meiofauna reduces bacterial mineralization of naphthalene in marine sediment. *The ISME Journal*, Vol. 4, Nr. 11, s. 1421–1430.
- Oksanen, J., Simpson, G.L., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O’Hara, R.B., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Caceres, M.D., Durand, S., Evangelista, H.B.A., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hannigan, G., Hill, M.O., Lahti, L., McGlenn, D., Ouellette, M.-H., Cunha, E.R., Smith, T., Stier, A., Braak, C.J.F.T., och Weedon, J., 2022. vegan: Community Ecology Package.
- Ólafsson, E. och Elmgren, R., 1997. Seasonal Dynamics of Sublittoral Meiobenthos in Relation to Phytoplankton Sedimentation in the Baltic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, Vol. 45, Nr. 2, s. 149–164.



- Pauly, D., 1995. Anecdotes and the shifting base-line syndrome of fisheries. *Trends in Ecology & Evolution*, Vol. 10, Nr. 10, s. 430–430.
- Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apothéloz-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., Barquín, 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., och Kahlert, M., 2018. The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e) DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment*, Vol. 637–638, s. 1295–1310.
- Pearson, T.H. och Rosenberg, R., 1978. Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanography and Marine Biology – An Annual Review*, Vol. 16, s. 229–311.
- Perus, J., Bonsdorff, E., Bäck, S., Lax, H.-G., Villnäs, A., och Westberg, V., 2007. Zoobenthos as Indicators of Ecological Status in Coastal Brackish Waters: A Comparative Study from the Baltic Sea. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, Vol. 36, Nr. 2–3, s. 250–256.
- Piñol, J., Mir, G., Gomez-Polo, P., och Agustí, N., 2015. Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods. *Molecular Ecology Resources*, Vol. 15, Nr. 4, s. 819–830.
- Pinto, R., Patrício, J., Baeta, A., Fath, B.D., Neto, J.M., och Marques, J.C., 2009. Review and evaluation of estuarine biotic indices to assess benthic condition. *Ecological Indicators*, Vol. 9, Nr. 1, s. 1–25.
- Porazinska, D.L., Giblin-Davis, R.M., Esquivel, A., Powers, T.O., Sung, W., och Thomas, W.K., 2010. Ecometagenetics confirm high tropical rainforest nematode diversity. *Molecular Ecology*, Vol. 19, Nr. 24, s. 5521–5530.
- Raffaelli, D.G. och Mason, C.F., 1981. Pollution monitoring with meiofauna, using the ratio of nematodes to copepods. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 12, Nr. 5, s. 158–163.
- Reusch, T.B.H., Dierking, J., Andersson, H.C., Bonsdorff, E., Carstensen, J., Casini, M., Czajkowski, M., Hasler, B., Hinsby, K., Hyytiäinen, K., Johannesson, K., Jomaa, S., Jormalainen, V., Kuosa, H., Kurland, S., Laikre, L., MacKenzie, B.R., Margonski, P., Melzner, F., Oesterwind, D., Ojaveer, H., Refsgaard, J.C., Sandström, A., Schwarz, G., Tonderski, K., Winder, M., och Zandersen, M., 2018. The Baltic Sea as a time machine for the future coastal ocean. *Science Advances*, Vol. 4, Nr. 5, s. eaar8195.
- Ridall, A. och Ingels, J., 2021. Suitability of Free-Living Marine Nematodes as Bioindicators: Status and Future Considerations. *Frontiers in Marine Science*, Vol. 8, s. 685327.
- Rosenberg, R., Blomqvist, M., Nilsson, H., Cederwall, H., och Dimming, A., 2004. Marine quality assessment by use of benthic species-abundance distributions: a proposed new protocol within the European Union Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 49, Nr. 9–10, s. 728–739.
- Rosenberg, R. och Loo, L.-O., 1988. Marine eutrophication induced oxygen deficiency – Effects on soft bottom fauna, western Sweden. *Ophelia*, Vol. 29, Nr. 3, s. 213–225.

- Schenk, J., Geisen, S., Kleinboelting, N., och Traunspurger, W., 2019. Metabarcoding data allow for reliable biomass estimates in the most abundant animals on earth. *Metabarcoding and Metagenomics*, Vol. 3, s. e46704.
- Schenk, J., Kleinbölting, N., och Traunspurger, W., 2020. Comparison of morphological, DNA barcoding, and metabarcoding characterizations of freshwater nematode communities. *Ecology and Evolution*, Vol. 10, Nr. 6, s. 2885–2899.
- Schiele, K.S., Darr, A., Zettler, M.L., Berg, T., Blomqvist, M., Daunys, D., Jermakovs, V., Korpinen, S., Kotta, J., Nygård, H., von Weber, M., Voss, J., och Warzocha, J., 2016. Rating species sensitivity throughout gradient systems – a consistent approach for the Baltic Sea. *Ecological Indicators*, Vol. 61, s. 447–455.
- Schratzberger, M., 2012. On the relevance of meiobenthic research for policy-makers. *Marine pollution bulletin*, Vol. 64, Nr. 12, s. 2639–2644.
- Schratzberger, M. och Ingels, J., 2018. Meiofauna matters: The roles of meiofauna in benthic ecosystems. *Journal of experimental marine biology and ecology*, Vol. 502, s. 12–25.
- Segerstråle, S.G., 1957. Baltic Sea. *Geological Society of American Memoirs*, 67, s. 751–800.
- Semprucci, F., Losi, V., och Moreno, M., 2015. A review of Italian research on free-living marine nematodes and the future perspectives on their use as Ecological Indicators (EcoInds). *Mediterranean marine science*, Vol. 16, Nr. 2, s. 352–365.
- Snelgrove, P.V.R., 1997. The Importance of Marine Sediment Biodiversity in Ecosystem Processes. *Ambio*, Vol. 26, Nr. 8, s. 578–583.
- Solan, M., Batty, P., Bulling, M., och Godbold, J., 2008. How biodiversity affects ecosystem processes: implications for ecological revolutions and benthic ecosystem function. *Aquatic Biology*, Vol. 2, Nr. 3, s. 289–301.
- Steckbauer, A., Duarte, C.M., Carstensen, J., Vaquer-Sunyer, R., och Conley, D.J., 2011. Ecosystem impacts of hypoxia: thresholds of hypoxia and pathways to recovery. *Environmental Research Letters*, Vol. 6, Nr. 2, s. 025003.
- Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M., Breiner, H., och Richards, T., 2010. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular ecology*, Vol. 19, s. 21–31.
- Viitasalo, M. och Bonsdorff, E., 2022. Global climate change and the Baltic Sea ecosystem: direct and indirect effects on species, communities and ecosystem functioning. *Earth System Dynamics*, Vol. 13, Nr. 2, s. 711–747.
- Villnäs, A. och Norkko, A., 2011. Benthic diversity gradients and shifting baselines: implications for assessing environmental status. *Ecological Applications*, Vol. 21, Nr. 6, s. 2172–2186.
- Warwick, R., 1981. The Influence of Temperature and Salinity on Energy Partitioning in the Marine Nematode *Diplolaimelloides-Bruciei*. *Oecologia*, Vol. 51, Nr. 3, s. 318–325.
- Warwick, R.M., Clarke, K.R., och Somerfield, P.J., 2010. Exploring the marine biotic index (AMBI): variations on a theme by Angel Borja. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 60, Nr. 4, s. 554–559.

- Wasilewska, L., 1974. Quantitative evaluation of the occurrence of nematodes in meadow soil from the surroundings of Sofia (Bulgaria). *Zesz Probl Postepow Nauk Roln.*
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T.L., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., Dunnington, D., Posit, och PBC, 2023. ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics.
- Wiederholm, T., 1980. Use of benthos in lake monitoring. *J. Water Pollut. Control Fed.; (United States)*, Vol. 52:3, Nr. 3, s. 537–547.
- Yoder, M., Ley, I.T.D., King, I.W., Mundo-Ocampo, M., Mann, J., Blaxter, M., Poiras, L., och Ley, P.D., 2006. DESS: a versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology*, Vol. 8, Nr. 3, s. 367–376.
- Zettler, M.L., Schiedek, D., och Bobertz, B., 2007. Benthic biodiversity indices versus salinity gradient in the southern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 55, Nr. 1–6, s. 258–270.
- Zullini, A., 1976. Nematodes as indicators of river pollution.
- Zullini, A. och Peretti, E., 1986. Lead pollution and moss-inhabiting nematodes of an industrial area. *Water, Air, and Soil Pollution*, Vol. 27, Nr. 3, s. 403–410.

# Publikationer och data

## Vetenskapliga publikationer

- Broman E., Bonaglia S., Holovachov O., Marzocchi U., Hall P.O.J, Nascimento, F.J.A. (2020). Uncovering diversity and metabolic spectrum of animals in dead zone sediments. *Communications Biology*, 3:106.
- Broman E., Bonaglia S., Norkko A., Creer S., Nascimento, F.J.A. (2020). High throughput shotgun sequencing of eRNA reveals taxonomic and derived functional shifts across a benthic productivity gradient. *Molecular Ecology*, 30 (13), 3023–3039.
- Broman E., Holmfeldt K., Bonaglia S., Hall P.O.J, Nascimento, F.J.A. (2021). Cyanophage diversity and community structure in dead zone sediments. *mSphere*, 6 (2), e00208-21.
- Iburg S., Izabel-Shen D., Austin ÅN., Hansen JP., Eklöf JS., Nascimento, F.J.A. (2021). Effects of Recreational Boating on Microbial and Meiofauna Diversity in Coastal Shallow Ecosystems of the Baltic Sea. *mSphere*, 6 (2), e00127-21.
- Capo, E., Broman, E., Bonaglia, S., Bravo, A.G., Bertilsson, S., Soerensen, A.L., Pinhassi, J., Lundin, D., Buck, M., Hall, P.O.J., Nascimento, F.J.A.\* and Björn, E.\* (2022), Oxygen-deficient water zones in the Baltic Sea promote uncharacterized Hg methylating microorganisms in underlying sediments. *Limnology and Oceanography*, 67: 135–146.
- Broman, E., Izabel-Shen D., Gijon A.R, Bonaglia S., Garcia S.L., Nascimento F.J.A. (2022). Microbial functional genes are driven by gradients in sediment stoichiometry, oxygen, and salinity across the Baltic benthic ecosystem. *Microbiome* 10(126):1–17.
- Rodríguez-Gijón, A., Buck, M., Andersson, A.F., Izabel-Shen, D., Nascimento, F.J.A., Garcia, S.L., 2023. Linking prokaryotic genome size variation to metabolic potential and environment. *ISME COMMUN.* 3, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s43705-023-00231-x>
- 3 publikationer som resulterat ur projektet förbereds:
  - 2 baserat på Arbetspaket 2, preliminära titlar:
    - ”Determination of taxon occurrence and abundance in mock communities comprising marine nematodes via metabarcoding and shotgun sequencing”
    - ”Benchmarking of COI metabarcoding of Baltic Sea makrofauna for monitoring reveals primer bias, but also promising potential.”
  - 1 baserat på Arbetspaket 3, preliminär titel:
    - ”A metabarcoding status assessment index for marine monitoring of meiofauna: Nematode-BQI”

## Populärvetenskapliga artiklar

- Överlevarna i Östersjöns döda botten: Havsutsikt 2/2020. <https://www.havet.nu/havsutsikt/artikel/overlevarna-i-doda-botten>
- Uncovering diversity and metabolic spectrum of animals in dead zone sediments. <https://naturecoevocommunity.nature.com/posts/59764-test>

## I media

- Övåntat liv i Östersjöns döda bottnar. <https://www.aftonbladet.se/nyheter/a/K39X06/ovantat-liv-i-ostersjons-doda-bottnar>
- Övåntat liv i Östersjöns döda bottnar. <https://www.hd.se/2020-03-14/ovantat-liv-i-ostersjons-doda-bottnar>

## Vetenskapliga presentationer

- Föreläsning om NEMOte BARCODing projektet i "Konferens om DNA-metodik i miljöarbetet" (8–9 december 2020)
- Föreläsning om NEMOte BARCODing projektet i ett seminarium på Cefas UK "(Bentisk mångfald i Östersjön)"
- Föreläsning om NEMOte BARCODing projektet i ett seminarium på Göteborg Universitet "(Environmental gradients in the Baltic Sea and controls of Biodiversity)"
- Föreläsning om NEMOte BARCODing projektet i ett seminarium på Geomar Helmholtz Centre for Ocean Research Kiel "(Bentisk mångfald i Östersjön)"
- Föreläsning om NEMOte BARCODing projektet i ett seminarium på Östersjö-centrum och Tvärminne Zoological Station
- Spridning av information av NEMOte BARCODing projektet i 3 kandidatkurser och 2 MSc kurser på Stockholms universitet
- Presentation av resultat från NEMOte BARCODing projektet på miljöövervakningsdagarna 2023.
- Hemsidan: Nemobarcod.com

# Bilaga 1. Metodspeccifikationer Biblioteksförberedelser

Tabell 8. Biblioteksförberedelser för Sanger sekvensering av enskilda nematoder i Arbetspaket 1 för uppladdning till referensdatabaser.

Steg	Specifikation	Kommentar/referens
<b>Extraktion och förberedelser, detaljerat i Ahmed m.fl. (2020)</b>		
<b>PCR Markörgens-amplifiering</b>		
<b>Primerpar</b>	<b>18S:</b> 988F–1912R and 1813F–2646R <b>28S:</b> D2Af and D3Br (Nunn 1992).	<b>18S:</b> (Holterman m.fl., 2006). <b>28S:</b> (Nunn 1992).
<b>Föberedelse av replikat</b>	För både 18S och 28S <b>Total volym per replikat 25 µl:</b> Illustra Hot Start Mix RTG 0,2 ml kit 1 µl Framåt-primern 1 µl Bakåt-primern 2 µl DNA-templatt 21 µl PCR-vatten (molekylär grad)	
<b>Termocyklerprogram</b>	<b>18S:</b> Initiering 94 °C i 5 min <b>5 denatureringscykler:</b> 94 °C, 30 sek, Hybridisering, 45 °C i 30 sek Elongering vid 72 °C 30 sek <b>35 denatureringscykler:</b> 94 °C, 30 sek, Hybridisering, 54 °C i 30 sek Elongering vid 72 °C 30 sek 5 min avslutande vid 72 °C <b>28S:</b> Initiering 94 °C i 4 min <b>35 denatureringscykler:</b> 94 °C, 60 sek, Hybridisering, 54 °C i 90 sek Elongering vid 72 °C 2 min 10 min avslutande vid 72 °C	
<b>Rengöring</b>	PCR produkt Exonukleas I Alkaliskt fosfatas	
<b>Sanger sekvensering</b>		

Tabell 9. Biblioteksförberedelser för streckkodning av prov använda i Arbetspaket 2 och 3.

Steg	Specifikation	Kommentar/referens
<b>PCR 1. Markörgens-amplifiering</b>		
<b>Primerpar</b>	<b>18S:</b> <b>Framåt-primern:</b> TAREuk454FWD1 (5'CCAGCA(G/C)C(C/T)GCGGTAATTCC-3') <b>Bakåt-primern:</b> TAREukREV3 (5'ACTTTCGTTCTTGAT(C/T)(A/G)A-3')  <b>28S:</b> <b>Framåt-primern:</b> 1274F (5'-GACCCGTCTTGAAACACGGA-3') <b>Bakåt-primern:</b> 706R (5'-GCCAGTTCTGCTTACC-3')	<b>18S:</b> (Stoeck m.fl., 2010) <b>28S:</b> (Schenk m.fl., 2019)
<b>Föreberedelse av replikat</b>	3 replikat per prov + negativ kontroll  <b>Total volym per replikat 25 µl:</b> 5 µl DNA-templat 0,5 µl Framåt-primern 0,5 µl Bakåt-primern 12,5 µl Q5 High-Fidelity Master Mix X2 6,5 µl PCR-vatten (molekylär grad)	
<b>Termocyklerprogram</b>	Initiering 98 °C i 30 sek  <b>15 denatureringscykler:</b> 98 °C, 10 sek Hybridisering, 50 °C i 30 sek Elongering vid 72 °C 30 sek  10 min avslutande vid 72 °C	
<b>Gelelektrofores</b>		
<b>TASP-rengöring</b>	Replikat från PCR-1 0,1 ml Exonukleas I 0,2 ml Alkaliskt fosfatas 15 minuters inkubering i 37 °C 15 minuters inkubering i 74 °C	
<b>PCR 2. Indexering</b>		
<b>Indexeringsprimers</b>	Nextera XT indexprimers Unikt indexerings-primerpar används för varje prov	
<b>Föreberedelse av replikat</b>	3 replikat per prov + negativ kontroll  <b>Total volym per replikat 25 µl:</b> 5 µl Renad PCR-produkt från PCR-1 0,5 µl (indexerings) Framåt-primer 0,5 µl (indexerings) Bakåt-primer 12,5 µl Q5 High-Fidelity Master Mix X2 6,5 µl PCR-vatten (molekylär grad)	
<b>Termocyklerprogram</b>	Initiering 95°C i 3 min  <b>15 denatureringscykler:</b> 95 °C, 30 sek, Hybridisering, 55 °C i 30 sek Elongering, 72 °C 30 sek  10 min avslutande vid 72°C.	
<b>Gelelektrofores</b>		
<b>Renande av PCR-produkt</b>	Med Agencourt AMPure XP Replikat sammanförs	
<b>Kvantifiering av DNA</b>	Qubit (Samt nanodrop som stöd)	
<b>Sammanförande av slutgiltigt streckkodningsbibliotek med en enhetlig molär mängd DNA från samtliga prover</b>		
<b>Sekvensering med Illumina MiSeq</b>		

Tabell 10. Biblioteksförberedelser DNA-streckkodning av makrofauna i Arbetpaket 2.

Steg	Specifikation	Kommentar/referens
<b>PCR 1. Markörgens-amplifiering</b>		
Primerpar	<b>Framåt-primern:</b> mlCOLintF_Rnd1  <b>Bakåt-primern:</b> mlCOLintR_Rnd1	(Leray m.fl., 2013).
Föreberedelse av replikat	3 replikat per prov + negativ kontroll  <b>Total volym per replikat 25 µl:</b> 5 µl DNA-templat 1 µl Framåt-primern 1 µl Bakåt-primern 12,5 µl AmpliTaq gold/ Q5 high fidelity X2 master mix 5,5 µl PCR-vatten (molekylär grad)	
Termocyklerprogram	Initiering 95° C i 2 min  <b>25 denatureringscykler:</b> 95° C 1 min Hybridisering, 48° C i 45 sec Elongering vid 72 °C 1 min 5 min avslutande vid 72 °C	
<b>Gelelektrofores</b>		
TASP-rengöring	Replikat från PCR-1 0,1 ml Exonukleas I 0,7 molecular water 0,2 ml Alkaliskt fosfatas 15 minuters inkubering i 37 °C 15 minuters inkubering i 74 °C	
<b>PCR 2. Indexering</b>		
Indexeringsprimers	Nextera XT indexprimers Unikt indexerings-primerpar används för varje prov	
Föreberedelse av replikat	3 replikat per prov + negativ kontroll  <b>Total volym per replikat 25 µl:</b> 5 µl Renad PCR-produkt från PCR-1 0,5 µl (indexerings) Framåt-primer 0,5 µl (indexerings) Bakåt-primer 12,5 µl Q5 High-Fidelity Master Mix X2 6,5 µl PCR-vatten (molekylär grad)	
Termocyklerprogram	Initiering 95°C i 3 min  <b>8 denatureringscykler:</b> 95 °C, 30 sek, Hybridisering, 55 °C i 30 sek Elongering ,72 °C 30 sek  5 min avslutande vid 72°C.	
<b>Gelelektrofores</b>		
Renande av PCR-produkt	Med Agencourt AMPure XP Replikat sammanförs	
Kvantifiering av DNA	Qubit (Samt nanodrop som stöd)	
<b>Sammanförande av slutgiltigt streckkodningsbibliotek Med en enhetlig molar mängd DNA från samtliga prover</b>		
<b>Gel-extraktion av bibliotek</b>		
<b>Sekvensering med Illumina MIseq</b>		



# Bilaga 2. Tabell över upp- laddade referenssekvenser

Tabell 11. Uppladdade referenssekvenser samt familj och artnamn, bifogat *Accession number* är till databasen NCBI GenBank.

Art	18S rRNA	D2D3
<b>Axonolaimidae (familj)</b>		
<i>Ascolaimus elongatus</i>	OR590892	-
<i>Ascolaimus elongatus</i>	OR590893	-
<i>Ascolaimus elongatus</i>	OR590894	-
<i>Axonolaimus spinosus</i>	OR590895	OR589643
<i>Axonolaimus spinosus</i>	OR590896	OR589644
<i>Odontophora setosa</i>	OR590897	OR589645
<i>Odontophora villoti</i>	OR590898	OR589646
<i>Odontophora villoti</i>	OR590899	OR589647
<i>Odontophora villoti</i>	OR590900	OR589648
<b>Camacolaimidae (familj)</b>		
<i>Alaimella cincta</i>	OR590901	-
<i>Alaimella cincta</i>	OR590902	-
<i>Dagda bipapillata</i>	OR590903	OR589649
<i>Deontolaimus sp indet</i>	OR590904	OR589650
<i>Loveninema tubulosa</i>	OR590905	OR589651
<i>Neocamacolaimus parasiticus</i>	MW078532	OR589652
<i>Neocamacolaimus parasiticus</i>	MW078531	OR589653
<i>Stephanolaimus elegans</i>	MW078530	OR589654
<i>Stephanolaimus elegans</i>	OR590906	OR589655
<i>Stephanolaimus elegans</i>	OR590907	OR589656
<i>Stephanolaimus elegans</i>	OR590908	OR589657
<b>Ceramonematidae (familj)</b>		
<i>Dasynemoides sp</i>	OL671195/OR590909	-
<i>Metadasynemella cassidiniensis</i>	OL388471	-
<b>Chromadoridae (familj)</b>		
<i>Euchromadora striata</i>	OR590924	-
<i>Euchromadora striata</i>	OR590925	-
<i>Euchromadora striata</i>	OR590926	-
<i>Euchromadora striata</i>	OR590927	-
<i>Euchromadora striata</i>	OR590928	-
<i>Actinonema pachydermatum</i>	OR590910	-
<i>Actinonema pachydermatum</i>	OR590911	-
<i>Ptycholaimellus sp.</i>	OR590942	-
<i>Ptycholaimellus ponticus</i>	OR590938	-
<i>Ptycholaimellus ponticus</i>	OR590941	-
<i>Ptycholaimellus ponticus</i>	OR590939	-
<i>Ptycholaimellus ponticus</i>	OR590940	-
<i>Neochromadora sp1</i>	OR590931	-
<i>Neochromadora sp1</i>	OR590932	-
<i>Neochromadora sp2</i>	OR590933	-
<i>Dichromadora cucullata</i>	OR590920	-

Art	18S rRNA	D2D3
<i>Dichromadora cucullata</i>	OR590921	-
<i>Dichromadora cucullata</i>	OR590922	-
<i>Chromadoridae sp3</i>	OR590913	-
<i>Denticulella sp.</i>	OR590916	-
<i>Denticulella sp.</i>	OR590919	-
<i>Denticulella sp.</i>	OR590918	-
<i>Denticulella sp.</i>	OR590917	-
<i>Innocuonema tentabunda</i>	OR590929	-
<i>Innocuonema tentabunda</i>	OR590930	-
<i>Prochromadorella obtusidens</i>	OR590937	-
<i>Prochromadorella obtusidens</i>	OR590934	-
<i>Prochromadorella obtusidens</i>	OR590935	-
<i>Prochromadorella obtusidens</i>	OR590936	-
<i>Chromadorella filiformis</i>	OR590912	-
<i>Chromadorita sp.</i>	OR590914	-
<i>Chromadorita sp.</i>	OR590915	-
<i>Dichromadora sp.</i>	OR590923	-
<b>Comesomatidae (familj)</b>		
<i>Sabatieria pulchra</i>	OR714840	OR711233
<i>Sabatieria pulchra</i>	OR714841	OR711234
<i>Sabatieria pulchra</i>	OR714842	OR711235
<i>Sabatieria punctata</i>	OR714843	OR711236
<i>Sabatieria sp.</i>	OR714844	OR711237
<i>Sabatieria sp.</i>	OR714845	OR711238
<i>Sabatieria sp.</i>	OR714846	-
<i>Sabatieria celtica</i>	OR714837	-
<i>Sabatieria celtica</i>	OR714838	-
<i>Sabatieria celtica</i>	OR714839	-
<i>SetoSabatieria hilarula</i>	OR714847	OR711239
<i>SetoSabatieria hilarula</i>	OR714848	OR711240
<i>SetoSabatieria hilarula</i>	OR714849	-
<i>SetoSabatieria hilarula</i>	OR714850	-
<i>SetoSabatieria hilarula</i>	OR714851	-
<b>Cyartonematidae (familj)</b>		
<i>Cyartonema zosterae</i>	OL388474	-
<i>Cyartonema zosterae</i>	OR590943	OR589658
<i>Cyartonema zosterae</i>	OL388472	-
<i>Cyartonema zosterae</i>	OL388473	-
<b>Cyatholaimidae (familj)</b>		
<i>Paracanthonchus longus</i>	OR714860	-
<i>Paracanthonchus longus</i>	OR714861	-
<i>Paracyatholaimoides sp.</i>	OR714867	-
<i>Paracyatholaimoides sp.</i>	OR714868	-
<i>Praeacanthonchus punctatus</i>	OR714869	-
<i>Praeacanthonchus punctatus</i>	OR714871	-
<i>Praeacanthonchus punctatus</i>	OR714873	-
<i>Praeacanthonchus punctatus</i>	OR714870	-
<i>Praeacanthonchus punctatus</i>	OR714872	-
<i>Praeacanthonchus punctatus</i>	OR714874	-
<i>Paracanthonchus sp.</i>	OR714866	-

Art	18S rRNA	D2D3
<i>Paracanthochus longicaudatus</i>	OR714858	OR711241
<i>Paracanthochus longicaudatus</i>	OR714859	OR711242
<i>Paracanthochus caecus sensu lato</i>	OR714856	-
<i>Paracanthochus caecus sensu lato</i>	OR714857	-
<i>Paracanthochus caecus sensu lato</i>	OR714855	-
<i>Paracanthochus sp "Askö"</i>	OR714862	-
<i>Paracanthochus sp "Askö"</i>	OR714865	-
<i>Paracanthochus sp "Askö"</i>	OR714863	-
<i>Paracanthochus sp "Askö"</i>	OR714864	-
<i>Paracanthochus bothnicus</i>	OR714852	-
<i>Paracanthochus bothnicus</i>	OR714853	-
<i>Paracanthochus bothnicus</i>	OR714854	-
<b>Desmodoridae (familj)</b>		
<i>Chromadoropsis vivipara</i>	MT846144	OR589661
<i>Chromadoropsis vivipara</i>	OR590945	OR589660
<i>Chromadoropsis vivipara</i>	MT846145	OR589662
<i>Chromadoropsis vivipara</i>	OR590946	-
<i>Chromaspirina parapontica</i>	MT846146	OR589663
<i>Chromaspirina parapontica</i>	MT846147	OR589664
<i>Chromaspirina parapontica</i>	MT846148	OR589665
<i>Chromaspirina parapontica</i>	MT846149	OR589666
<i>Desmodora communis sensu Platt &amp; Warwick</i>	OR590947	-
<i>Desmodora communis sensu Platt &amp; Warwick</i>	OR590948	-
<i>Desmodora communis sensu Platt &amp; Warwick</i>	MW078525	OR589667
<i>Desmodora pontica</i>	-	OR589668
<i>Desmodora pontica</i>	OR590949	-
<i>Desmodora pontica</i>	MT846155	OR589669
<i>Desmodora pontica</i>	MT846151	OR589670
<i>Desmodora pontica</i>	MT846152	OR589671
<i>Desmodora pontica</i>	MT846153	OR589672
<i>Desmodora pontica</i>	MT846154	OR589673
<i>Desmodorella tenuispiculum</i>	MW078515	OR589674
<i>Desmodorella tenuispiculum</i>	MW078514	OR589675
<i>Desmodorella schulzi</i>	MT846156	-
<i>Desmodorella schulzi</i>	MT846157	-
<i>Desmodorella schulzi</i>	MT846158	-
<i>Desmodorella schulzi</i>	MT846159	-
<i>Leptonemella cf vicina</i>	MW078513	OR589676
<i>Chromaspirina pellita</i>	OR590950	OR589677
<i>Bradyaimus suecicus</i>	OR590944	-
<i>Bradyaimus suecicus</i>	MW078526	OR589659
<i>Spirinia parasitifera</i>	MW078516	OR589678
<i>Spirinia parasitifera</i>	MW078517	OR589679
<i>Spirinia parasitifera</i>	MW078518	OR589680
<i>Spirinia parasitifera</i>	-	OR589681
<i>Spirinia parasitifera</i>	MW078520	OR589681
<i>Spirinia parasitifera</i>	MW078521	OR589683
<i>Spirinia parasitifera</i>	MW078522	OR589684
<i>Spirinia parasitifera</i>	MW078523	OR589685
<i>Spirinia parasitifera</i>	MW078524	OR589686

Art	18S rRNA	D2D3
<b>Diplopeltidae (familj)</b>		
<i>Araeolaimus elegans</i>	OL388448	-
<i>Araeolaimus sp.</i>	OR590951	-
<i>Araeolaimus sp.</i>	OL388449	OR589642
<i>Campylaimus longispiculus</i>	OL388453	-
<i>Campylaimus orientalis</i>	OL388452	-
<i>Campylaimus sp indet</i>	OL388454	OR589689
<i>Diplopeltis cirrhatus</i>	MW078528	OR589690
<i>Diplopeltis cirrhatus</i>	OR590952	-
<i>Neodiplopeltula barentsi</i>	OL388451	-
<i>Neodiplopeltula barentsi</i>	OR590953	-
<i>Neodiplopeltula incisa</i>	OR590959	OR589691
<i>Neodiplopeltula incisa</i>	MW078527	OR589692
<i>Neodiplopeltula incisa</i>	OR590954	-
<i>Neodiplopeltula incisa</i>	OR590955	-
<i>Southerniella sp indet</i>	OL388447/OR590956	-
<b>Diplopeltooidae (familj)</b>		
<i>Diplopeltooides asetosus</i>	OR590957	OR589687
<i>Diplopeltooides pumilus</i>	OL388457	OR589688
<i>Diplopeltooides suecicus</i>	OR590958	-
<i>Diplopeltooides suecicus</i>	OL388458	-
<b>Draconematidae (familj)</b>		
<i>Draconema cephalatum</i>	OR590960	OR589693
<i>Draconema sp.</i>	-	OR589694
<b>Enchelidiidae (familj)</b>		
<i>Belbolla longispiculata</i>	OR590961	-
<b>Epsilonematidae (familj)</b>		
<i>Perepsilonema corsicum</i>	-	OR589695
<i>Perepsilonema corsicum</i>	OL388475	OR589696
<i>Perepsilonema corsicum</i>	OR590963	OR589699
<i>Perepsilonema corsicum</i>	OR590962	OR589697
<i>Perepsilonema corsicum</i>	OL388476	OR589698
<i>Perepsilonema corsicum</i>	OR590964	OR589700
<i>Perepsilonema corsicum</i>	OR590965	OR589701
<b>Leptolaimidae (familj)</b>		
<i>Anomonema haplostoma</i>	MW078529	OR589704
<i>Anomonema "nasobema" spn</i>	-	OR589702
<i>Anomonema "nasobema" spn</i>	OL388444	OR589703
<i>Leptolaimus papilliger</i>	OR590973	-
<i>Leptolaimus septempapillatus</i>	OR590975	OR589711
<i>Leptolaimus elegans</i>	OR590966	-
<i>Leptolaimus elegans</i>	OR590967	OR589705
<i>Leptolaimus elegans</i>	OR590968	OR589706
<i>Leptolaimus elegans</i>	OR590970	OR589708
<i>Leptolaimus elegans</i>	OR590971	OR589709
<i>Leptolaimus macer</i>	OR590972	OR589710
<i>Leptolaimus donsi</i>	OL388445	-
<i>Leptolaimus pellucidus</i>	OL388446	-
<i>Leptolaimus pellucidus</i>	OR590974	-

Art	18S rRNA	D2D3
<b>Linhomoeidae (familj)</b>		
<i>Desmolaimus zeelandicus</i>	OL388464	OR589717
<i>Desmolaimus zeelandicus</i>	OR590980	OR589716
<i>Desmolaimus zeelandicus</i>	OR590981	OR589718
<i>Desmolaimus bulbulus</i>	OR590978	OR589714
<i>Desmolaimus bulbulus</i>	OR590979	-
<i>Desmolaimus bulbulus</i>	OL388463	OR589715
<i>Eleutherolaimus schneideri</i>	OL388467	-
<i>Eleutherolaimus schneideri</i>	OR590982	-
<i>Eleutherolaimus schneideri</i>	OL388468	-
<i>Anticyathus primitivus</i>	OR590976	OR589712
<i>Anticyathus primitivus</i>	OR590977	OR589713
<i>Linhomoeus</i> sp.	OR590983	-
<i>Linhomoeus</i> sp.	OR590984	-
<i>Linhomoeus</i> sp.	OR590985	-
<i>Terschellingia longicaudata</i>	OL388465	-
<i>Terschellingia longicaudata</i>	OR590987	-
<i>Terschellingia longicaudata</i>	OR590988	OR589719
<i>Terschellingia longicaudata</i>	OL388466	OR589720
<i>Terschellingia lissa</i>	OR590986	-
<b>Microlaimidae (familj)</b>		
<i>Ixonema powelli</i>	MW078512	OR589721
<i>Ixonema powelli</i>	OL388482	OR589722
<i>Microlaimus robustidens</i>	OL388480	OR589723
<i>Microlaimus robustidens</i>	OL388479	OR589724
<i>Microlaimus robustidens</i>	OR590989	OR589725
<i>Microlaimus robustidens</i>	OL388481	OR589726
<i>PseudoMicrolaimus dentatus</i>	OR590990	-
<b>Monoposthiidae (familj)</b>		
<i>Monoposthia costata</i>	MW078507	OR589727
<i>Monoposthia costata</i>	MW078505	OR589728
<i>Monoposthia costata</i>	MW078511	OR589729
<i>Monoposthia costata</i>	MW078508	OR589730
<i>Monoposthia costata</i>	MW078509	OR589731
<i>Monoposthia costata</i>	MW078506	OR589732
<i>Monoposthia costata</i>	MW078510	OR589733
<i>Monoposthia costata</i>	MT846160	OR589734
<i>Monoposthia mirabilis</i>	MW078504	OR589735
<i>Monoposthia mirabilis</i>	MT846161	OR589736
<b>Anoplostomatidae (familj)</b>		
<i>Anoplostoma viviparum</i>	OR590891	OR589641
<b>Oncholaimidae (familj)</b>		
<i>Oncholaimus brachycercus</i>	OR590991	OR589737
<i>Oncholaimus brachycercus</i>	OR590992	OR589738
<i>Oncholaimus brachycercus</i>	OR590993	OR589739
<b>Oxystominidae (familj)</b>		
<i>Oxystomina elongata</i>	OL388491	OR589740
<i>Oxystomina</i> sp (indet)	OL388492	OR589741

Art	18S rRNA	D2D3
<b>Pandolaimidae (familj)</b>		
<i>Pandolaimus latilaimus</i>	OL388487	-
<i>Pandolaimus latilaimus</i>	OL388486	-
<i>Pandolaimus latilaimus</i>	OL388488	-
<b>Rhabdodemaniidae (familj)</b>		
<i>Rhabdodemanina sp.</i>	OL388484	OR589742
<i>Rhabdodemanina sp.</i>	OL388485	-
<b>Richtersiidae (familj)</b>		
<i>Richtersia sp.</i>	OL388477	OR589743
<i>Richtersia sp.</i>	OL388478	OR589744
<b>Selachinematidae (familj)</b>		
<i>Choniolaimus panicus</i>	OR590994	OR589745
<i>Choniolaimus papillatus</i>	MN786721	MN786742
<i>Choniolaimus papillatus</i>	-	MN786743
<i>Choniolaimus papillatus</i>	-	MN786744
<i>Choniolaimus papillatus</i>	MN786722	MN786745
<i>Choniolaimus papillatus</i>	OR590995	-
<i>Cobbionema cylindrolaimoides</i>	OR590997	-
<i>Cobbionema acuminata</i>	OR590996	-
<i>Cobbionema acuminata</i>	MN786723	MN786746
<i>Gammanema rapax</i>	MN786725	MN786749
<i>Gammanema rapax</i>	MN786726	MN786750
<i>Gammanema rapax</i>	MN786727	MN786751
<i>Gammanema rapax</i>	MN786728	MN786752
<i>Gammanema rapax</i>	MN786730	MN786754
<i>Gammanema rapax</i>	MN786732	MN786756
<i>Gammanema rapax sensu Platt &amp; Warwick</i>	MN786729	MN786753
<i>Gammanema rapax sensu Platt &amp; Warwick</i>	MN786731	MN786755
<i>Halichoanolaimus sp.</i>	-	OR589746
<i>Halichoanolaimus dolichurus</i>	MN786733	MN786757
<i>Halichoanolaimus dolichurus</i>	MN786734	MN786758
<i>Halichoanolaimus dolichurus</i>	MN786735	MN786759
<i>Halichoanolaimus dolichurus</i>	MN786736	MN786760
<i>Halichoanolaimus norvegicus</i>	MN786738	MN786763
<i>Halichoanolaimus norvegicus</i>	-	MN786761
<i>Halichoanolaimus norvegicus</i>	MN786737	MN786762
<i>Halichoanolaimus norvegicus</i>	OR590998	-
<i>Latronema dyngi</i>	MN786739	MN786764
<i>Latronema dyngi</i>	MN786740	MN786765
<i>Latronema dyngi</i>	MN786741	MN786766
<b>Siphonolaimidae (familj)</b>		
<i>Siphonolaimus sp1</i>	OL388469	-
<i>Siphonolaimus sp2</i>	OR590999	-
<i>Siphonolaimus sp2</i>	OL388470	-
<b>Sphaerolaimidae (familj)</b>		
<i>Sphaerolaimus macrocirculus</i>	OL388460	OR589752
<i>Sphaerolaimus macrocirculus</i>	OR591003	-
<i>Sphaerolaimus macrocirculus</i>	OR591004	-

Art	18S rRNA	D2D3
<i>Sphaerolaimus macrocirculus</i>	OR591005	OR589753
<i>Sphaerolaimus macrocirculus</i>	OL388459	OR589754
<i>Sphaerolaimus macrocirculus</i>	OR591006	OR589755
<i>Sphaerolaimus balticus</i>	OL388461	OR589747
<i>Sphaerolaimus balticus</i>	OR591000/OR591001	OR589748
<i>Sphaerolaimus balticus</i>	-	OR589749
<i>Sphaerolaimus balticus</i>	OR591002	OR589750
<i>Sphaerolaimus balticus</i>	OR591007	OR589751
<b>Tubolaimoididae (familj)</b>		
<i>Tubolaimoides tenuicaudatus</i>	OR591008/OR591009	-
<i>Tubolaimoides tenuicaudatus</i>	OL388455	-
<i>Tubolaimoides tenuicaudatus</i>	OL388456	-
<i>Tubolaimoides tenuicaudatus</i>	-	OR589756
<i>Tubolaimoides tenuicaudatus</i>	OR591010	-
<b>Xenellidae (familj)</b>		
<i>Xennella suecica</i>	OL388490	-
<i>Xennella suecica</i>	OL388489	-
<b>Xyalidae (familj)</b>		
<i>Theristus bastiani</i>	OL388462	OR589762
<i>Theristus bastiani</i>	OR591024	OR589763
<i>Theristus sp.</i>	OR591025	-
<i>Daptonema sp2.</i>	OR591021/OR591022	-
<i>Daptonema svalbardense</i>	OR591023	-
<i>Daptonema procerum</i>	OR591013	OR589757
<i>Daptonema procerum</i>	OR591014	OR589758
<i>Daptonema procerum</i>	OR591015	OR589759
<i>Daptonema hirsutum</i>	OR591011	-
<i>Daptonema hirsutum</i>	OR591012	-
<i>Daptonema setosum genotype A</i>	OR591016	-
<i>Daptonema setosum genotype A</i>	OR591017	-
<i>Daptonema setosum genotype B</i>	OR591018	OR589760
<i>Daptonema setosum genotype B</i>	OR591019	-
<i>Daptonema setosum genotype B</i>	OR591020	OR589761

# Bilaga 3. Arbetspaket 2.

## Kompletterande resultat

Tabell 12. Korrelationer mellan makrofaunataxas relativa abundans mellan olika metoder. Varje taxas relativa abundans i en metod korreleras alltså mot dess relativa abundans i samtliga andra metoder. Q5 står för Q5 High-fidelity, Amp för AmpliTaq. Värden är korrelationskoefficienten R för Pearsons korrelationstest med p värde under.

Taxa	Abundans		Biomassa		Abundans	Q5
	Q5	Amp	Q5	Amp	Biomassa	AMP
<i>Bylgides sarsi</i>	0,49 0,027	0,52 0,018	0,28 0,233	0,21 0,380	0,65 0,002	0,9 <0,001
<i>Chironomidae</i>	0,93 <0,001	0,94 <0,001	0,46 0,043	0,47 0,036	0,71 <0,001	1 <0,001
<i>Corophium volutator</i>	0,96 <0,001	0,96 <0,001	1 <0,001	1 <0,001	0,96 <0,001	1 <0,001
<i>Halicryptus spinulosus</i>	0,42 0,067	0,36 0,114	0,61 0,005	0,5 0,024	0,55 0,012	0,86 <0,001
<i>Hediste diversicolor</i>	0,82 <0,001	0,83 <0,001	1 <0,001	1 <0,001	0,81 <0,001	1 <0,001
<i>Hydrobiidae</i>	1 <0,001	1 <0,001	1 <0,001	1 <0,001	1 <0,001	1 <0,001
<i>Jaera albifrons</i>	1 <0,001	-	1 <0,001	-	1 <0,001	-
<i>Macoma balthica</i>	0,16 0,489	0,34 0,145	0,4 0,080	0,62 0,004	0,58 0,007	0,91 <0,001
<i>Marenzelleria spp</i>	0,26 0,264	0,23 0,331	0,55 0,012	0,83 <0,001	0,4 0,081	0,81 <0,001
<i>Monoporeia affinis</i>	0,51 0,023	0,45 0,047	0,64 0,002	0,56 0,011	0,67 0,001	0,93 <0,001
<i>Mya arenaria</i>	0,48 0,034	0,47 0,036	0,48 0,034	0,47 0,036	1 <0,001	1 <0,001
<i>Mytilus edulis</i>	0,72 <0,001	0,6 0,005	0,83 <0,001	0,75 <0,001	0,96 <0,001	0,93 <0,001
<i>Nemertea</i>	0,93 <0,001	0,9 <0,001	0,86 <0,001	0,88 <0,001	0,65 0,0021	0,96 <0,001
<i>Oligochaeta</i>	0,47 0,036	0,52 0,019	0,48 0,032	0,39 0,087	0,92 <0,001	0,94 <0,001
<i>Pontoporeia femorata</i>	0,87 <0,001	0,88 <0,001	0,83 <0,001	0,56 0,010	0,77 <0,001	0,89 <0,001
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	-	-0,05 0,826	-	-0,05 0,826	1 <0,001	-
<i>Pygospio elegans</i>	0,01 0,975	-0,08 0,736	0,15 0,522	-0,08 0,733	0,86 <0,001	0,73 <0,001



**Tabell 13. Parade t-test för jämförelse av medelvärdet i BQI, känslighetsfaktorn och artantal mellan metoderna. Q5 står för Q5 High-fidelity, Amp för AmpliTag, Ind. för antal individer, Bio. för biomassa. Värdet är p-värde för jämförelsen, korrigerat med Holms metod för multipla jämförelser. Signifikans indikerat med stjärnor.**

Parat t-test Variabel	Antal Individer		Biomassa		Ind.	Q5
	Q5	Amp	Q5	Amp	Bio.	AMP
BQI	0,136	0,034*	<0,001***	<0,001***	<0,001***	0,001**
Känslighetsfaktor	<0,001***	<0,001***	0,051	0,449	<0,001***	0,051
Artantal (klassade)	<0,001***	<0,001***	-	-	-	<0,001***

**Tabell 14. Korrelationer mellan BQI, känslighetsfaktorn och artantal mellan metoderna. Q5 står för Q5 High-fidelity, Amp för AmpliTag, Ind. för antal individer, Bio. för biomassa. Värderna är korrelationskoefficienten R för Pearsons korrelationstest, signifikans markerat med stjärnor, p-värde inom parentes.**

Pearson Variabel	Antal Individer		Biomassa		Ind.	Q5
	Q5	Amp	Q5	Amp	Bio.	AMP
BQI	0,41 (0,072)	0,37 (0,112)	0,73** (<0,001)	0,60*** (0,005)	0,60** (0,006)	0,78*** (<0,001)
Känslighetsfaktor	0,40 (0,078)	0,38 (0,096)	0,52* (0,020)	0,41 (0,074)	0,74 (<0,001)	0,79*** (<0,001)
Artantal (klassade)	0,76*** (<0,001)	0,73*** (<0,001)	-	-	-	0,81*** (<0,001)
Artantal (Samtliga ASV bestämda till art)	0,70** (0,001)	0,68** (0,001)	-	-	-	0,74*** (<0,001)

**Tabell 15. Taxa som bidrog signifikant till skillnader mellan metoderna (SIMPER-test)**

Jämförelse	Taxa	Medelvärde		p-värde
		A	B	
A. Antal individer	<i>Monoporeia affinis</i>	20 %	3 %	0,001
B. Amplitaq	<i>Pontoporeia femorata</i>	11 %	0 %	0,001
A. Antal individer	<i>Marenzelleria spp</i>	4 %	43 %	0,001
B. Q5 High Fidelity	<i>Monoporeia affinis</i>	20 %	3 %	0,001
	<i>Pontoporeia femorata</i>	11 %	0 %	0,001
	<i>Halicryptus spinulosus</i>	04 %	1 %	0,001
A. Biomassa	<i>Macoma balthica</i>	69 %	37 %	0,001
B. Q5 High Fidelity	<i>Marenzelleria spp</i>	1 %	43 %	0,001
A. Amplitaq	<i>Marenzelleria spp</i>	23 %	43 %	0,021
B. Q5 High Fidelity	<i>Nemertea</i>	2 %	3 %	0,003
A. Antal individer	<i>Macoma balthica</i>	36 %	69 %	0,001
	<i>Mytilus edulis</i>	16 %	22 %	0,003
B. Q5 High Fidelity	<i>Monoporeia affinis</i>	20 %	1 %	0,001
	<i>Pontoporeia femorata</i>	11 %	1 %	0,001

## Bilaga 4. Tabeller sekvens- data från arbetspaket 3

Tabell 16. Sekvensläsningar and släktesantal per havsbassäng från norr till söder.

Havsbassäng	Antal prov	Medelvärde			
		Sekv.läs Meiofauna	Sekv.läs % Nematoder	Släktesantal Meiofauna	Släktesantal Nematoder
01 – Bottenviken	7	101 595	15 %	92	10,7
02 – Norra Kvarken	5	127 416	10 %	79	11,6
03 – Bottenhavet	14	106 457	11 %	63	9,7
04 – Ålands hav	4	77 126	11 %	97	15,0
07 – Norra Gotlandshavet	16	77 937	15 %	65	14,4
08 – Västra Gotlandshavet	100	90 881	17 %	68	15,6
09 – Östra Gotlandshavet	5	86 556	1 %	42	3,8
12 – Bornholms havet och Hanöbukten	15	49 967	48 %	46	15,1
13 – Arkonahavet och Södra Öresund	35	63 512	42 %	76	29,6

Tabell 17. Antal sekvensläsningar som bestämts till specifik taxa per taxonomisk nivå för nematoder baserat på data från 2015 till 2019.

Nivå	Totalt antal läsningar	Procent
Fylum	3 189 893	100 %
Klass	2 977 356	93 %
Ordning	2 977 356	93 %
Familj	2 976 779	93 %
Släkte	2 511 303	79 %

Tabell 18. Antal ASV:s (*Amplicon sequence variants*) som bestämts till specifik taxa per taxonomisk nivå för nematoder baserat på data från 2016 till 2019.

Nivå	Totalt antal ASV	Procent
Fylum	1 170	100 %
Klass	1 131	97 %
Ordning	1 131	97 %
Familj	1 123	96 %
Släkte	938	80 %
Art	337	29 %

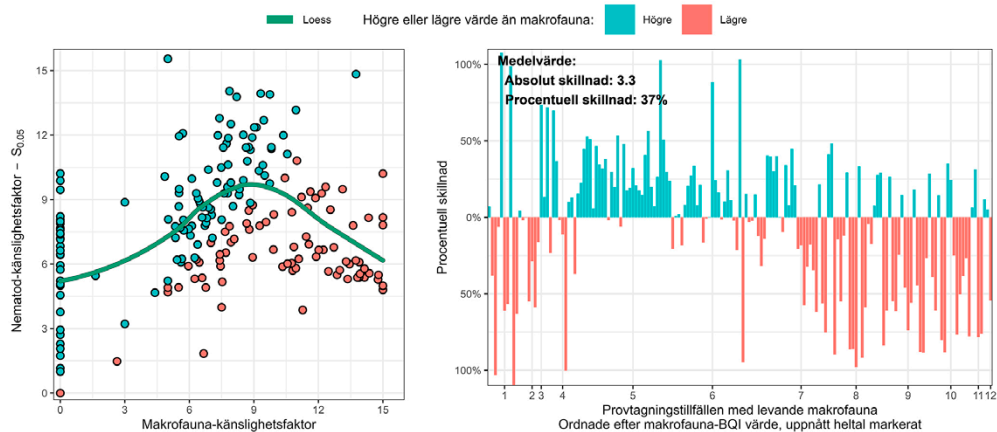
# Bilaga 5. Känslighetsvärden för nematoderna

Tabell 19. Känslighetsvärden för släkten som förekom på minst 20 stationer. Sorterade efter genomsnittlig relativ abundans för alla prov.

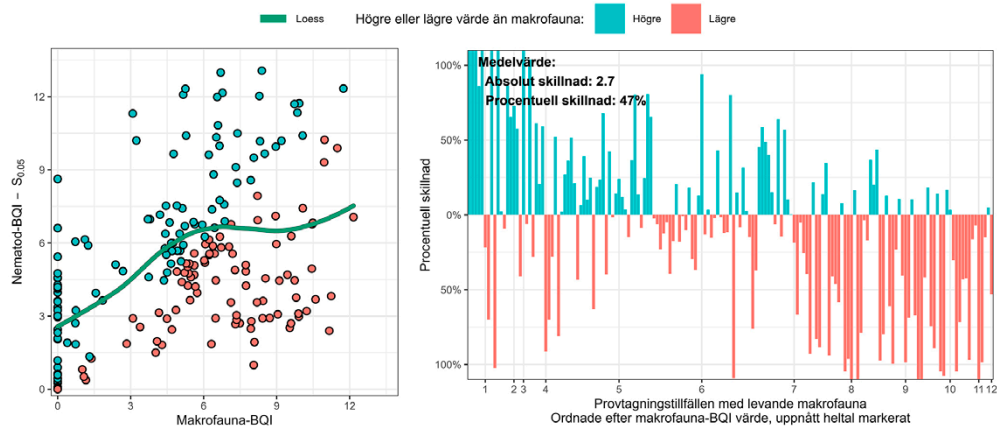
Släkte	Genomsnittlig relativ abundans	Förekomst	BQI-Sens <sub>0,33</sub>	DO <sub>0,05</sub>	S <sub>0,05</sub>
<i>Cyatholaimus</i>	15,89 %	194 (97 %)	9	1	5
<i>Leptolaimus</i>	7,49 %	155 (77 %)	13	18	5
<i>Eleutherolaimus</i>	7,41 %	117 (58 %)	8	2	5
<i>Desmolaimus</i>	7,18 %	145 (72 %)	3	1	1
<i>Sabatieria</i>	6,86 %	157 (78 %)	1	1	9
<i>Daptonema</i>	5,48 %	173 (86 %)	4	4	4
<i>Oncholaimus</i>	5,21 %	101 (50 %)	10	4	14
<i>Axonolaimus</i>	4,71 %	78 (39 %)	9	6	13
<i>Halomonhystera</i>	4,22 %	104 (52 %)	1	1	1
<i>Microlaimus</i>	3,66 %	94 (47 %)	12	17	14
<i>Bathylaimus</i>	3,61 %	91 (45 %)	11	18	6
<i>Molgolaimus</i>	3,28 %	57 (28 %)	1	1	9
<i>Tripyloides</i>	2,36 %	69 (34 %)	11	18	15
<i>Sphaerolaimus</i>	2,12 %	161 (80 %)	11	18	9
<i>Ascolaimus</i>	2,10 %	59 (29 %)	10	16	13
<i>Bathyeurystomina</i>	1,75 %	48 (24 %)	13	17	9
<i>Metalinhomoeus</i>	1,70 %	36 (18 %)	10	2	11
<i>CaloMicrolaimus</i>	1,51 %	107 (53 %)	12	4	10
<i>Campylaimus</i>	1,32 %	148 (74 %)	11	18	11
<i>Oxystomina</i>	1,21 %	66 (33 %)	10	18	16
<i>Enoplolaimus</i>	1,14 %	32 (16 %)	12	21	24
<i>Halalaimus</i>	1,08 %	122 (61 %)	11	19	14
<i>Aphanolaimus</i>	0,90 %	35 (17 %)	10	24	11
<i>Viscosia</i>	0,77 %	53 (26 %)	12	18	16
<i>Adoncholaimus</i>	0,75 %	40 (20 %)	8	25	5
<i>Neochromadora</i>	0,46 %	21 (10 %)	11	32	19
<i>Paracyatholaimus</i>	0,37 %	78 (39 %)	8	20	11
<i>Odontophoroides</i>	0,33 %	33 (16 %)	9	23	13
<i>Desmoscolex</i>	0,32 %	56 (28 %)	16	24	11
<i>Metadesmolaimus</i>	0,28 %	41 (20 %)	10	31	7
<i>Chromadorita</i>	0,27 %	64 (32 %)	9	6	16
<i>Onchium</i>	0,22 %	56 (28 %)	11	18	12
<i>Paraplectonema</i>	0,15 %	25 (12 %)	14	7	8
<i>Tubolaimoides</i>	0,14 %	34 (17 %)	13	18	20
<i>Astomonema</i>	0,13 %	28 (14 %)	2	2	12
<i>Terschellingia</i>	0,09 %	34 (17 %)	13	2	13
<i>Odontophora</i>	0,08 %	29 (14 %)	13	18	25
<i>Choniolaimus</i>	0,07 %	22 (11 %)	13	18	22
<i>Anoplostoma</i>	0,05 %	22 (11 %)	9	20	13
<i>Cyartonema</i>	0,02 %	28 (14 %)	13	18	18
<i>Tripylina</i>	0,01 %	21 (10 %)	11	32	16

# Bilaga 6. Arbetspaket 3.

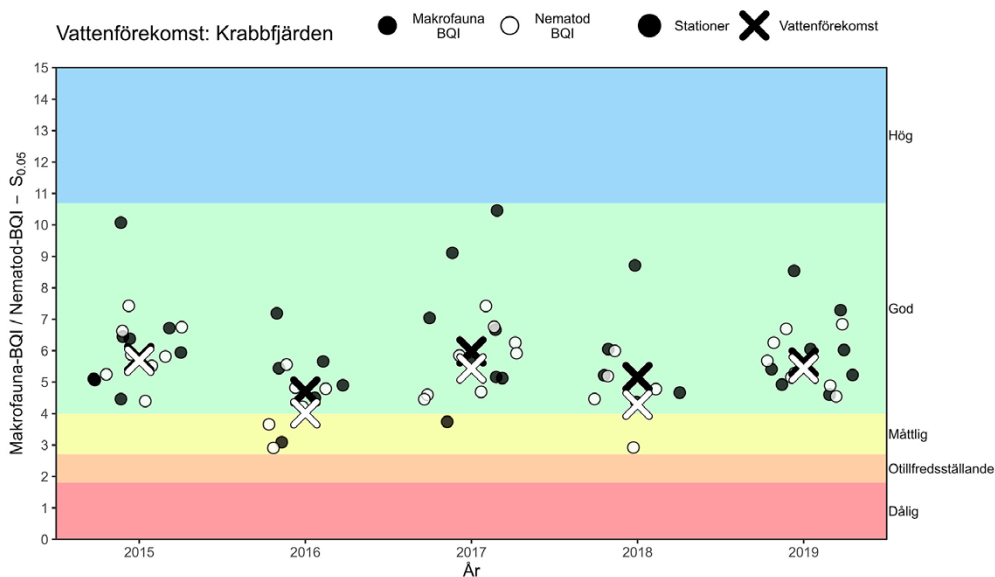
## $S_{0.05}$ kompletterande figurer



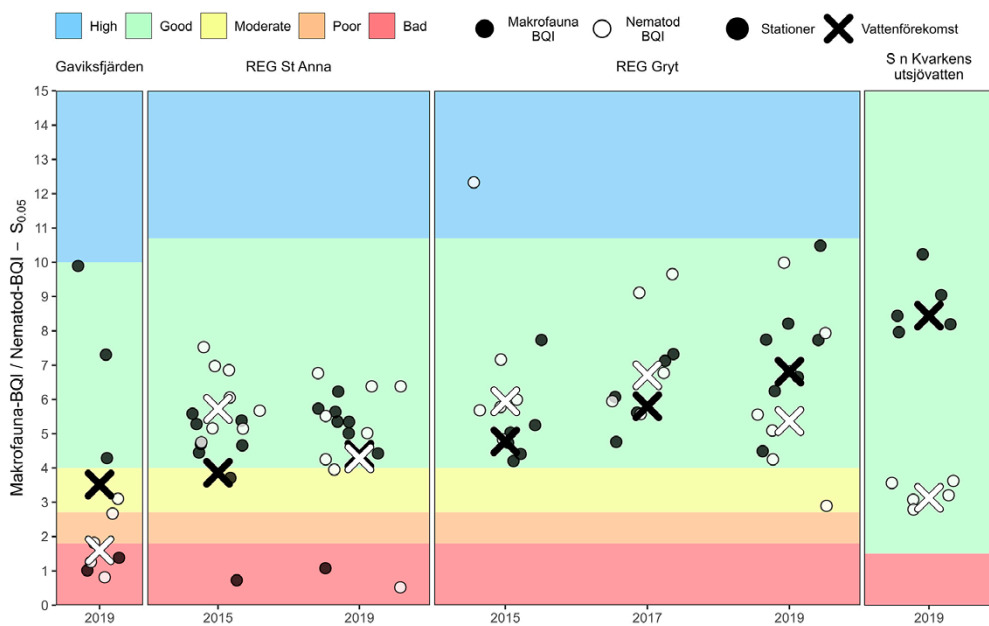
Figur 19. Makrofauna-känslighetfaktor mot nematod-känslighetsfaktor när  $S_{0.05}$  känslighetsvärdena användes. Till vänster är förhållandet mellan de två visualiserat, och till höger ses procentuell skillnad mellan värdena längs gradienten av Makrofauna-BQI (hela indexet) från vänster, lägst BQI, till höger, högst BQI. Procentuell skillnad har räknats som den absoluta skillnaden mellan ett Nematod-BQI värde och ett Makrofauna-BQI värde på stationsnivå, delat med medelvärdet mellan de två värdena.



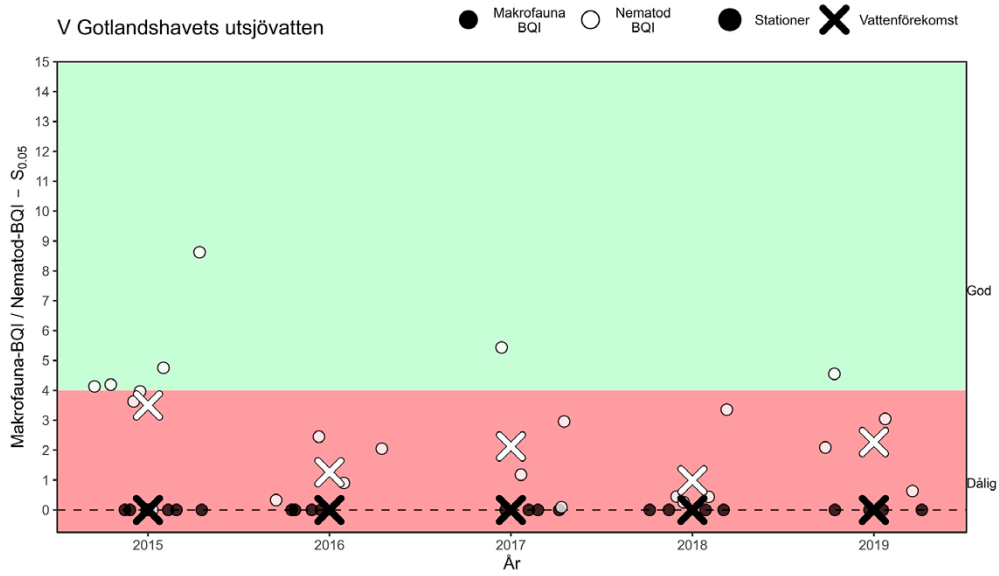
Figur 20. Makrofauna BQI mot Nematod-BQI när  $S_{0.05}$  känslighetsvärdena användes. Till vänster är förhållandet mellan de två visualiserat, och till höger ses procentuell skillnad mellan värdena längs gradienten av Makrofauna-BQI (hela indexet) från vänster, lägst BQI, till höger, högst BQI. Procentuell skillnad har räknats som den absoluta skillnaden mellan ett Nematod-BQI värde och ett Makrofauna-BQI värde på stationsnivå, delat med medelvärdet mellan de två värdena.



Figur 21. År för vattenförekomsten Krabbfjärden. Alla bedömda enligt bedömningsgrunden. Grafen visar stationsvärden och medelvärden (20:e percentilen) för ytvattenförekomsterna.  $S_{0,05}$  användes.



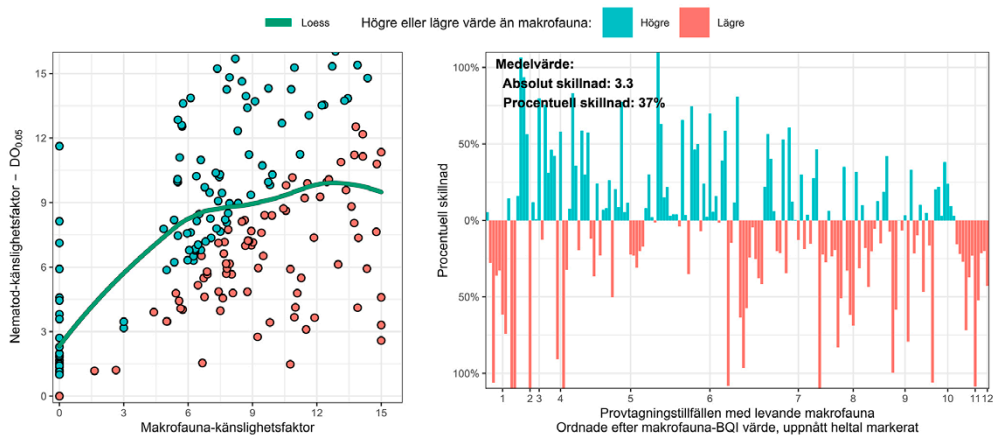
Figur 22. År inom vattenförekomster. Alla bedömda enligt bedömningsgrunden. Grafen visar stationsvärden och medelvärden (20:e percentilen) för ytvattenförekomsterna, med  $S_{0,05}$  värdena.



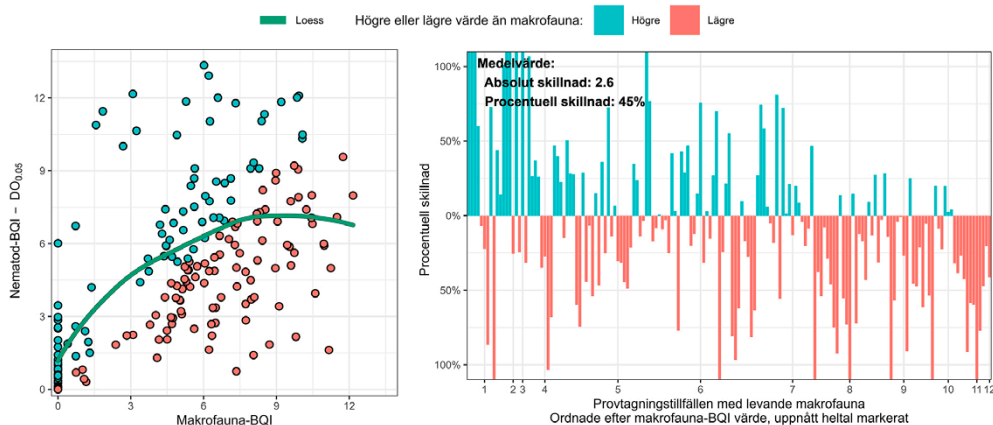
Figur 23. Stationer inom Del av V Gotlandshavets utsjövatten. Det bör noteras att de flesta av dessa utgör dock inte del av nuvarande stationskluster samt ingår inte i bedömningsgrunderna. Grafen visar stationsvärden och medelvärden (20:e percentilen) för ytvattenförekomsten med  $S_{0.05}$  värdena.

# Bilaga 7. Arbetspaket 3.

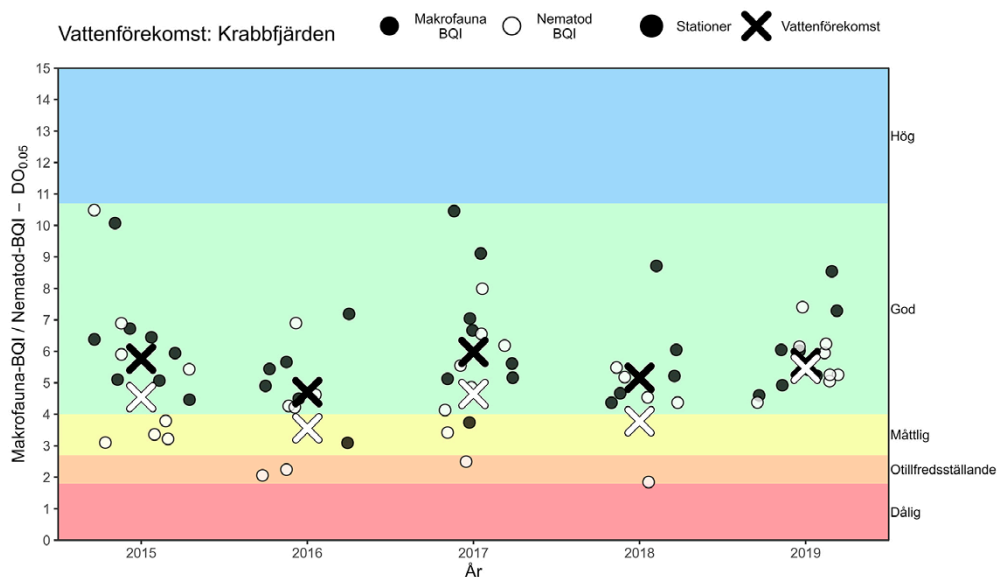
## DO<sub>0.05</sub> kompletterande figurer



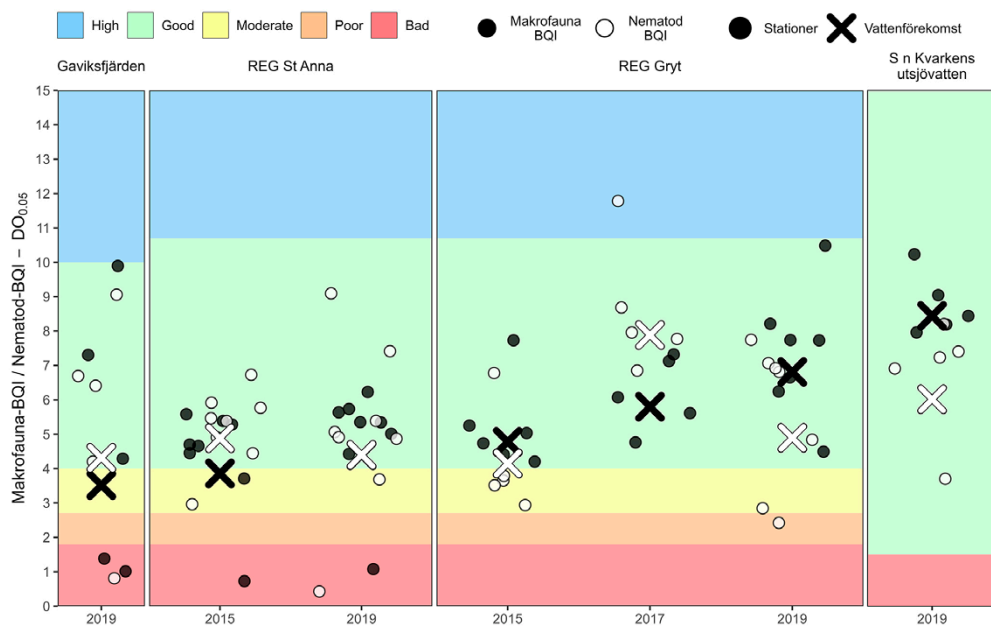
Figur 24. Makrofauna-känslighetfaktor mot nematod-känslighetsfaktor när DO<sub>0.05</sub> känslighetsvärdena användes. Till vänster är förhållandet mellan de två visualiserat, och till höger ses procentuell skillnad mellan värdena längs gradienten av Makrofauna-BQI (hela indexet) från vänster, lägst BQI, till höger, högst BQI. Procentuell skillnad har räknats som den absoluta skillnaden mellan ett Nematod-BQI värde och ett Makrofauna-BQI värde på stationsnivå, delat med medelvärdet mellan de två värdena.



Figur 25. Makrofauna BQI mot Nematod-BQI när DO<sub>0.05</sub> känslighetsvärdena användes. Till vänster är förhållandet mellan de två visualiserat, och till höger ses procentuell skillnad mellan värdena längs gradienten av Makrofauna-BQI (hela indexet) från vänster, lägst BQI, till höger, högst BQI. Procentuell skillnad har räknats som den absoluta skillnaden mellan ett Nematod-BQI värde och ett Makrofauna-BQI värde på stationsnivå, delat med medelvärdet mellan de två värdena.

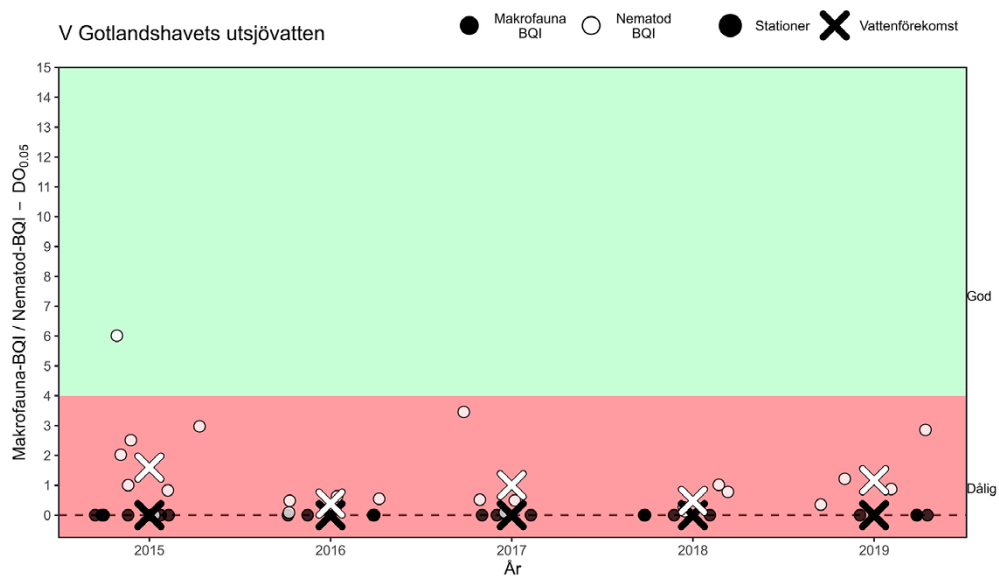


Figur 26. År för vattenförekomsten Krabbfjärden. Alla bedömda enligt bedömningsgrunden. Grafen visar stationsvärden och medelvärden (20:e percentilen) för ytvattenförekomsterna.  $DO_{0.05}$  användes



Figur 27. År inom vattenförekomster. Alla bedömda enligt bedömningsgrunden. Grafen visar stationsvärden och medelvärden (20:e percentilen) för ytvattenförekomsterna.  $DO_{0.05}$  användes.





Figur 28. År och stationer inom Del av V Gotlandshavets utsjövatten. Det bör noteras att de flesta av dessa utgör dock inte del av nuvarande stationskluster samt ingår inte i bedömningsgrunderna. Grafen visar stationsväden och medelvärden (20:e percentilen) för ytvattenförekomsten.

# Bilaga 8. Provtagna stationer

Tabell 20. Lista över provtagna stationer.

\* Stationen "New Nat3A" togs i samband med miljöövervakningen av stationskluster NAT3A och är inte en ordinarie miljöövervakningsstation.

Stationsnamn	Vattenförekomst	Stations kluster	Havsbasäng	Provtagna år	Djup (m)	Temp °C	Salinitet (PSU)	Syremättnad (mg/l)
B 4	Del av Bottenvikens utsjövatten	NAT5	01 – Bottenviken	2019	92	1,3	3,5	9,4
B1-BOTTENVIKEN	Del av Bottenvikens utsjövatten	NAT5	01 – Bottenviken	2019	109	1,0	3,5	9,9
F9/A13	Del av Bottenvikens utsjövatten	NAT5	01 – Bottenviken	2019	124	0,8	3,7	10,1
N 5-2	Del av Bottenvikens utsjövatten	NAT5	01 – Bottenviken	2019	125	0,9	3,7	9,5
AC 3	Skelleftebukten	RK_BOLIDEN	01 – Bottenviken	2019	31	3,9	2,7	10,5
AC 5	Skelleftebukten	RK_BOLIDEN	01 – Bottenviken	2019	27	4,9	2,6	10,3
AC 6	Skelleftebukten	RK_BOLIDEN	01 – Bottenviken	2019	38	3,3	2,8	10,4
NK 10	Del av S n Kvarkens utsjövatten	NAT12B	02 – Norra Kvarken	2019	90	3,3	5,9	6,8
NK 11	Del av S n Kvarkens utsjövatten	NAT12B	02 – Norra Kvarken	2019	88	3,3	5,9	7,0
NK 12	Del av S n Kvarkens utsjövatten	NAT12B	02 – Norra Kvarken	2019	92	3,3	5,9	6,9
NK 8S	Del av S n Kvarkens utsjövatten	NAT12B	02 – Norra Kvarken	2019	78	3,2	5,8	7,2
NK 9S	Del av S n Kvarkens utsjövatten	NAT12B	02 – Norra Kvarken	2019	88	3,3	5,9	6,9
N 2–5	N S M Bottenhavets kustvatten	NAT2A	03 – Bottenhavet	2019	79	2,3	5,1	10,1
N 2–7	N S M Bottenhavets kustvatten	NAT2A	03 – Bottenhavet	2019	72	2,1	5,1	10,0
N 2–8	N S M Bottenhavets kustvatten	NAT2A	03 – Bottenhavet	2019	66	2,1	5,2	10,0
N 2A–1	N S M Bottenhavets kustvatten	NAT2A	03 – Bottenhavet	2019	50	2,7	5,1	8,5
N 3–3	Del av Bottenhavets utsjövatten	NAT3A	03 – Bottenhavet	2019	81	2,4	5,5	7,2
New Nat3A *	Del av Bottenhavets utsjövatten	NAT3A	03 – Bottenhavet	2019	84	2,6	5,5	7,1
N 3–4	N M Bottenhavets kustvatten	NAT3A	03 – Bottenhavet	2019	68	1,9	5,3	9,3
N 3–5	N M Bottenhavets kustvatten	NAT3A	03 – Bottenhavet	2019	68	2,1	5,4	7,8
N 3–7	N M Bottenhavets kustvatten	NAT3A	03 – Bottenhavet	2019	67	2,0	5,3	8,1
G 10	Gaviksfjärden	REG4A	03 – Bottenhavet	2019	52	2,3	5,5	8,1
G 4	Gaviksfjärden	REG4A	03 – Bottenhavet	2019	48	2,2	5,4	7,6
G 7	Gaviksfjärden	REG4A	03 – Bottenhavet	2019	17	2,8	5,2	2,4

NATURVÅRDSVERKET RAPPORT XXXX  
Samförvaltning av älg och skog

Stationsnamn	Vattenförekomst	Stations kluster	Havsbasäng	Provtagna år	Djup (m)	Temp °C	Salinitet (PSU)	Syremättnad (mg/l)
GAVIKSFJÄRDEN-EDSÄTTERFJÄRDEN G 12	Gaviksfjärden	REG4A	03 – Bottenhavet	2019	65	2,5	5,6	6,8
GAVIKSFJÄRDEN-EDSÄTTERFJÄRDEN G 2	Gaviksfjärden	REG4A	03 – Bottenhavet	2019	30	2,0	5,3	7,8
AH 5	Del av N Ålands havs utsjövatten	NAT10	04 – Ålands hav	2019	123	2,8	6,8	10,8
AH 8	Del av N Ålands havs utsjövatten	NAT10	04 – Ålands hav	2019	112	2,8	6,8	8,0
KAS 1	Kasfjärden sek namn	NAT11A	04 – Ålands hav	2019	27	5,3	5,1	9,8
R 1–15	Kasfjärden sek namn	NAT11A	04 – Ålands hav	2019	24	5,1	5,2	8,9
Bjf 1	Björkskärsfjärden	REG Björkskärsfjärden	07 – Norra Gotlandshavet	2016, 2018	40	30,9	8,4	10,7
Bjf 4	Björkskärsfjärden	REG Björkskärsfjärden	07 – Norra Gotlandshavet	2016, 2018	76	4,4	5,4	4,3
Bjf 5	Björkskärsfjärden	REG Björkskärsfjärden	07 – Norra Gotlandshavet	2016, 2018	49	21,9	7,5	8,8
Bjf 8	Björkskärsfjärden	REG Björkskärsfjärden	07 – Norra Gotlandshavet	2016, 2018	58	15,9	6,9	6,9
SV 1 NO LÅNGHOLMEN	Svartlögafjärden	REG Svartlögafjärden	07 – Norra Gotlandshavet	2015, 2017, 2019	24	26,8	8,5	10,9
SV 2 S STORSKÄR	Svartlögafjärden	REG Svartlögafjärden	07 – Norra Gotlandshavet	2015, 2019	40	29,3	8,5	10,6
SV 3 N ANGEDROMMEN	Svartlögafjärden	REG Svartlögafjärden	07 – Norra Gotlandshavet	2015, 2017, 2019	60	16,3	7,0	7,3
6001 KÅFTUDDEN	Krabbfjärden	NAT Askö	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	39	20,1	8,1	9,0
6004 ASENSKALLEN	Krabbfjärden	NAT Askö	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2016, 2017, 2019	44	18,6	9,2	10,4
6006 SV LANDSORT	Krabbfjärden	NAT Askö	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2016, 2017, 2019	60	17,1	7,6	7,8
6010 FURHOLMARN	Krabbfjärden	NAT Askö	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2016, 2017, 2019	21	24,3	9,7	11,4
6020 Y HÅLLSFJÄRDEN	Krabbfjärden	NAT Askö	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	37	14,8	8,2	9,7
6021 Ö GALTEN	Krabbfjärden	NAT Askö	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2017, 2018, 2019	52	13,5	8,4	9,2
6022 LILLBERGET	Krabbfjärden	NAT Askö	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	47	10,8	8,3	9,4
6025 SKVALLRAN	Krabbfjärden	NAT Askö	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2017, 2018, 2019	38	21,3	8,1	9,2
MYS 7	Mysingen	NAT Mysingen	08 – Västra Gotlandshavet	2016, 2018	32	3,9	5,9	6,0
MYS 95	Mysingen	NAT Mysingen	08 – Västra Gotlandshavet	2016, 2018	56	4,0	8,5	10,2

NATURVÅRDSVERKET RAPPORT XXXX  
Samförvaltning av älg och skog

Stationsnamn	Vattenförekomst	Stations kluster	Havsbassäng	Provtagna år	Djup (m)	Temp °C	Salinitet (PSU)	Syremättnad (mg/l)
BY37	Del av V Gotlandshavets utsjövatten	NAT Västervik	08 – Västra Gotlandshavet	2015	71	4,8	4,4	1,5
VAE 17	Del av V Gotlandshavets utsjövatten	NAT Västervik	08 – Västra Gotlandshavet	2015	66	4,5	6,9	6,5
VAE 2	Del av V Gotlandshavets utsjövatten	NAT Västervik	08 – Västra Gotlandshavet	2015	66	4,5	7,2	6,9
GRYT 4	Hesselöfjärden	REG Gryt	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2017, 2019	29	25,4	9,0	10,9
GRYT 5	Hesselöfjärden	REG Gryt	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2017, 2019	32	24,6	9,1	11,0
GRYT 6	Hesselöfjärden	REG Gryt	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2017, 2019	25	25,4	8,9	10,8
GRYT 7	Orren	REG Gryt	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2017, 2019	39	23,7	8,9	10,7
GRYT 8	Orren	REG Gryt	08 – Västra Gotlandshavet	2019	33	60,1	9,1	11,5
BF 34B	Ytteröområdet	REG Gryt	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2019	33	33,0	9,0	11,0
GRYT 2	Ytteröområdet	REG Gryt	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2017, 2019	10	28,9	9,1	11,1
STANNA 10	Finnfjärden	REG St Anna	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2017, 2019	17	26,1	8,9	10,7
BF 32	Kärrfjärden	REG St Anna	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2019	13	38,5	8,8	10,5
NO I KÄRRÖ	Kärrfjärden	REG St Anna	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2017, 2019	20	24,3	8,1	9,5
STANNA 1	Kärrfjärden	REG St Anna	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2017, 2019	21	24,8	8,9	10,7
STANNA 2	Kärrfjärden	REG St Anna	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2019	13	38,3	8,7	10,6
STANNA 5	Kärrfjärden	REG St Anna	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2017, 2019	10	29,7	8,7	10,5
STANNA 6	Kärrfjärden	REG St Anna	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2019	16	37,6	8,6	10,4
STANNA 9	Kärrfjärden	REG St Anna	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2019	14	34,9	8,2	9,7
5139 N ÖLANDS NORRA UDDE	Del av V Gotlandshavets utsjövatten	Övrigt	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2017, 2019	79	5,5	8,8	0,1
6007 S LANDSORT	Del av V Gotlandshavets utsjövatten	Övrigt	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	79	6,0	8,9	0,5
6008 SO LANDSORT	Del av V Gotlandshavets utsjövatten	Övrigt	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	78	5,7	8,6	0,6
BY38 KARLSÖDJ	Del av V Gotlandshavets utsjövatten	Övrigt	08 – Västra Gotlandshavet	2016, 2018	109	6,0	8,5	0,3
C10	Del av V Gotlandshavets utsjövatten	Övrigt	08 – Västra Gotlandshavet	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	124	6,0	9,8	0,3
IVB2	Del av Ö Gotlandshavets utsjövatten	Övrigt	09 – Östra Gotlandshavet	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	111	6,7	11,1	0,2
PMK 21	Del av Bornholmshavets utsjövatten	NAT Utklippan	12 – Bornholmshavet och Hanöbukten	2015	64	7,6	9,3	4,7

NATURVÅRDSVERKET RAPPORT XXXX  
Samförvaltning av älg och skog

Stationsnamn	Vattenförekomst	Stations kluster	Havsbassäng	Provtagna år	Djup (m)	Temp °C	Salinitet (PSU)	Syremättnad (mg/l)
BY5 BORNHOLMSDJ	Del av Bornholmshavets utsjövatten	Övrigt	12 – Bornholmshavet och Hanöbukten	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	90	7,3	16,8	1,3
TORH22	Del av Bornholmshavets utsjövatten	Övrigt	12 – Bornholmshavet och Hanöbukten	2015, 2016, 2017, 2019	70	7,8	15,9	1,6
HBP215	Del av Hanöbuktens utsjövatten	Övrigt	12 – Bornholmshavet och Hanöbukten	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	79	7,5	16,3	1,4
DM 107	Del av Arkonahavets utsjövatten	NAT Trelleborg	13 – Arkonahavet och Södra Öresund	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	44	14,2	10,0	7,8
GT 10	Del av Arkonahavets utsjövatten	NAT Trelleborg	13 – Arkonahavet och Södra Öresund	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	41	10,6	9,2	8,0
I:1	Del av Arkonahavets utsjövatten	NAT Trelleborg	13 – Arkonahavet och Södra Öresund	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	41	12,2	9,2	7,7
I:2	Del av Arkonahavets utsjövatten	NAT Trelleborg	13 – Arkonahavet och Södra Öresund	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	39	16,0	9,9	10,1
P204	Del av Arkonahavets utsjövatten	NAT Trelleborg	13 – Arkonahavet och Södra Öresund	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	41	10,3	9,3	7,6
P206	Del av Arkonahavets utsjövatten	NAT Trelleborg	13 – Arkonahavet och Södra Öresund	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	43	12,8	9,4	7,3
BY2 ARKONA	Del av Arkonahavets utsjövatten	Övrigt	13 – Arkonahavet och Södra Öresund	2015, 2016, 2017, 2018, 2019	48	6,4	14,9	6,7

Rapporten uttrycker nödvändigtvis inte Naturvårdsverkets ställningstagande. Författaren svarar själv för innehållet och anges vid referens till rapporten.

# NEMOte BARCODing

## Förbättrad miljöövervakning av Östersjöns bentiska ekosystem

Hotet mot den biologiska mångfalden har skapat ett behov av bättre metoder för miljöövervakning. Det gäller särskilt Östersjön som genom salthalten och syrefattiga bottenar har en låg biodiversitet.

Projektet NEMOte BARCODing har undersökt om de frilevande nematoderna kan hjälpa oss att fylla detta behov. Nematoderna har visat sig vara goda indikatorer på ekosystems hälsa och förändringar i miljön. Men vi har saknat kunskap om hur vi ska kunna använda nematoder som ett verktyg för miljöövervakning.

Därför har NEMOte BARCODing förbättrat referensdatabasen och metoden för kvantifiering av den relativa fördelningen av nematodarter, samt utvecklat verktyg för översättning av data om nematoder till miljöklassning.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag som finansierar forskning till stöd för Naturvårdsverkets och Havs- och vattenmyndighetens kunskapsbehov.