

Fejlkildebestemmelse for eDNA hos flodperlemusling (*Margaritifera margaritifera* L.)

Notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 3. marts 2020 | 21



AARHUS
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Datablad

Notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

Titel:	Fejlkildebestemmelse for eDNA hos flodperlemusling (<i>Margaritifera margaritifera</i> L.)
Forfattere:	Jes Jessen Rasmussen ^{1,2} , Trine Just Johnsen ¹ , Liselotte Wesley Andersen ¹ , Søren Nøhr Thomsen ³ & Martin Hesselsøe ³
Institution:	¹ Aarhus Universitet, Institut for Bioscience ² Nuværende affiliation: NIVA-Danmark, Njalsgade 76, 2300 København S ³ NIRAS A/S
Faglig kommentering: Kvalitetssikring, DCE:	Torben Linding Lauridsen Signe Jung Madsen
Ekstern kommentering:	Miljøstyrelsen. Kommentarerne findes her: http://dce2.au.dk/pub/komm/N2020_21_komm.pdf
Rekvirent:	Miljøstyrelsen
Bedes citeret:	Rasmussen, J.J., Johnsen, T.J., Andersen, L.W., Thomsen, S.N. & Hesselsøe, M. 2020. Fejlkildebestemmelse for eDNA hos flodperlemusling (<i>Margaritifera margaritifera</i> L.). Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 26 s. – Notat nr. 2020 21 https://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/Notatet_2020/N2020_21.pdf
	Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse
Foto forside:	Trine Just Johnsen
Sideantal:	26

Indhold

Forord	4
Sammenfatning	5
Summary	7
1 Introduktion	9
2 Formål	11
3 Metode	12
3.1 Feltstationen	12
3.2 Forsøgsopstilling	13
3.3 Projektforløb	13
3.4 eDNA prøveindsamling og udstyr	14
3.5 eDNA analysemetode	15
3.6 eDNA kontroller og standardkurver	15
3.7 eDNA – Ct, LOD og LOQ	16
3.8 Databehandling	16
4 Resultater	17
4.1 Abiotiske faktorer	17
4.2 Størrelse af muslinger	17
4.3 eDNA analyser	17
4.4 Usikkerhedsberegninger	19
5 Diskussion	20
6 Konklusion og perspektivering	23
7 Acknowledgements	24
8 Referencer	25

Forord

Denne rapport udgives af DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, Aarhus Universitet (DCE) som afsluttende produkt i et projekt om eDNA fra flodperlemusling.

Rapporten omfatter data indsamlet gennem et eksperimentelt arbejde udført i strømrrender i 2019. Undersøgelsen fokuserer på, hvorvidt - eller i hvilket omfang - eDNA udskilles fra skaller fra døde flodperlemuslinger. Målet er, at klarlægge om eDNA fra døde skaller kan have indflydelse på, hvordan resultater fra eDNA undersøgelser efter flodperlemusling skal fortolkes.

Projektet er gennemført i et samarbejde mellem Aarhus Universitet (AU), og NIRAS A/S og er finansieret af Miljøstyrelsen. AU har forestået projektbeskrivelse og ansøgning. Det eksperimentelle arbejde er udført efter projektbeskrivelsen af både AU og NIRAS A/S. NIRAS A/S har udført prøvetagning af vandprøver til eDNA analyse og NIRAS A/S har udført analysearbejdet i samarbejde med Eurofins Miljø A/S. Alle projektdeltagere har set og diskuteret resultater og rammer for rapportskrivning samt selve rapportskrivningen. AU har alene haft ansvar og beslutningsrettighed for rapportens indhold, fortolkninger af data samt faglige anbefalinger. Dog er alle projektdeltagere enige om rapportens indhold.

Sammenfatning

Flodperlemuslingen (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus, 1758) er gået drastisk tilbage i dens naturlige udbredelsesområde i Europa og Rusland inden for de seneste 100 år, og det vurderes, at den nu kun forekommer i 5% af dens oprindelige udbredelsesområde. I Danmark er flodperlemuslingen i dag formentlig kun naturligt forekommende i Varde å systemet, om end dens bevaringsstatus er ukendt. Populationer af flodperlemusling formodes dog at være bevaret på en ca. 2,5 km lang strækning som er historisk ureguleret, og hvor store og meget gamle individer har været fundet ved en dykkerundersøgelse for cirka 15 år siden.

Som pilotforsøg blev to lokaliteter på denne historisk uregulerede strækning i Varde å nyligt undersøgt for tilstedeværelse af miljøDNA (eDNA) for flodperlemuslingen. Positive eDNA signaler for flodperlemusling blev fundet både i vand og sediment for de to lokaliteter samt for yderligere to sydsvenske lokaliteter med kendte bæredygtige populationer af flodperlemusling. Derimod blev der ikke fundet eDNA af flodperlemusling længere opstrøms i Varde å eller i tre øvrige danske åer, hvor arten aldrig tidligere er observeret. Derfor er indsamling af eDNA foreslået som en lovende og forventelig mere effektiv metode til screening efter forekomster af flodperlemusling.

Imidlertid er det vist, at skaller fra afdøde individer af flodperlemusling indeholder DNA, og en ny tysk undersøgelse udpeger netop denne kilde som mulig forklaring på, at vandprøver med positive eDNA signaler kan opstå i vandløb, hvor levende flodperlemuslinger ikke findes ved konventionelle eftersøgninger. Der er således et behov for at afdække risikoen for at få falsk positive resultater på baggrund af denne kilde, inden eDNA metoden kan indføres som en formel del af overvågningsprogrammet for flodperlemusling.

Formålet med dette projektet er at undersøge, i hvilket omfang skaller fra døde individer af flodperlemusling udskiller DNA i målbare mængder. Undersøgelsen blev udført som et kontrolleret forsøg, hvor levende flodperlemuslinger og døde skaller blev udsat i kunstige vandløb (strømrender). I forsøgsperioden blev der indsamlet vandprøver, der blev analyseret for eDNA fra flodperlemusling.

Vores undersøgelse viste, at skaller fra afdøde individer af flodperlemusling med en alder på 20-30 år ikke frigiver DNA til vandsøjlen i målbare mængder, og at der således ikke er en risiko for falske positive eDNA signaler på denne baggrund. Sandsynligheden for falske positive signaler i forsøget blev estimeret til 1,1% på baggrund af et stort antal negative kontroller (ingen tilsætning af DNA template i qPCR analysen). Nyligt døde individer, hvor nedbrydningen af bløddelene stadig pågår må dog stadig forventes at afgive DNA. Derudover var alle vandprøver på nær én fra strømrender med levende muslinger positive for eDNA. Således må det konkluderes, at positive eDNA signaler med meget stor sandsynlighed stammer fra levende individer af flodperlemusling.

Det understreges imidlertid, at eDNA metoden ikke fuldt kan erstatte konventionelle eftersøgninger af flodperlemusling i forhold til Habitatdirektivets krav om beskrivelse af både populationsstørrelse, alderssammensætning og reproduktionsevne. Men eDNA metoden kan anvendes til at detektere fore-

komster af levende flodperlemuslinger, og med tanke på den forventede rumlige specificitet af eDNA detektioner ift. den faktiske placering af flodperlemuslingpopulationer i vandløbssystemer, kan eDNA metoden især anvendes til at indsnævre området, hvor der skal foretages en konventionel eftersøgning af arten.

Summary

The river pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus, 1758) is critically endangered and has suffered severe population declines across the entirety of the biogeographical distributional range. In fact, river pearl mussel populations only occur at 5% of the habitats compared to 100-year-old historical records. Presumably, Danish populations of the river pearl mussel is limited to a 2.5 km stream section of River Varde although the conservation status is currently unknown. This channel form and shape of this part of the river is unregulated, and big, old specimens of river pearl mussels were uncovered in previous diving surveys.

Two stream sites within this unregulated river section were recently sampled for environmental DNA (eDNA) as part of pilot project targeting eDNA from river pearl mussels. Samples collected in water as well as in sediments were positive for eDNA at these sites. Water and sediment samples collected in a Swedish stream with a sustainable river pearl mussel population were additionally positive for eDNA. In contrast, samples collected further upstream in River Varde or in alternative Danish streams with no previous records of river pearl mussels, were all negative for eDNA. Consequently, eDNA was proposed as a promising and presumably more effective method applicable for screening surveys targeting river pearl mussels.

However, DNA can also originate from shell material even from deceased individuals. In fact, a recent German study pinpoint that exact source of DNA as potential explanation to a set of water samples containing eDNA from river pearl mussels at sites where living individuals cannot be detected using conventional survey methods. Hence, there is a need to quantify the risk of false positive results due DNA originating from shell material from deceased individuals before the eDNA method can be safely incorporated into the species monitoring program for freshwater pearl mussels.

In this study we aimed to determine the potential excretion of eDNA in detectable and/or quantifiable amounts originating from shell material from deceased individuals of river pearl mussels. The study was conducted using a controlled setup, where living individuals and shell material from deceased individuals were deployed in artificial stream channels. During the experimental period, we collected water samples for eDNA analyses.

Our study showed that shell material from deceased individuals of river pearl mussels (estimated time elapse since death was 20-30 years) does not release DNA into the water column in detectable concentrations. Consequently, we state that the risk of false positive eDNA samples based on DNA release from shell material alone is minimal. The probability of having false positive samples was assessed to 1.1 % based on a substantial amount of negative control samples (no addition of DNA template in the qPCR analysis). Recently dead individuals where soft tissues are still actively degrading will, however, most probable still release DNA to the water column. Furthermore, all water samples but one collected in stream channels containing living individuals of freshwater pearl mussels were positive for eDNA. This confirms that water samples with positive traces of eDNA should be interpreted as originating from living individuals.

We emphasize, that the eDNA method cannot fully replace conventional surveys targeting river pearl mussels in terms of complying with the EU Habitats Directive, as this states requirements for quantifying population sizes, age distribution, and reproductive potential. However, the eDNA method can be applied for more or less spatially explicit screening surveys in order to locate living river pearl mussel populations and hence serve as a guide to make conventional surveys more efficient.

1 Introduktion

Flodperlemuslingen (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus, 1758) er gået drastisk tilbage i dens naturlige udbredelsesområde i Europa og Rusland inden for de seneste 100 år (Araujo & Ramos 2000). Det vurderes, at den nu kun forekommer i 5% af dette område (IUCN 2016). Tilbagegangen skyldes primært eutrofiering, intensivering af landbrug, dræning og afskovning samt udnyttelse i form af perle-fiskeri (Mollusk Specialist Group 1996).

Flodperlemuslingen overvåges ifølge den tekniske anvisning til det nationale program for overvågning (NOVANA) ved en fysisk undersøgelse af bunden med undervandsvideo og/eller dykker (Wiberg-Larsen 2012). Som minimum skal overvågningen give svar på, om arten stadig forekommer på dens kendte historiske levested. Det er samtidigt hensigten, at ændringer i artens udbredelse, bestandsstørrelser og alderssammensætning om muligt også registreres/overvåges (Wiberg-Larsen 2012). Der er også udviklet retningslinjer for overvågning af flodperlemusling af den Europæiske komite for standardisering (CEN), der beskriver manuel eftersøgning af arten ved brug af vandkikkert. Da ferskvandsmuslinger generelt forekommer som delvist begravede individer med mørke skaller (eller fuldt begravede juvenile), er en sådan manuel eftersøgning tidskrævende, og der er stor risiko for at overse arten ved undersøgelsen (falske negative). Således har både internationale og danske konventionelle undersøgelser efter populationer af flodperlemusling haft stærkt svingende resultater, og mere effektive metoder har været efterlyst (fx Bauer 1986; Reis 2003; Fredshavn et al. 2014).

I Danmark er flodperlemuslingen i dag formentlig kun naturligt forekommende i Varde å systemet, om end dens bevaringsstatus er ukendt. Populationer af flodperlemusling formodes dog at være bevaret på en ca. 2,5 km lang strækning, som er historisk ureguleret, og hvor store og meget gamle individer har været fundet ved en tidligere dykkerundersøgelse (Kann 2006). Siden Kann (2006) er der kun fundet et enkelt levende individ, der blev fanget på spinner af en sportsfisker (Porsgaard 2015) på trods af en målrettet eftersøgning under NOVANA (Fredshavn et al. 2014).

Som pilotforsøg blev to lokaliteter på den historisk uregulerede strækning i Varde å undersøgt i 2015 og 2016 for tilstedeværelse af miljøDNA (eDNA) for flodperlemuslingen (Andersen & Wiberg-Larsen 2017). Positive eDNA signaler for flodperlemusling blev fundet både i vand og sediment for de to lokaliteter samt for yderligere to sydsvenske lokaliteter med kendte bæredygtige populationer af flodperlemusling. Derimod blev der ikke fundet eDNA af flodperlemusling længere opstrøms i Varde å eller i tre øvrige danske åer, hvor arten aldrig tidligere er observeret (Andersen & Wiberg-Larsen 2017). Derfor er indsamling af eDNA foreslået som en lovende og forventelig mere effektiv metode til screening efter forekomster af flodperlemusling.

Det er tidligere vist, at flodperlemusling udskiller DNA sammen med slimdannelsen (Henley et al. 2006). Dette kan være en kilde til eDNA fx i Varde Å. Dog viste Geist et al. (2008), at det er muligt at ekstrahere DNA direkte fra friske (1 uge - 1 måned gamle) knuste skaller af flodperlemusling. For ældre skaller, der havde ligget i vandløbet i ca. 1 måned, var det stadig muligt at opformere DNA, men efter 3 måneder var det ikke muligt at ekstrahere DNA. Stoeckle et al. (2016) undersøgte 12 Europæiske vandløbssystemer med enten

kendte (n = 9) eller historiske (forventet uddøde, n = 3) bestande. De påviste eDNA fra flodperlemusling på samtlige lokaliteter med kendte bestande, men også på en af lokaliteterne med historiske bestande. Metoden, de benyttede, var en semi-nestet qPCR metode, som de viste var 10.000 gange mere følsom sammenlignet med en almindelig qPCR metode. Denne fremgangs måde øger sandsynligheden for falske positive. Der blev i følge forfatterne dog ikke observeret kontaminering i nogen af analyserne, og samtidigt var det ikke muligt at påvise arten hverken 500m eller 1000m nedstrøms på nogen af lokaliteterne (Stoeckle et al. 2016). Dette understøtter, at påvisningen af eDNA fra flodperlemusling formodentlig ikke skyldtes kontaminering. Observationen af eDNA fra arten i vandløbet, hvor den menes at være uddød, kan forklares ved følgende (Stoeckle et al. 2016):

- 1) nedgravede, levende individer, der ikke er påvist med den konventionelle metode, har afgivet eDNA til vandet (dvs. ingen falske positive eDNA resultater).
- 2) eDNA udskilt fra døde skaller giver målbart signal jf. Geist et al. (2008) (dvs. falske positive eDNA resultater).
- 3) eDNA, bundet til sedimentet, bliver genopløst i vandet (dvs. mulighed for falsk positiv men kan ikke bevises).
- 4) kontaminering på trods af, at state-of-the art var benyttet til at monitorere dette (dvs. falske positive eDNA resultater).

Resultatet efterlader derfor et behov for at afklare, i hvilket omfang skaller fra døde individer af flodperlemusling udskiller DNA til vandløbsmiljøet i et omfang, som kan give anledning til falske positive eDNA signaler.

Det må dog understreges, at det aldrig kan siges med sikkerhed, at eDNA, der påvises fra en art, rent faktisk kommer fra et levende eksemplar, med mindre artens tilstedeværelse også er påvist fysisk samme sted.

2 Formål

Formålet med dette projekt er at undersøge i hvilket omfang, skaller fra døde individer af flodperlemusling udskiller DNA i målbare mængder. Undersøgelsen udføres gennem et "Common Garden" forsøg, hvor levende flodperlemuslinger og døde skaller udsættes i kunstige vandløb (strømrender) under kontrollerede forhold i et tre ugers forløb. I forsøgsperioden indsamles vandprøver, der analyseres for at påvise forekomsten af eDNA fra flodperlemusling.

3 Metode

Der blev indsamlet levende individer af flodperlemusling samt skaller fra døde individer på to lokaliteter i Midtsverige med hhv. bæredygtige og uddøde bestande (hhv. Hemgravsån og Brånsån) efter officiel tilladelse fra Länsstyrelsen Västernorrland. Bestanden i Brånsån blev stærkt decimeret for 20-30 år siden, hvorfor skaller opsamlet på denne lokalitet med rimelighed kan antages at have denne alder. I Danmark blev henholdsvis de levende individer og skaller udsat i strømrrender på en feltstation ved Lemming iht. tilladelse bevilget af Miljø- og Fødevareministeriet. Vandprøverne blev analyseret for eDNA af NIRAS A/S i samarbejde med Eurofins. Efter projektets afslutning blev flodperlemuslingerne aflivet ved frysning (jf. tilladelse om forsøg med flodperlemusling udstedt af Miljø- og Fødevareministeriet).

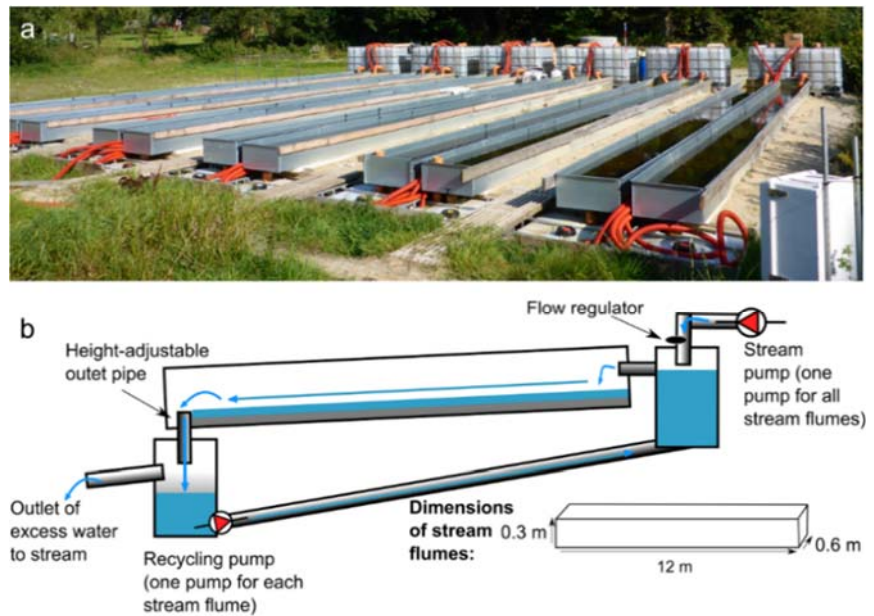
3.1 Feltstationen

Projektet blev udført på en feltstation ved Lemming, nord for Silkeborg, beliggende ved Lemming å (Fig. 1). Stationen er udstyret med 12 identiske strømrrender, som hver er 12 m lange, 0,6 m bredde og 0,3 m høje og har et fald på 5‰ (Fig. 2a). Rrenderne forsynes med vandløbsvand fra Lemming å vha. en hovedpumpe, som pumper vandet op i én brønd. Herefter fordeles vandet ud i 12 opstrømstanke, som så forsyner de 12 rrender med vand (Fig. 2b). For enden af rrenderne opsamles vandet i 12 separate nedstrømstanke (Fig. 2b). Vandet kan herefter enten blive recirkuleret via en pumpe, som pumper vandet tilbage til opstrømstanken, eller blive ledt tilbage til Lemming å. Således fungerer hver rende som individuelle replikater og deler ikke vand med andre rrender. Ved hver rende kan man justere vandføringen ved at recirkulere forskellige mængder af vand fra nedstrømstankene op til opstrømstankene. Derudover kan vanddybden justeres nederst i rrenderne vha. et rør, som hæves for høje vanddybder og sænkes for lave vanddybder (outlet pipe, Fig. 2b).

Figur 1. Kort over feltstationen ved Lemming.



Figur 2. Foto (a) og design (b) af renderne. Figur fra Neif et al. (2017).



3.2 Forsøgsopstilling

Forsøget blev udført som et blok-design, hvor der blev etableret levende populationer af flodperlemusling i fem af renderne, skaller fra døde individer i yderligere fem render, og to render blev holdt helt fri for flodperlemusling og fungerede således som negativ kontrolgruppe. Der blev udsat henholdsvis 19 levende individer eller skaller fra 19 døde individer i de 2 x 5 render med henblik på at kunne foretage en direkte sammenligning af eDNA signalet fra en levende og en uddød population med identisk størrelse. Den etablerede tæthed af flodperlemuslinger svarede til tætheden af flodperlemuslinger i Hemgravsån (antal individer per bundareal – egne observationer). De levende muslinger samt skallerne fra døde individer blev udsat på de øverste 3 meter af hver rende, hvor substratet var udlagt til efterligning af flodperlemuslingens naturlige habitat i Hemgravsån (egne observationer). Substratet i bunden af renderne bestod således af groft sand, mens sedimentoverfladen bestod af sten og groft sand i forholdet 1:1. Stenene varierede i størrelsesordenen 30 - 300 mm i diameter. Substrathøjden var 0,15 m for at sikre, at større individer af flodperlemusling kunne etablere sig delvist nedgravet uden at støde mod strømrendens bund. Vanddybden var 0,10 m.

3.3 Projektforløb

Substratet i forsøgsrenderne blev klargjort ultimo september – primo oktober 2019, hvorefter hovedpumpen blev startet. Vand fra Lemming å gennemstrømmede herefter renderne i fire uger for at skabe naturlige mikrobielle samfund i forsøgsrenderne.

Indsamling af flodperlemuslinger samt skaller foregik over to dage primo november. Skallerne fra døde individer blev indsamlet i det midtsvenske vandløb Brånsån. De levende individer blev indsamlet fra en bæredygtig bestand i Hemgravsån. Skaller samt muslinger blev transporteret til Danmark under kølige, fugtige forhold. Ved hjemkomst til Danmark blev muslingerne midlertidigt opbevaret i et kraftigt iltet vandkar i kølerum ved 10 °C. Halvandet døgn senere blev muslinger og skaller udsat i forsøgsrenderne efter den beskrevne opstilling.

Måleperioden forløb over de tre efterfølgende uger (11/11 - 4/12 2019), hvor der ugentligt blev indsamlet vandprøver (op til 1,5 L) fra hver rende til eDNA analyse. Vandprøverne blev indsamlet i nedstrømsenden af hver strømrende, idet det er velkendt, at der kan indsamles målbare mængder af eDNA 25 m nedstrøms eksisterende levende populationer (Stoeckle et al. 2016). Der blev indsamlet en vandprøve per strømrende, idet strømrenderne udgjorde replikaterne ($n = 5$). Det vil sige, at der blev indsamlet 36 vandprøver i alt over de tre uger til eDNA analyse.

Strømhastigheden i hver strømrende blev målt i alle tre uger ved indløbsenden, hvor flodperlemuslingerne var placeret. Dette blev udført med en Höntzsh strømhastighedsmåler, som blev desinficeret med 0,5% bleech og 70% ethanol ved hvert skift fra én strømrende til den næste. Både temperatur og pH blev målt i vand udtaget separat for hver strømrende ved hver vandprøvetagning. pH blev målt to gange for hver rende. Vandføringen i hver strømrende blev beregnet på baggrund af strømhastighedsmålingerne og rendernes tværnsnitsareal (strømrendebredde x vanddybde).

Ved forsøgets slutning blev de levende flodperlemuslinger indsamlet for hver strømrende og målt og vejte i overensstemmelse med den tekniske anvisning for overvågning af flodperlemusling (Wiberg-Larsen 2012), hvorefter de blev frosset. Skallerne fra tre af strømrenderne (med tomme skaller) blev vejte og frosset. Det var ikke muligt at måle skallerne, da disse var meget porøse og uformelige. Dette muliggjorde en sammenligning mellem eDNA koncentrationer fra de forskellige strømrender og den totale biomasse af flodperlemusling.

3.4 eDNA prøveindsamling og udstyr

Hver eDNA analyse af en vandprøve blev udført rutinemæssigt i tre tekniske replikater. Vandprøverne blev indsamlet i samme rækkefølge ved hvert besøg, hvor prøver fra de to blanke strømrender blev indsamlet først, dernæst fra de fem render med skaller, og til sidst fra de fem render med levende flodperlemuslinger. Denne fremgangsmåde blev valgt for at minimere kontaminering mellem renderne.

På hver lokalitet blev der indsamlet vand i en 0,5L engangs plastikflaske. Ved indsamling af vandprøver anvendte vi NIRAS udstyr til trykassisteret filtrering (PAF) og tilhørende sampling kit leveret af NIRAS. Sampling kittet består af specialtilpassede engangsposer og engangsfiltre (Millipore Sterivex filter, 0,22 μm pore størrelse, med luer lock udgang, polyethersulfone membran, Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland). Vandprøverne blev hældt på engangsposerne og derefter filtreret igennem Sterivex filtret indtil filtret var tilstoppet. Anvendelse af dette udstyr minimerer risikoen for kontamineringer, da alt udstyr som kommer i berøring med prøven kun anvendes en gang. Ved filtreringen sikrer udstyret, at de anvendte filtre netop belastes med det maksimale tryk på 3 bar, som de kan tåle. Således sikres det, at filtrets kapacitet udnyttes optimalt uden, at filtret ødelægges på grund af overbelastning. Overskydende vand i filtret blev straks fjernet efter filtrering ved hjælp af en 60 ml plastiksprøjte. Derefter blev filtrene lagt på tør is, og opbevaret i ubrudt frysekæde frem til analyse.

Ved indsamling af hver vandprøve blev det registreret, hvor stort volumen, der var passeret gennem filteret. Filtreringsvolumen afhænger meget af mængde og størrelse af partikler i vandet. Oplysning om filteret volumen er

væsentlig ved eventuel kvantitativ sammenligning af resultaterne fra de enkelte prøver. Generelt blev der filtreret 200-375 mL vand per prøve.

3.5 eDNA analysemetode

DNA ekstraktion og qPCR analyse blev udført efter en protokol, som er udviklet i et forskningssamarbejde med Københavns Universitet. Hovedparten af metoden er tillige beskrevet af Agersnap et al (2017) og Knudsen et al (2019). Efter DNA ekstraktionerne blev artsspecifikt eDNA eftersøgt i prøverne med qPCR. Med denne metode kan én art eftersøges af gangen, hvis der i forvejen er udviklet og afprøvet et artsspecifikt detektionssystem.

Analysearbejdet blev baseret på et artspecifikt qPCR assay rettet mod flodperlemusling; MmarCOI (d'Auriac et al. NIVA-Norge, upubliceret).

3.6 eDNA kontroller og standardkurver

Hver af de artsspecifikke analyser omfattede, ud over prøverne fra strømrønderne, dels negative kontroller (uden DNA) og dels positive kontroller med DNA fra flodperlemusling, som blev analyseret i en fortyndingsrække (standardkurve).

Der blev inkluderet 2 negative kontroller på hver PCR strip med 8 prøver. Dette forholdsvist store antal negative kontroller blev medtaget for at estimere risikoen for falske positive resultater. Det er almindelig praksis at medtage et antal negative kontroller, hvor der ikke er tilsat DNA i selve opsætningen af PCR, til at monitorere falske positive i forbindelse med både konventionel PCR amplifikation baseret på høj-koncentreret DNA fra væv og qPCR amplifikation af lav-koncentreret/fragmenteret eDNA fra fx vandprøver. Findes der amplifikation i disse negative kontroller udelukkes resultaterne af hele analysegangen, og den gentages.

Der medtages imidlertid ofte meget få negative kontroller; ofte blot to til fire på en plade med 96 prøver. Der er ikke stor sandsynlighed for i forbindelse med sådan en opsætning, at det netop er blandt disse to til fire negative kontroller, at der vil forekomme en kontaminering. Det kan heller ikke udelukkes, at en kontaminering vil kunne forekomme i andre negative kontroller, hvis der blev medtaget flere end i dette projekt. Dvs. eventuel kontamineringen forbliver skjult, og den gængse procedure med at udelade en analyserunde med en kontaminering i en negativ kontrol, er ikke en effektiv metode til at beskytte mod falske positive grundet kontaminering. Derfor har vi også benyttet metoden beskrevet i Sørensen et al. (submitted). Her i beskrives at i det omfang, at risikoen for kontaminering af hhv. negative kontroller og prøver kan anses for at være ens, kan man benytte testen af de negative kontroller til at estimere risikoen for falske positive blandt prøverne, dvs. hvor sandsynligt er det, at en positiv påvisning er falsk. Dette estimeres ved hjælp af modellen angivet i Sørensen et al. (submitted).

De positive kontroller anvendes til at fastlægge en standardkurve. Standardkurven anvendes til at fastlægge LOD (Limit Of Detection, detektionsgrænse) og LOQ (Limit Of Quantification, grænse for kvantificering). Standardkurven anvendes også ved eventuelle kvantitative sammenligninger.

3.7 eDNA – Ct, LOD og LOQ

Resultater fra qPCR analyser angives i Ct værdier. Ct angiver antal amplifikationscykler, som qPCR-analysen kører før et signal detekteres. En lav Ct (få cykler) angiver derfor en høj koncentration af DNA, mens en høj Ct værdi (mange cykler) angiver en lav koncentration af DNA.

Resultaterne fra qPCR analyserne blev vurderet i henhold til minimum principperne for publikation af qPCR eksperimenter (MiQE), som beskrevet i litteraturen (Bustin et al. 2009; Mauvisseau et al. 2018). Dette indebærer en klar definition af LOD og LOQ. LOD defineres ud fra standardkurven. Standardkurven er baseret på en fortyndingsserie af DNA fra flodperlemusling. Standarderne analyseres i to tekniske replikater for hvert fortyndingsniveau. LOD er den laveste standard, hvor mindst én af de tekniske replikater er positiv. LOQ defineres ud fra det laveste fortyndingsniveau af standardrækken, hvor alle gentagelser er positive og gentagelserne ligger nogenlunde inden for samme område. LOD og LOQ er defineret for hver af de artsspecifikke qPCR analyser på baggrund af standardkurverne.

Resultaterne afrapporteres efterfølgende i hovedgrupper som defineret i nedenstående. Resultaterne vurderes både ud fra de tekniske replikater (3 gentagelser af én biologiske prøve) og ud fra de biologiske gentagelser (5 vandprøver fra strømrrender med samme behandling).

Den gule kategori omfatter prøver med resultater, som ikke er reproducerbare (dvs. kun én af de tekniske replikater er positive) og resultater, som ligger under detektionsgrænsen (LOD). Data fra gule prøver skal altså fortolkes med stor forsigtighed. De grønne prøver er positive. Positive prøver kan være over eller under LOQ. Prøver over LOQ kan med forsigtighed også tolkes kvantitativt. Kvantitative sammenligninger bør udføres relativt, hvor de enkelte prøver sammenlignes indbyrdes.

- **GRØN**: Positiv og kvantitativ sammenligning mulig (>LOQ)
- **GRØN**: Positiv, kvantitativ sammenligning ikke mulig (>LOD <LOQ)
- **GUL**: Mulig positiv (<LOD eller ikke reproducerbar)
- **RØD**: Negativ (Ikke noget signal)

3.8 Databehandling

Vi antager, at eDNA signalet i vandprøverne kan afhænge af flodperlemuslingernes størrelse. Det er derfor væsentligt at undersøge, om størrelsen på muslingerne (vægt, længde, højde og tykkelse) i render med levende muslinger (n = 5) var sammenlignelige. Dette blev undersøgt ved en envejs ANOVA ($\alpha = 0,05$). Data blev undersøgt for normalfordeling og varianshomogenitet ved hhv. Kolmogorov-Smirnov og Levenes test.

Temperatur, pH og strømhastighed påvirker eDNA signalet i en vandprøve (Barnes et al., 2014), og det er derfor relevant at undersøge, om disse parametre varierede både imellem behandlinger (hhv. levende muslinger og skaller (n = 5)) og prøvetagningsdage (n = 12). Potentielle forskelle i de nævnte miljøparametre mellem behandlinger blev undersøgt ved en parret t-test, mens forskel mellem prøvetagningstidspunkter blev undersøgt med en envejs ANOVA ($\alpha = 0,05$). Data blev undersøgt for normalfordeling og varianshomogenitet efter beskrivelsen ovenfor.

4 Resultater

4.1 Abiotiske faktorer

Der var ikke signifikant forskel på strømhastighed, vandføring, pH eller temperatur mellem behandlinger (hvv. render med levende muslinger og skaller (parret t-test, $p > 0,05$, $n = 5$). Vi fandt ingen signifikant forskel i strømhastighed og vandføring i renderne mellem de tre prøvetagningstidspunkter (envejs ANOVA, $p > 0,05$, $n = 12$), men der var signifikant forskel i den målte temperatur og pH i renderne mellem prøvetagningstidspunkterne (envejs ANOVA, $p < 0,0001$, $n = 12$).

4.2 Størrelse af muslinger

Sammenligningen af de levende muslingers størrelse viste, at der ikke var signifikant forskel mellem renderne ($n = 5$) mht. vægt, længde, højde eller tykkelse (envejs ANOVA, $p > 0,05$, $n = 19$).

4.3 eDNA analyser

Der blev kørt 36 artsspecifikke qPCR analyser. Hver analyse blev kørt i 3 tekniske gentagelser. Der er således udført 108 qPCR analyser. Derudover er der analyseret positive kontroller i fortyndingsrækken (standard kurve) samt negative kontroller. Der er kørt 2 negative kontroller (NTC, No Template Control) for hver 6 prøver. Ligeledes blev der tilsat en intern positiv kontrol (IPC, Intern Positive Control) til hver analyse for at kontrollere for PCR inhibering (TaqMan™ Exogenous Internal Positive Control, Thermo Scientific, <https://corporate.thermofisher.com/en/home.html>).

eDNA prøverne blev kørt ad to omgange, først prøverne 132-149 og dernæst prøverne 150-167. LOD og LOQ varierede derfor mellem de to kørsler som følgende:

- Prøve ID 132-149: LOD = Ct 39,4, LOQ = Ct 35,6
- Prøve ID 150-167: LOD = Ct 39,7, LOQ = Ct 36,6

Generelt var der ingen tilfælde af positive prøver for eDNA i strømrrender med skaller, mens alle prøver på nær én var positive for eDNA i strømrrender med levende flodperlemusling (Tabel 1-3). Der var en tendens til faldende styrke i eDNA signalet over tid (stigende Ct) med de laveste Ct værdier efter 1 uge og højeste Ct værdier efter 3 uger (Tabel 1-3).

Tabel 1. Resultater fra qPCR analyserne af vandprøverne indsamlet fra strømrønderne i uge 1. Ct værdi er angivet sammen med en faglig vurdering af analyseresultatet. Alle resultater er gennemsnit af tre tekniske gentagelser.

UGE 1: Rende nr.	Prøve ID:	Behandling	Gennemsnitlig Ct	Konklusion
11	2019-0132	Negativ Kontrol	37,96	>LOD, <LOQ, ikke reproducerbar
7	2019-0133	Negativ Kontrol	Ingen Ct	Negativ
12	2019-0134	Skaller	Ingen Ct	Negativ
10	2019-0135	Skaller	Ingen Ct	Negativ
6	2019-0136	Skaller	Ingen Ct	Negativ
3	2019-0137	Skaller	Ingen Ct	Negativ
1	2019-0138	Skaller	Ingen Ct	Negativ
9	2019-0139	Muslinger	34,24	>LOD, >LOQ, reproducerbar
8	2019-0140	Muslinger	36,04	>LOD, <LOQ, reproducerbar
5	2019-0141	Muslinger	35,31	>LOD, >LOQ, reproducerbar
4	2019-0142	Muslinger	Ingen Ct	Negativ
2	2019-0143	Muslinger	33,95	>LOD, >LOQ, reproducerbar

Tabel 2. Resultater fra qPCR analyserne af vandprøverne indsamlet fra strømrønderne i uge 2. Ct værdi er angivet sammen med en faglig vurdering af analyseresultatet. Alle resultater er gennemsnit af tre tekniske gentagelser.

UGE 2: Rende nr.	Prøve ID:	Behandling	Gennemsnitlig Ct	Konklusion
11	2019-0144	Negativ kontrol	Ingen Ct	Negativ
7	2019-0145	Negativ kontrol	Ingen Ct	Negativ
12	2019-0146	Skaller	Ingen Ct	Negativ
10	2019-0147	Skaller	Ingen Ct	Negativ
6	2019-0148	Skaller	Ingen Ct	Negativ
3	2019-0149	Skaller	Ingen Ct	Negativ
1	2019-0150	Skaller	Ingen Ct	Negativ
9	2019-0151	Muslinger	35,87	>LOD, >LOQ, reproducerbar
8	2019-0152	Muslinger	37,64	>LOD, reproducerbar
5	2019-0153	Muslinger	35,94	>LOD, >LOQ, reproducerbar
4	2019-0154	Muslinger	38,10	>LOD, reproducerbar
2	2019-0155	Muslinger	36,58	>LOD, >LOQ, reproducerbar

Tabel 3. Resultater fra qPCR analyserne af vandprøverne indsamlet fra strømrønderne i uge 3. Ct værdi er angivet sammen med en faglig vurdering af analyseresultatet. Alle resultater er gennemsnit af tre tekniske gentagelser.

UGE 3: Rende nr.	Prøve ID:	Behandling	Gennemsnitlig Ct	Konklusion
11	2019-0156	Negativ kontrol	Ingen Ct	Negativ
7	2019-0157	Negativ kontrol	Ingen Ct	Negativ
12	2019-0158	Skaller	Ingen Ct	Negativ
10	2019-0159	Skaller	Ingen Ct	Negativ
6	2019-0160	Skaller	Ingen Ct	Negativ
3	2019-0161	Skaller	Ingen Ct	Negativ
1	2019-0162	Skaller	Ingen Ct	Negativ
9	2019-0163	Muslinger	38,06	>LOD, reproducerbar
8	2019-0164	Muslinger	37,48	>LOD, reproducerbar
5	2019-0165	Muslinger	37,42	>LOD, reproducerbar
4	2019-0166	Muslinger	37,75	>LOD, reproducerbar
2	2019-0167	Muslinger	38,40	>LOD, reproducerbar

4.4 Usikkerhedsberegninger

I alt (biologiske, tekniske replikater og prøver benyttet til beregning af standardkurverne) blev der analyseret 150 individuelle qPCR analyser og 126 negative kontroller i eDNA undersøgelsen. R-scriptet angivet i Sørensen et al. (submitted) blev benyttet til at estimere risikoen for en falsk positiv, selv om ingen af de negative kontroller var positive. Der blev analyseret 3 tekniske replikater for hver prøve, og der blev observeret 75 positive og 75 negative replikater ud over de 126 negative kontroller. Sandsynligheden, for at mindst én af de 3 tekniske replikater var en falsk positiv på baggrund af disse observationer, blev estimeret til $p=0,011$, altså var der en maksimal risiko på 1,1% for en falsk positiv.

5 Diskussion

Vandprøver indsamlet fra strømrender med levende flodperlemuslinger var positive for eDNA fra flodperlemusling for alle prøvetagningstidspunkter på nær en enkelt prøve i uge 1, hvor alle tre tekniske replikater var negative. Disse resultater viste tydeligt, at den anvendte populationstæthed (svarende til populationstætheden i Hemgravsåen) gav målbare og i flere tilfælde kvantificerbare koncentrationer af eDNA (>LOQ). Da vi ikke fandt signifikante forskelle i betydende abiotiske parametre (vandføring, strømhastighed, temperatur og pH) mellem grupperne med levende flodperlemuslinger og tomme skaller, skyldes den manglende påvisning af eDNA i den ene af renderne med levende muslinger formentlig en tilfældig fejl i forbindelse med prøvetagningen eller den efterfølgende analyse af eDNA og altså ikke variationer i abiotiske forhold.

Der var en tendens til faldende eDNA koncentrationer (stigende Ct værdier) i alle prøver indsamlet fra strømrender med levende flodperlemuslinger hen over prøvetagningsperioden. Dette kan eventuelt skyldes, at muslingerne blev udsat for stress under indfangning, transport og udsætning i renderne, som gradvist aftog henover de tre ugers prøvetagning. Muslingerne kan af den årsag gradvist have udskilt mindre eDNA over tid (Stewart 2019).

Alle prøver fra strømrender med tomme flodperlemuslingskaller var negative for eDNA. Når Geist et al. (2008) detekterede eDNA fra tomme flodperlemuslingskaller, skyldes det sandsynligvis, at skallerne blev knust inden eDNA ekstrahering, samt at disse skaller var fra nyligt afdøde muslinger (<6 måneder). Dette betyder, at den naturlige nedbrydning af skallerne har været relativ lille inden prøvetagning. Skallerne undersøgt i vores studie har antageligt været døde/tomme i 20-30 år, og har derfor været udsat for en længere nedbrydning. Idet forsøgets resultater skal bruges til at sandsynliggøre tilstedeværelsen af flodperlemusling i NOVANA overvågningen, forblev skallerne og muslinger intakte i strømrenderne. På baggrund af vores resultater må vi konkludere, at skaller af flodperlemuslinger, der har været døde længe, ikke naturligt udskiller eDNA i målbare mængder. Et positivt eDNA signal i en vandprøve indikerer således med stor sandsynlighed, at der er levende individer til stede i det undersøgte vandløbssystem eller nyligt døde individer, hvor bløddelene endnu ikke er helt nedbrudt.

Én af de tre tekniske replikater fra en af prøverne fra den negative kontrolgruppe var positiv (>LOD). Prøven evalueres dog IKKE som positiv, da resultatet ikke var reproducerbart. Denne observation kan skyldes kontaminering. Kontaminering kan næppe stamme fra prøvetagningsudstyret, da dette var engangsudstyr og udstyret blev udskiftet mellem hver prøvetagning. De vurderes også, at kontamineringen næppe stammer fra prøvetagningen, da de negative kontrolrender blev taget som de første prøver på alle prøvedagene. Det mest sandsynlige er, at resultatet skyldes ombytning eller kontaminering ved håndtering i laboratoriet. Det må understreges, at dette resultat ikke giver anledning til en anderledes tolkning af data, da resultatet ikke er reproducerbart. Altså fortolkes denne prøve som en falsk positiv.

Stoeckle et al. (2016) undersøgte eDNA signaler ved og nedstrøms for vandløbsområder med hhv. nuclevede bæredygtige populationer af flodperlemusling samt forventet uddøde populationer. De fandt positive eDNA signaler i ét af vandløbene med forventet uddøde populationer og spekulerede i muligheden for, at dette positive signal stammede fra eDNA sekrektion fra skaller af døde muslinger. Vores resultater viser imidlertid, at deres formodentlig skyldes en manglende detektion af tilstedeværende levende individer af flodperlemusling.

Stoeckle et al. (2016) fandt desuden, at vandprøver indsamlet 500 m og 1.000 m nedstrøms kendte nuclevede populationer konsekvent var uden målbare mængder af eDNA fra flodperlemusling. Dette antyder, at vandprøver med målbare mængder af eDNA indikerer, at levende bestande eller nyligt døde individer af flodperlemusling må befinde sig tæt på prøvetagningsstedet. Omvendt fandt Wacker et al. (2019), at koncentrationer af eDNA fra flodperlemusling var stort set uændret op til 1.700 m nedstrøms en kendt stor population af flodperlemusling. Det norske vandløb var karakteriseret af tæt og høj bevoksning i den ripariske zone, samt stort vandspejlsfald, hvorfor der givetvis har været fravær af undervandsvegetation og stendomineret substrat, mens vandløbene undersøgt af Stoeckle et al. (2016) mere havde karakter af lavlandsvandløb med betydelige mængder af undervandsvegetation. Disse forskelle i nedstrøms transportlængde af eDNA skyldes derfor sandsynligvis en større retention af eDNA i vandløbene undersøgt af Stoeckle et al. (2016), som følge af både større mængde af bioreaktive overflader og længere transporttid på grund af vandløbenes retentionskapacitet. Fremier et al. (2019) understregede ligeledes betydningen af lokale vandløbsmorfologiske forhold for transport og persistens af eDNA i vandløbssystemer. Varde å, hvori flodperlemuslingen antages at findes i Danmark, minder mest om vandløbene undersøgt af Stoeckle et al. (2016), hvorfor det må forventes, at større levende bestande befinder sig tæt på prøvetagningssteder med positive eDNA signaler (< 500 m).

Wacker et al. (2019) undersøgte desuden effekter af prøveindsamlingsstidspunkt og populationsstørrelse for mængden af målbart eDNA fra flodperlemusling. De fandt, at der kun var målbare mængder af eDNA i 13% af prøverne indsamlet ved en population på cirka 300 individer mens 100% af prøverne var positive ved en population på > 2.000 individer.

Derudover fandt Wacker et al. (2019), at koncentrationen af eDNA var 20x højere i prøver indsamlet i august, hvor reproduktionen foregår og larver frigives, sammenlignet med prøver indsamlet i det tidlige forår med lave vandtemperaturer og forventet lav filtreringsaktivitet. Dette viser, at screeningsundersøgelser efter flodperlemusling i danske vandløb med fordel kan udføres i sensommeren for at minimere risikoen for falske negative prøver.

Den filtreringsmetode, vi har anvendt (Sterivex filter), fanger flere mindre partikler end metoden anvendt af Wacker et al. (2019) grundet en større porestørrelse i filteret. Derfor filtreres en mindre vandmængde, før filtret stopper. Det må forventes, at Sterivex filtret fanger mere eDNA pr. L filtreret vand, da flere små partikler fanges i filtret. Vi forventer, at man med vil se en tilsvarende sammenhæng mellem antal individer og detektionsandel (%) uanset filtreringsmetode. Jo mere eDNA filtreringsmetoden opsamler, jo færre flodperlemuslinger skal der til for at opnå en positiv prøve. eDNA mængden, der opsamles i filtret, kan optimeres på to måder; ved øget filtreringsvolumen og ved reduceret porestørrelse i filteret. Sammenhængen mellem filtreringsvolumen og filterporestørrelse er ikke undersøgt i denne sammenhæng.

Det skal understreges, at eDNA detektion skal ses som supplement til den konventionelle overvågning af flodperlemusling. eDNA kan anvendes i screeningsundersøgelser efter arten eller til at indsnævre den del af vandløbet, hvor der skal foretages en konventionel eftersøgning. De konventionelle eftersøgninger er stadig nødvendige, da beskyttede arter under EU's Habitatdirektiv skal beskrives både i forhold til populationsstørrelse, aldersfordeling samt reproduktionsevne.

6 Konklusion og perspektivering

Vores undersøgelse viste, at skaller fra flodperlemusling med en alder på 20-30 år ikke frigiver DNA til vandsøjlen, og at skaller med denne alder derfor ikke kan påvises med nuværende eDNA teknikker. Resultaterne viste, at eDNA teknikken kan påvise flodperlemuslinger, der er levende eller nyligt afdøde, hvor nedbrydningen af bløddelene stadig pågår. Givet Stoeckle et al. (2016) ikke kunne påvise eDNA fra flodperlemusling i vandprøver indsamlet 500 m nedstrøms en population af flodperlemuslinger, kunne resultaterne af Andersen & Wiberg-Larsen (2015), der påviste flodperlemusling på to lokaliteter i Varde å adskilt > 6.000 m antyde, at der evt. fandtes mindst to levende (eller nyligt afdøde) populationer af flodperlemusling i Varde å.

Med tanke på den forventede rumlige specificitet af eDNA detektioner ift. den faktiske placering af flodperlemuslingpopulationer i vandløbssystemer, kan eDNA metoden især anvendes til at indsnævre området, hvor der skal foretages en konventionel eftersøgning af arten. Der kunne fx placeres prøveindsamlingssteder med 100 m intervaller langs en strækning, hvor flodperlemuslingepopulationerne forventes at befinde sig i Varde å. Hvis eDNA analyseresultaterne sammenlignes kvantitativt, kan dette bruges som rettesnor for fokusering af den konventionelle eftersøgning. En sådan undersøgelse vil samtidig kunne svare mere præcist på, hvor langt målbare mængder af eDNA fra flodperlemusling transporteres nedstrøms i Varde å.

7 Acknowledgements

Flodperlemuslingerne blev indsamlet med uvurderlig hjælp fra Peter Wiberg-Larsen (emeritus Senior rådgiver, AU Bioscience) og Håkan Söderberg (Länsstyrelsen, Sverige). Usikkerhedsberegningerne på eDNA analyserne blev foretaget med vigtig sparing og konceptudvikling af Peter Borgen Sørensen (Seniorforsker, AU Bioscience). Opsætningen af fysiske forhold i strømrønderne blev udført i samarbejde med Johnny Nielsen (laborant, AU Bioscience) og Peter Wiberg-Larsen. Vi takker Marc Anglès d'Auriac (NIVA Norge) for adgang til det anvendte qPCR detektionssystem.

8 Referencer

Agersnap S, Larsen WB, Knudsen SW, Strand D, Thomsen PF, Hesselsoe M, Mortensen PB, Vralstad T, Moller PR (2017). Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS One* 12: e0179261.

Andersen LW & Wiberg-Larsen P. 2017. Undersøgelse af forekomsten af flodperlemusling (*Margaritifera margaritifera*) i Varde å ved brug af eDNA. Videnskabelig rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 224.

Araujo, R. & Ramos, M.A. (2000) Action plan for *Margaritifera margaritifera* in Europe. Council of Europe. T-PVS (2000) 10: 1-38. Strasbourg.

Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, Renshaw MA, Chadderton WL, Lodge DM. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science & Technology* 48: 1819-1827.

Bauer G. 1986. The status of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. in the south of its European range. *Biological Conservation* 38: 1-9.

Fredshavn J, Søgaard B, Nygaard B, Johansson LS, Wiberg-Larsen P, Dahl K, Sveegard, Galatius A. Teilman J. 2014. Bevaringsstatus for naturtyper og arter. Habitatdirektivets artikel 17 rapportering. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi. 54s.

Geist J, Wunderlich H, Kuehn R. 2008. Use of mollusk shells for DNA-based molecular analyses. *Journal of Molluscan Studies* 74: 337-343.

Henley F, Grobler PJ, Neves RJ. 2006. Non-invasive method to obtain DNA from freshwater mussels (*Bivalvia: Unionoidae*). *Journal of Shellfish Research* 25: 975-977.

Fremier AK, Strickler KM, Parzych J, Powers S, Goldberg CS. 2019. Stream transport and retention of environmental DNA pulse releases in relation hydro-morphic scaling factors. *Environmental Science & Technology* 53: 6640-6649.

IUCN (2016) The IUCN Red List of Threatened Species. *Margaritifera margaritifera* (Freshwater Pearl Mussel). <http://www.iucnredlist.org/details/12799/0>

Kann O. 2006. Varde å, Ribe Amt, gensnoning og udlægning af gydebanker. Pp. 67-70 i Madsen S & Debois P (Red.) Vandløbsrestaurering i Danmark - 24 eksempler. Storstrøms Amt, Teknik- og Miljøforvaltningen, 97s.

Knudsen SW, Ebert RB, Hesselsoe M, Kuntse F, Hassingboe J, Mortensen PB, Thomsen PF, Sigsgaard EE, Hansen BK, Nielsen EE, Moller PR (2019) Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 510: 31-45.

Mauvisseau Q, Davy-Bowker J, Bulling M, Brys R, Neyrinck S, Troth C, Sweet M (2019). Combining ddPCR and environmental DNA to improve detection capabilities of a critically endangered freshwater invertebrate. *Scientific Reports* 9: 14064.

Mollusk Specialist Group (1996) *Margaritifera margaritifera*. The IUCN Red List of Threatened Species 1996: e.T12799A3382532.

Neif EM, Graeber D, Rodrigues L, Rosenhoj-Leth S, Jensen TM, Wiberg-Larsen P, Landkildehus F, Riis T, Baattrup-Pedersen A (2017) Responses of benthic algal communities and their traits to experimental changes in fine sediments, nutrients and flow. *Freshwater Biology* 62: 1539-1550.

Porsgaard J. 2015. Flodperlemuslingen i Varde å. Medieudvalget i VSF. <http://varde-sportsfiskerforening.di/flodperlemusling-varde-aa/>

Reis J. 2003. The freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) (Bivalvia, Unionoida) rediscovered in Portugal and threats to its survival. *Biological Conservation* 114: 447-452.

Stoeckle BC, Kuehn R, Geist J. 2015. Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.): a substitute for classical monitoring approaches? *Aquatic Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 1-9.

Sørensen PB, Andersen LW, Panitz F, Wiberg-Larsen P, Damgaard CF. (submitted) Avoiding the pitfall of false positives in monitoring using eDNA

Wacker S, Fossøy F, Larsen BM, Brandsegg H, Sivertsgård R, Karlsson S. 2019. Downstream transport and seasonal variation in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) eDNA concentration. *Environmental DNA* 1: 64-73.

Wiberg-Larsen P. 2012. Artsovervågning af flodperlemusling (*Margaritifera margaritifera*). Teknisk anvisning nr. V12.