

Forekomst af dyndsmerling undersøgt med eDNA screening

Notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 3 marts 2020 | **22**



AARHUS
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Datablad

Notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

Titel:	Forekomst af dyndsmerling undersøgt med eDNA screening
Forfattere:	Jes Jessen Rasmussen ^{1,2} , Liselotte Wesley Andersen ¹ , Søren Nøhr Thomsen ³ , Morten Lauge Fejerskov ³ , Martin Hesselsøe ³ , Michael Deacon ⁴
Institution:	¹ Aarhus Universitet, Institut for Bioscience ² Nuværende affiliation: NIVA Danmark, Njalsgade 76, 2300 København S ³ NIRAS A/S ⁴ Miljøstyrelsen
Faglig kommentering: Kvalitetssikring, DCE:	Torben Linding Lauridsen Signe Jung Madsen
Ekstern kommentering:	Miljøstyrelsen. Kommentarerne findes her: http://dce2.au.dk/pub/komm/N2020_22_komm.pdf
Rekvirent:	Miljøstyrelsen
Bedes citeret:	Rasmussen, J.J., Andersen, L.W., Thomsen, S.N. Fejerskov, M.L., Hesselsøe, M. & Deacon, M. 2020. Forekomst af dyndsmerling undersøgt med eDNA screening. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 28 s. – Notat nr. 2020 22 https://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/Notatet_2020/N2020 22.pdf
	Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse
Foto forside:	Søren Nøhr Thomsen
Sideantal:	28

Indhold

Forord	4
Sammenfatning	5
Summary	7
1 Baggrund	9
2 Formål	11
3 Metode	12
3.1 Sølsted mose	12
3.2 eDNA prøveindsamling, filtreringsmetode og udstyr	12
3.3 eDNA analysemetode	12
3.4 eDNA kontroller og standardkurver	13
3.5 eDNA – Ct, LOD og LOQ	14
3.6 Fase 1 – Screeningundersøgelse i Sølsted mose	14
3.7 Fase 2 – Kombineret rusefiskeri og eDNA undersøgelser	15
3.8 Fase 3 – Fortynding af eDNA fra dyndsmøring i vandløb	16
4 Resultater	19
4.1 qPCR analyser	19
4.2 Fase 1 – Screeningundersøgelse i Sølsted mose	19
4.3 Fase 2 – Kombineret rusefiskeri og eDNA undersøgelser	20
4.4 Fase 3 – Fortynding af eDNA fra dyndsmøring i vandløb	21
4.5 Usikkerhedsberegninger	22
5 Diskussion	23
5.1 Fase 1	23
5.2 Fase 2	23
5.3 Fase 3	24
6 Konklusion	25
7 Acknowledgements	26
8 Referencer	27
9 Bilag	28

Forord

Denne rapport udgives af DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, Aarhus Universitet (DCE) som afsluttende produkt i et projekt om eDNA fra dyndsmørling. Rapporten omfatter data indsamlet gennem feltarbejde udført i 2019, og skal ses som en undersøgelse, der kan danne grundlag for vurdering af anvendelsen af eDNA metoder til screeningundersøgelser efter dyndsmørling i overvågningsprogrammet (NOVANA).

Projektet er gennemført i samarbejde mellem Aarhus Universitet (AU), NIRAS A/S og Miljøstyrelsen (MST). AU har forestået projektbeskrivelse og ansøgning. Feltarbejdet er udført efter projektbeskrivelsen af både AU, NIRAS A/S og MST. NIRAS A/S har udført prøvetagning af vandprøver til eDNA analyse og har i samarbejde med Eurofins Miljø A/S analyseret alle prøver for spor af eDNA. Alle projektdeltagere har set og diskuteret resultater og ramme for rapportskrivning, mens selve rapportskrivningen er udført i samarbejde mellem AU og NIRAS A/S. AU har alene haft ansvaret og beslutningsrettighed for rapportens indhold, fortolkninger af data samt faglige anbefalinger. Dog er alle projektdeltagere enige om rapportens indhold.

Sammenfatning

Dyndsmerlingen (*Misgurnus fossilis*) findes i Danmark kun i Sølsted mose og muligvis ved Magisterkøgen, og arten er rødlistet som kritisk truet. Arten er opført på Habitatdirektivets Bilag II, som omfatter arter, for hvilke der skal udlægges særlige beskyttelsesområder. Derfor er der også en direktivmæssig forpligtelse for Danmark til at beskrive bevaringsstatus for dyndsmerling.

Dyndsmerlingens habitater er stillestående eller langsomt flydende ferskvand med mudret bund, hvilket tidligere forekom naturligt i form af småsøer og afsnørede meanderbuer i forbindelse med vandløbssystemer med lavt fald. I stærkt udnyttede landskaber som det danske, hvor de naturligt forekommende habitater ikke længere er tilgængelige, kan egnede habitater opstå i kunstige dræningskanaler som fx i Sølsted mose.

I henhold til direktivforpligtelserne om beskrivelse af dyndsmerlings bevaringsstatus, har forskellige fangstmetoder været anvendt i forsøget på at beskrive artens udbredelse og populationsstørrelse. Disse fangstmetoder har imidlertid vist sig ineffektive og er samtidig omkostningstunge. Som alternativ til de traditionelle fangstmetoder har anvendelsen af miljøDNA (eDNA) været foreslået i artsovervågningen af dyndsmerling, og metoden har været succesfuldt afprøvet i Sølsted mose. Med sigte på at implementere eDNA i artsovervågningen af dyndsmerling (screeningsundersøgelser af artens udbredelse på lokaliteter, hvor artens levebetingelser er opfyldt) er der behov for at konkretisere prøvetagningsstrategi og -indsats.

Formålet med dette projekt er at vurdere potentialet for eDNA som supplement til den traditionelle artsovervågning for dyndsmerling. Det undersøges med hvilken afstand fra eDNA kilden vandprøver skal indsamles for at påvise eDNA koncentrationer over detektionsgrænsen. Yderligere er det en del af formålet at udarbejde en teknisk anvisning for anvendelsen af eDNA i overvågning af dyndsmerling. Denne tekniske anvisning udarbejdes i samarbejde med Miljøstyrelsen efter udgivelsen af denne rapport.

I projektets fase 1 blev to artsspecifikke eDNA detektionssystemer evalueret på vandprøver indsamlet fra Sølsted mose. Fase 2 blev udført parallelt med Tønder kommunes rusefiskeri i Sølsted mose, hvor der blev indsamlet vandprøver med varierende afstand til ruser, hvor der var fanget dyndsmerling. I fase 3 blev der doseret vand med eDNA fra dyndsmerling til et vandløb, hvor dyndsmerling ikke findes. Der blev indsamlet vandprøver til eDNA analyse med forskellig afstand til denne kendte kilde til eDNA.

Resultaterne fra fase 1 viste, at de to detektionssystemer gav sammenlignelige resultater, dog med et stærkere eDNA signal i MisfosCB systemet, hvilket derfor blev anvendt i projektets fase 2 og 3. I fase 2 blev der påvist DNA fra dyndsmerling på tre ud af fire prøvetagningssteder, hvor dyndsmerling blev fanget for vandprøver indsamlet lige ved ruser. Der var imidlertid ikke noget systematisk mønster for aftagende eDNA koncentration med stigende afstand til ruserne. Disse resultater indikerer flere kilder til eDNA fra dyndsmerling i kanalsystemerne, udover der hvor ruserne er placeret. I fase 3 blev der detekteret eDNA fra dyndsmerling på alle prøvetagningssteder (15, 70 og 200 m fra eDNA kilden). Der var ingen tydelig negativ sammenhæng mellem den gennemsnitlige koncentration og afstand til eDNA kilden, men spredningen på

målingerne steg med stigende afstand, hvilket understreger stigende behov for flere indsamlede prøver fra samme lokalitet med stigende afstand til eDNA kilden.

På baggrund af vores undersøgelse konkluderer vi, at eDNA metoden (detektionssystemet MisfosCB) er velegnet til påvisning af dyndsmøling. Hvis prøvetagning til eDNA analyser udføres netop på det sted i vandløbet, hvor arten findes, så vil prøven i langt de fleste tilfælde være positiv. Resultaterne viste dog også vigtigheden af at udtage flere vandprøver per prøveindsamlingssted for at påvise arten, hvis man ikke ved, hvor dyrene præcis forekommer. Behovet for flere vandprøver per prøveindsamlingssted stiger med stigende afstand til kilden til eDNA.

For at estimere risikoen for falske positive prøver ved qPCR analyserne blev der medtaget et stort antal negative prøver, hvor der ikke blev tilsat DNA template. Hertil blev der benyttet en sandsynlighedsfordelingsfunktion (Betafordeling). Under antagelse af at risikoen for kontaminering af hhv. negative kontroller og prøver kan anses for at være ens, blev sandsynligheden for at en positiv påvisning er falsk estimeret til en maksimal risiko på 2,5% dvs når 1 ud af 3 vandprøver er positiv. Baseres konklusionen på 2 positive ud af 3 vandprøver blev risikoen for falsk positiv mindre ($2,5\% \times 2,5\% = 0,1\%$).

På baggrund af resultaterne anbefales en prøvetagningstæthed på højst 200 m mellem hvert prøvetagningssted i vandløb med rindende vand, mens denne prøvetagningstæthed bør mindskes yderligere, når kanalsystemer med stillestående vand undersøges for forekomst af dyndsmøling. Ved hvert prøvetagningssted bør der udtages mindst 3 vandprøver. Med en afstand til eDNA kilden på 200 m i vandløbet ved Obbekær enge (fase 3) var 1 ud af 3 (33%) vandprøver negative for eDNA. Ved udtagning af tre vandprøver 200 m fra kilden opnås i denne situation en risiko for falsk negative resultater (dvs. alle tre vandprøver er negative) på ca. $33\% \times 33\% \times 33\% = 4\%$. Det understreges, at disse anbefalede retningslinjer kun er gældende for dyndsmøling og ikke for eDNA undersøgelser af andre arter.

Usikkerhedsberegningerne viste, at der med det givne store antal negative kontroller som er medtaget, opnås en stor sikkerhed for, at undgå falske positive eDNA signaler (dvs. at arten findes, hvor de positive prøver er udtaget). For at øge troværdigheden af eDNA resultater anbefales sådanne usikkerhedsestimater udført generelt. Når eDNA fra en art påvises med qPCR i områder og på lokaliteter, hvor arten ikke tidligere er kendt, bør qPCR produkterne sekventeres for verifikation af arten.

Summary

In Denmark, the weather loach (*Misgurnus fossilis*) only occurs in Sølsted mose and possibly Magisterkogen. The weather loach is a redlisted fish species and is additionally listed on Appendix II of the European Habitats Directive. Hence, member states have a legally binding obligation to protect and assess the conservation status of the weather loach.

The weather loach prefers habitats characterized by still or slow flowing freshwater systems with substrates dominated by mud and silt. Such conditions previously occurred in form of small ponds and ligated meanders often located in stream systems with low slope. However, in strongly utilized landscapes (such as in Denmark), these types of habitats are extremely rare. Instead, artificial drainage canals (e.g. in Sølsted mose) can sometimes provide similar habitats.

In order to assess the conservation status of the weather loach, documentation of population distribution and population size is needed. Various conventional catch methods have been applied to provide this type of data, although none of these conventional methods have proved to be sufficiently effective. A suggested alternative to the conventional catch methods is environmental DNA (eDNA) which was used to document the presence of weather loach in Sølsted mose in 2015. In order to implement eDNA in the species monitoring program for weather loach (screening surveys to map geographical population distributions), there is a need for detailed quantitative and qualitative descriptions of sampling methods.

In this project, we aimed to assess the applicability of eDNA methods as supplement to the conventional catch methods. We investigated relationships between eDNA signal strength and distance to the eDNA source and how this was influenced by sampling intensity. As part of the project, the currently available technical guidance document for monitoring populations of weather loach will be updated so that it contains estimated best practice of eDNA methods. This technical guidance document will be updated in collaboration with Danish Environmental Protection Agency (EPA) after the project report has been published.

In phase 1 of the project, we tested two species specific eDNA detection systems using water samples collected in Sølsted mose. Phase 2 was conducted in parallel to a conventional net fishing survey conducted by Tønder municipality, and we collected water samples with different distance to net locations (containing weather loach). In phase 3, we added freshwater containing eDNA from weather loach to a stream system with no records of weather loach populations. We collected water samples for eDNA analysis with different distance to this known eDNA source.

Results from phase 1 showed that the two different detection systems provided comparable results, although the MisfosCB system generally provided strongest signals. Consequently, the MisfosCB system was consistently used in project phases 2 and 3. In project phase 2, we found DNA from weather loach in samples collected at 3 out of 4 different locations. We found no systematic pattern showing decreasing eDNA concentration with increasing distance to fishing nets. The results indicate that multiple sources of eDNA were

present in Sølsted mose apart from the individuals located inside the fishing nets. In phase 3, we detected eDNA from weather loach on all sampling sites (15, 70, and 200 m from the eDNA source). However, we found no clear negative correlation between eDNA concentration and distance to the eDNA source, but the data variance among samples collected at the same location increased with increasing distance to the eDNA source. This shows an increasing to increase sample number with increasing distance to the eDNA source.

Based on our results, we conclude that eDNA (MisfosCB detection system) was appropriate for detecting weather loach. If water sampling is conducted within few meters of weather loaches, the eDNA analysis will be positive in the vast majority of cases. However, the results also revealed the importance of increasing number of water samples with increasing distance to the eDNA source.

In order to estimate the risk of false positive results using qPCR we included multiple negative control samples. Assuming an equal risk of contaminating negative control samples and samples collected in Sølsted mose, we calculated the risk of false positive results is 2.5 % (i.e. when one out of three water samples is positive). In the case of two out of three positive water samples, the risk of false positive results decreases to 0.1 %.

Based on our results, we recommend a distance between water sampling locations of maximum 200 m in streams with running water while this distance should be lowered in artificial drainage canals with little or no water movement. A minimum of three water samples should be collected at each sampling location. Based on the results from phase 3, the risk of getting false negative results when collecting three water samples at a distance of 200 m to the eDNA source (i.e. all three water samples negative) is approximately 4%. We emphasize that these recommended guidelines are specific for weather loach and cannot be applied to eDNA surveys for other species in other systems.

Our uncertainty estimates showed that the application of multiple negative controls leads to a high certainty of avoiding false positive results (i.e. that species does exist where the sample results are positive). In order to increase credibility of eDNA surveys, we recommend that such thorough evaluations of the risk of getting false positive results should be consistently included in future surveys and studies. When eDNA from a species is detected using qPCR in places with no previous occurrence records, the qPCR products should be sequenced in order to verify the results.

1 Baggrund

Dyndsmerlingen (*Misgurnus fossilis*) er oprindeligt hjemmehørende på det Europæiske kontinent. Arten er i stærk tilbagegang især i Central- og Nord-europa (Hartvich et al. 2010). I Danmark findes kendte bestande af dyndsmerling kun i Sølsted mose og muligvis ved Magisterkogen, og arten er rødlistet som kritisk truet (Møller et al. 2012; Sigsgaard et al., 2015). Tidligere har dyndsmerlingen forekommet i Vidå-systemet, hvor den dog ikke forventes at findes mere. Arten er opført på Habitatdirektivets Bilag II, som omfatter arter, for hvilke der skal udlægges særlige beskyttelsesområder. Derfor er der også en direktivmæssig forpligtelse for Danmark til at beskrive bevaringsstatus for dyndsmerling.

Dyndsmerlingens habitater er stillestående eller langsomt flydende ferskvand med mudret bund, hvilket tidligere forekom naturligt i form af småsøer og afsnørede meanderbuer i forbindelse med vandløbssystemer med lavt fald (Hartvich et al. 2010). Alle størrelsesgrupper af dyndsmerling er knyttet til den akvatiske vegetation, hvor den også lægger æg. Arten undgår som udgangspunkt områder med blotlagt substrat uden vegetation. Uden for ynglesæsonen (april til juni) forefindes dyndsmerling typisk dybt nedgravet (20-30 cm) i det mudrede sediment, men er muligvis nataktive (Hartvich et al. 2010). I stærkt udnyttede landskaber som det danske, hvor de naturligt forekommende habitater ikke længere er tilgængelige, kan egnede habitater opstå i kunstige dræningskanaler som fx i Sølsted mose.

I henhold til direktivforpligtelserne om beskrivelse af dyndsmerlings bevaringsstatus, har forskellige fangstmetoder været anvendt i forsøget på at beskrive artens udbredelse og populationsstørrelse. Delvist grundet dyndsmerlings kryptiske biologi har disse fangstmetoder (elektrofiskeri og rusefiskeri) vist sig ineffektive til fangst af dyndsmerling og er samtidig omkostnings-tunge. Som alternativ til de traditionelle fangstmetoder har anvendelsen af miljøDNA (eDNA) været foreslået i artsovervågningen af dyndsmerling.

eDNA fra dyndsmerlingen er tidligere eftersøgt ved en screening i Sølsted mose og lokaliteter med historisk forekomst af arten. Denne undersøgelse viste en række detektioner af eDNA fra dyndsmerling i Sølsted mose, som blev rapporteret positive (Sigsgaard et al. 2015). Efterfølgende udførte Tønder Kommune elektrofiskeri og rusefiskeri efter dyndsmerling i Sølsted mose og fandt 8 individer af arten. Dette giver anledning til at undersøge, i hvilket omfang eDNA kan supplere de nuværende metoder til artsovervågning af dyndsmerling i Danmark.

Den omtalte screening af eDNA fra dyndsmerling i Sølsted mose i 2015 viste meget lave koncentrationer af eDNA (Sigsgaard et al. 2015). Undersøgelserne dengang var baseret på analyse af eDNA fra kun 15 ml mosevand. Siden da er der udviklet nye metoder til opkoncentrering, filtrering og fiksering af vand indsamlet i felten. Det må forventes, at disse metoder kan forbedre detektion af dyndsmerling eDNA sammenlignet med undersøgelserne i 2015. Det er derfor vigtigt at afprøve de nyeste muligheder for at opkoncentrere eDNA fra en vandprøve. Det er ligeledes vigtigt at udføre analyserne således, at man systematisk kan vurdere resultaterne i forhold til en fastlagt detektionsgrænse for koncentrationen af artsspecifikt eDNA.

Med sigte på at implementere eDNA i artsovervågningen af dyndsmerling (screeningsundersøgelser af artens udbredelse på lokaliteter, hvor artens levebetingelser er opfyldt) er der behov for at konkretisere prøvetagningsstrategi og -indsats. Dette er vigtigt, da en utilstrækkelig indsamling af vandprøver til eDNA undersøgelse kan medføre falske negative resultater. Med andre ord er det vigtigt, at prøveindsamlingsstrategien så vidt muligt er dækkende i forhold til den pågældende lokalitet, så sandsynligheden for, at en faktisk forekommende population af dyndsmerling også detekteres i form af positive eDNA signaler i vandprøverne. Helt konkret bør det derfor overvejes, hvor tætmasket prøvetagningsnettet skal være for at optimere sandsynligheden for at opnå positive eDNA signaler i vandprøver, der indsamles fra lokaliteter, hvor dyndsmerling faktisk forekommer.

2 Formål

Formålet med dette projekt er at vurdere potentialet for eDNA som supplement til den traditionelle artsovervågning for dyndsmerling. Til projektet anvendes de nyeste prøveindsamlings-, konserverings- og analysemetoder baseret på artsspecifik qPCR detektion. Det undersøges, med hvilken afstand fra eDNA kilden vandprøver skal indsamles for at påvise eDNA koncentrationer over detektionsgrænsen. Yderligere er det en del af formålet at udarbejde en teknisk anvisning for eDNA overvågning af dyndsmerling som supplement til den traditionelle artsovervågning af dyndsmerling. Denne tekniske anvisning udarbejdes i samarbejde med Miljøstyrelsen efter udgivelsen af denne rapport.

Projektets prøvetagning og analyser er opdelt i tre faser:

- I fase 1 blev to artsspecifikke eDNA detektionssystemer anvendt til eftersøgningen af eDNA fra dyndsmerling i Sølsted mose.
- I fase 2 blev der udført rusefiskeri (af Tønder kommune) på en række lokaliteter i Sølsted mose. Der blev indsamlet vandprøver til eDNA analyse ved og omkring de ruser, hvor der var fanget dyndsmerling.
- I fase 3 blev der doseret vand med eDNA fra dyndsmerling til et vandløb, hvor dyndsmerling ikke findes. Der blev indsamlet vandprøver til eDNA analyse med forskellig afstand til denne kendte kilde til eDNA.

3 Metode

3.1 Sølsted mose

Sølsted mose dækker et areal på cirka 240 Ha og består primært af højmoser med indlejrede småsøer og gamle dræningskanaler. I perioden 2010-2016 blev der udført et omfattende restaureringsarbejde, hvor dræningen er ophørt, og birk og andre træer er blevet ryddet. Herved er det søgt at genskabe den oprindelige vandstand og stoppe tilgroningen af området. De fleste af dræningskanalerne er forbundet med hinanden og har permanent vand, om end vandstanden varierer med årstiden.

3.2 eDNA prøveindsamling, filtreringsmetode og udstyr

På hver lokalitet (Figur 1) blev der indsamlet vand i engangs plastikflasker monteret på et træskaft. Indsamling blev så vidt muligt udført uden at skabe fysisk forstyrrelse og ophvirvling af sediment fra bunden.

Ved indsamling af vandprøver blev NIRAS udstyr til trykassisteret filtrering (PAF) og tilhørende sampling kit anvendt. 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, 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 straks lagt på tøris, og opbevaret i ubrudt frysekæde frem til analyse.

Der blev i enkelte prøver under projektets fase 1 anvendt en anden fikseringsmetode uden straksfrysning på tøris. Efter at overskydende vand blev fjernet fra filtret, blev der tilsat 0,8 ml ATL buffer (Qiagen GmbH, Germany), til fiksering af prøven. Denne blev derefter opbevaret ved stuetemperatur i op til 24 timer, hvorefter prøverne blev nedfrosset indtil analyse.

Ved indsamling af hver vandprøve blev det registreret, hvor stort volumen, der var passeret gennem filtret. Filtreringsvolumen afhænger af mængde og størrelse af partikler i vandet. Oplysning om filtreret volumen er væsentlig ved eventuel kvantitativ sammenligning af resultaterne fra de enkelte prøver. Generelt blev der filtreret 290-800 mL vand per prøve.

3.3 eDNA analysemetode

DNA ekstraktion og qPCR analyse blev udført efter en fortrolig protokol, som er udviklet i et forskningssamarbejde med Københavns Universitet. Hovedparten af metoden er 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 to forskellige artspecifikke qPCR assays rettet mod dyndsmørling. MFCB (Thomsen et al. 2012, samme assay som anvendt af Sigsgaard et al., 2015) og MisFosCB (upubliceret, udviklet og testet i samarbejde mellem Amphi Consult/nu NIRAS og Københavns Universitet). I udviklingsarbejdet er alle nødvendige test for MisFosCB (*in silico* analyse, *in vitro* test og *in vivo* test) allerede færdigudviklet og afprøvet, men endnu ikke publiceret. Begge assays blev anvendt i fase 1. Baseret på resultaterne fra fase 1 blev MisFosCB anvendt som det eneste assay til de efterfølgende faser (fase 2 og 3).

3.4 eDNA kontroller og standardkurver

Hver af de artsspecifikke analyser omfattede, ud over de ukendte prøver fra naturen, dels negative kontroller (uden DNA) og dels positive kontroller med DNA fra dyndsmørling, 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 falsk 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 imidlertid ikke stor sandsynlighed for, at det netop er blandt disse få negative kontroller, at der vil forekomme en kontaminering. Det kan aldrig udelukkes, at den næste negative kontrol (udover de to til fire som er medtaget), vil vise en kontaminering. Dvs. eventuel kontamineringen kan forblive 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 øget antallet af negative kontroller og benyttet nedenstående metode til at evaluere kontamineringsrisikoen i forbindelse med laboratorie-analysen. Med denne metode beregnes sandsynligheden for at få falske positive.

Resultatet af PCR-analyserne er binomialfordelt; dvs. der er 2 udfald – enten er prøven positiv, eller den er negativ. Derfor er det muligt at beregne sandsynligheden for mulige falsk positive prøver. I det omfang risikoen for kontaminering af hhv. negative kontroller og prøver kan anses for at være ens, så 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.

Risikoen for falsk positive antages at være uafhængig af sampling, så risikoen for at have z falske positive blandt n prøver er binomial fordelt. Imidlertid er p værdien ukendt. Derfor er det nødvendigt at teste antal negative kontroller for at kunne estimere p . Når man har resultater, der giver værdier for henholdsvis z og n , kan fordelingen af p estimeres ved hjælp af en sandsynlighedsfordelingsfunktion (Betafordeling, se Forbes et al. 2011). Derfor er risikoen eller sandsynligheden, P , for at have m falske negative ud af l prøver:

$$\text{Ligning 1: } P = \int_0^1 \text{Bin}(m, l, p) \cdot \text{Beta}(z + 1, n - z + 1, p) dp$$

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 mellem prøverne.

3.5 eDNA – Ct, LOD og LOQ

Resultater fra qPCR analyser angives i Ct værdier. Ct angiver antal amplifikations-cycler, 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 2019). Dette indebærer en klar definition af LOD og LOQ. LOD defineres ud fra standardkurven. Standardkurven er baseret på en fortyndingsserie af DNA ekstraheret fra dyndsmerling opdrættet ved Hvilested Dambrug, Kolding. 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 nedenstående. Resultaterne vurderes både ud fra de tekniske replikater (3 gentagelser af én biologiske prøve) og ud fra de biologiske replikater (3 særskilte vandprøver fra hvert prøvested).

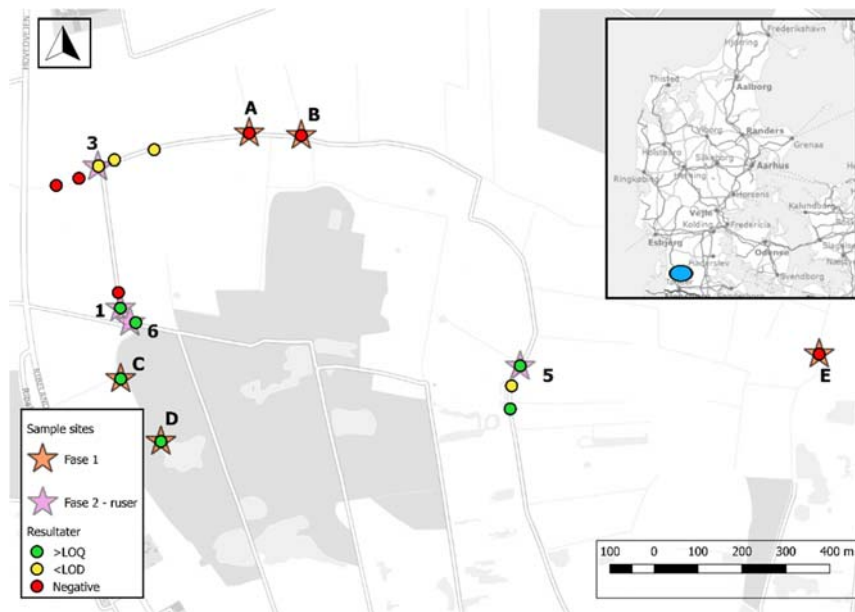
Den gule kategori omfatter prøver med resultater, som ikke er reproducerbare (fx nogle gentagelser er negative og nogle er positive) og resultater, som ligger under detektionsgrænsen (LOD). Data fra gule prøver skal altså fortolkes med stor forsigtighed. De grønne prøver er positive. Positive prøver 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).

3.6 Fase 1 – Screeningundersøgelse i Sølsted mose

Prøveindsamlingslokaliteterne blev udvalgt med udgangspunkt i tidligere eDNA undersøgelse i Sølsted mose (Sigsgaard et al. 2015), hvor der blev rapporteret eDNA signaler på fem lokaliteter. Disse lokaliteter blev genbesøgt i fase 1. På hver af de fem lokaliteter blev der indsamlet tre vandprøver til analyse. I alt blev der således indsamlet og analyseret 15 vandprøver i projektets fase 1. Prøverne blev indsamlet d. 21/5-2019, og eDNA spor fra dyndsmerling blev eftersøgt med de to detektionssystemer (MisFosCB og MCFB). Fordelingen af prøvelokaliteter i Sølsted mose ses på Figur 1 (A-D).

Figur 1. Oversigt over prøveindsamlingslokaliteter i Sølsted mose for projektets fase 1 og 2. Farver på runde symboler angiver resultatet af eDNA analysen.



3.7 Fase 2 – Kombineret rusefiskeri og eDNA undersøgelser

I fase 2 blev prøvetagning udført i tilknytning til den befiskning efter dynd-smerling, som blev udført af Tønder Kommune i 2019 (resultater endnu ikke publiceret). Formålet var at undersøge forekomst af eDNA i vandet på varierende afstand af de dokumenterede forekomster af dynd-smerling, kortlagt ved den konventionelle undersøgelser med ruser.

Tønder Kommune udvalgte placeringer af 6 ruser til indfangning af dynd-smerling. Placeringen af ruserne var ikke baseret på resultaterne fra fase 1. I de ruser, hvor der blev fanget dynd-smerling under befiskningsperioden blev der indsamlet vandprøver som beskrevet ovenfor.

Der blev fanget dynd-smerling i fire ruser (Ruse 1, 3, 5 og 6) (se også Figur 1). Der blev indsamlet 3 vandprøver ved hver af disse fire ruser. Derudover blev der indsamlet 3 vandprøver på en række lokaliteter med varierende afstand til disse ruser. Disse supplerende lokaliteter blev placeret i det tilgrænsende vandområde inden for en strækning på 200 m (100 m op- og nedstrøms ruser) såfremt det var muligt. Flere steder var det imidlertid ikke muligt at tage vandprøver i de ønskede afstande fra de opstillede ruser. Dette skyldtes lav vandstand eller fysiske blokeringer i kanalerne, hvor vandbevægelse igennem eller henover blokeringerne var forhindret. I disse tilfælde blev der taget prøver i de afstande, hvor det var muligt. Der blev i denne del af undersøgelsen taget prøver 11 forskellige steder i mosen, som vist på Figur 1. Alle 11 steder blev der indsamlet 3 vandprøver; i alt blev der således udtaget 33 vandprøver fordelt omkring fire af ruserne. Prøvetagningen er beskrevet i det følgende (se også Figur 1):

- Ruse 1: Ved ruse 1 blev der taget i alt 6 vandprøver (to prøveindsamlingssteder). Dette skyldes det ikke var muligt at tage prøver syd for rusen, og kun muligt at tage 3 vandprøver ved selve rusen og 40 meter nord for rusen.
- Ruse 3: Der blev taget i alt 15 vandprøver (fem prøvetagningssteder), da der ikke var forhindringer i forhold til at tage prøverne i afstande på 50 og 100 meter på både øst- og vestlig side af rusen.

- Ruse 5: Her blev der taget i alt 9 vandprøver (3 prøvetagningssteder). Ved ruse 5 var det ikke muligt at tage prøverne nord for rusens placering, men derimod var det muligt, at tage prøver i 50 og 100 meters afstand syd for rusen.
- Ruse 6: Det var kun muligt at tage vandprøver et sted ved ruse 6 og derfor blev der kun taget tre prøver ved selve rusen på denne lokalitet.

Alle vandprøverne blev indsamlet d. 6/6-2019, og i alle tilfælde var der fanget dyndsmørling i ruserne på de respektive lokaliteter inden for 7 dage forud for prøveindsamlingen. eDNA spor fra dyndsmørling blev eftersøgt i disse prøver ved brug af det detektionssystem, som gav de bedste resultater under fase 1 (MisFosCB).

3.8 Fase 3 – Fortynding af eDNA fra dyndsmørling i vandløb

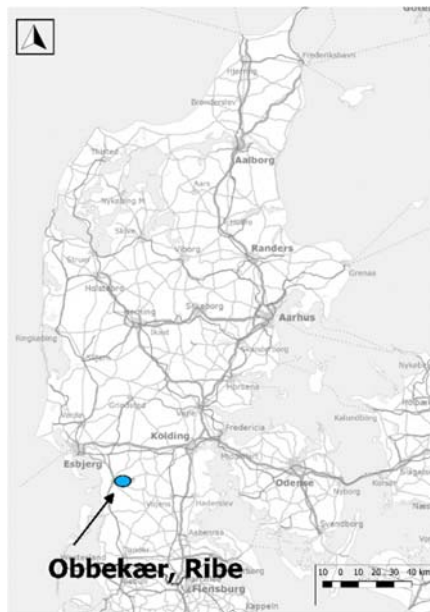
Projektets fase 3 blev udført i et lille kanallignende vandløb ved Obbekær enge, Ribe (Figur 2). Det vides med sikkerhed, at dyndsmørling ikke forekommer i vandløbet. Vandløbet blev udvalgt da dets fysiske udformning minder om Sejersbæk i Sølsted Mose i forhold til bundforhold og vandføring. Der blev udvalgt en strækning uden tilløb på cirka 200 m, idet tilløb vil hindre beregninger på fortynding af eDNA langs strækningen.

For at opnå en høj koncentration af eDNA fra dyndsmørling blev der anvendt en 1000 L PVC tank fyldt med vand. Der blev udsat 20 danskopdrættede dyndsmørlinger i størrelsen 3-6 cm i tanken i to døgn for at opnå en høj koncentration af eDNA i vandet. Dyndsmørlingerne blev erhvervet fra Bernt René Voss Grimm ved Kolding (Hvilested dambrug). Efter to døgn blev 1000 L tanken transporteret i bil til forsøgsvandløbet ved Obbekær. Baseret på eDNA koncentrationen målt i akvarie med to dyndsmørlinger (positiv kontrol under fase 1), var den forventede koncentration af eDNA i dette bassin mellem 1000 og 10.000x LOD. Denne forventning er baseret på, at eDNA mængden pr fisk vil være sammenlignelig fra akvariet med 2 dyndsmørlinger pr 123 L til tanken med 20 dyndsmørlinger pr 1000 L. Vandet fra denne tank kaldes i det følgende eDNA-koncentrat.

To dage før tilsætningen af eDNA-koncentrat blev strømhastigheden målt manuelt ved brug af en Ottpro flowmåler, og vandløbets dybde og bredde blev målt. Herved kunne vandføringen beregnes ($B \times D \times U$) til ca. 50 L/s. Det blev tilstræbt at opnå en eDNA startkoncentration i vandløbsvandet på cirka 100x LOD. Derfor blev der valgt en pumpe med pumpevolumen på 0,45 L/s (Grundfoss Unilift KP150 A1 drænpumpe) forsynet med strøm fra en 1000W generator.

Der blev foretaget en vandføringsmåling 3 timer inden tilsætningen af eDNA koncentratet ved tilsætning af 1 kg salt og efterfølgende måling af ledningsevnen i vandløbsvandet 50 m nedstrøms. Ledningsevnen blev målt løbende og tidspunkter for hver måling blev registreret indtil ledningsevnen var tilbage på baggrundsniveau (jf. metodebeskrivelse i Webster & Valett, 2008). Den gennemsnitlige strømhastighed (U) kan beregnes ved brug af integralregning, hvor tiden for 50% af saltet er passeret igennem strækningen kan bestemmes. Den gennemsnitlige vandføring (Q) kan derefter beregnes ($B \times D \times U$). Vandføringsmålingen blev efterfølgende anvendt til at beregne fortyndingskapaciteten på vandløbsstrækningen.

Figur 2. Oversigtskort med placeringen af forsøgsvandløbet ved Obbekær enge, Ribe.



Vi sigtede mod at indsamle vandprøver i vandløbet, hvor det kunne forventes, at eDNA koncentratet var fortyndet med en faktor 100, 1000 og 3000. Her vil det første punkt (faktor 100) svare til tilsætningspunktet af eDNA koncentratet. Det er dog vigtigt for konsistente målinger, at der vælges en afstand til tilsætningspunktet, hvor der kan forventes fuld opblanding.

Hvornår et stof (i dette tilfælde eDNA koncentratet) er fuldt opblandet i vand ved udledning i et vandløb er afhængig af både stoffet og væskens egenskaber samt koncentrationsforholdene og de hydrauliske forhold i det vandløb, hvor stofferne blandes. Dette komplekse samspil har medført opstilling af en række tids- og arealintegrerende modeller, som er relativt komplekse. En fuldstændig modellering af hvorledes opblandingen vil foregå kan fx findes i Aisopou et al. (2015). Her er angivet det fuldstændige ligningskompleks til beskrivelse af opblandingen ved brug af en 2D model. Den fulde model kan skrives som:

$$c(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} c_0(\xi) \sum_{-\infty}^{\infty} \left\{ \operatorname{erf} \left[\frac{y' + \frac{1}{2} + 2n}{\sqrt{(4x' - \xi)}} \right] - \operatorname{erf} \left[\frac{y' - \frac{1}{2} + 2n}{\sqrt{(4x' - \xi)}} \right] \right\} d\xi$$

Hvor $c(x, y)$ er koncentrationen et givet sted (x, y) i vandløbet nedstrøms udledningen og c_0 er den fuldt opblandede koncentration i vandløbet. I modellen er fluxen af stoffet beskrevet som en arbitrær fordelt kilde, hvilket er symboliseret ved brugen af error-funktionen til beskrivelse af koncentrationsfordelingen i modellen (se Aisopou et al. 2015 for flere detaljer). Denne model er anvendelig til en numerisk beskrivelse af et komplekst udbredelsesmønster i et heterogent miljø.

2D modellen viste, at der kan forventes fuld opblanding 15 m nedstrøms udledningspunktet, og at der forekommer en 1000 gange fortynding ved 69,5 meter og 3000 gange fortynding ved 210 meter fra udledningspunktet. 2D modellen har i øvrigt en forventet usikkerhed på cirka 5% på de beregnede værdier. Dertil kommer usikkerhed som skyldes, at modellens forudsætninger ikke altid kan forventes opfyldt. På baggrund af disse resultater blev det besluttet at indsamle vandprøver 15, 75 og 200 m nedstrøms tilsætningspunktet.

Der blev indsamlet 3 vandprøver ved hver af disse punkter samt to fra selve tanken med eDNA koncentrat. Vandprøverne blev indsamlet i vandløbet 30 minutter efter påbegyndt dosering af eDNA-koncentrat for at sikre, at indsamlingen foregik under antagelse af ligevægt. eDNA spor fra dyndsmerling blev eftersøgt i vandprøverne med MisFosCB detektions-systemet.

For fase 3 beregnede vi den relative eDNA koncentration (C-relativ) som følger:

- C-eluat: Standardkurve bruges til at regne koncentration af eDNA fra dyndsmerling i eluatet efter DNA ekstraktion. Eluatet er den DNA opløsning, som er tilbage efter DNA ekstraktionen. Der elueres altid med samme volume ved sidste trin i DNA ekstraktionen. Enheden for denne koncentration svarer til standardkurves enhed.
- C-prøve: Koncentration i prøven. C-eluat normeres i forhold til filtreringsvolumet (V) $C\text{-prøve} = C\text{-eluat} / V$. På den måde beregnes koncentrationen af DNA, som var i prøvetagningslokaliteten.
- C-relativ: $(C\text{-prøve} / \max C\text{-prøve}) \times 100\%$. C-relativ vil være 100% for den af prøverne, som har den højeste eDNA koncentration (max C-prøve). Der er ingen enhed på C-relativ og denne værdi kan bruges direkte til at sammenligne de enkelte prøver kvantitativt. Dog med de generelle forbehold, der gælder for alle kvantitative tolkninger af qPCR resultater.

4 Resultater

4.1 qPCR analyser

Der blev i alt kørt artsspecifikke qPCR analyser på 64 vandprøver (fase 1: 20 vandprøver; fase 2: 22 vandprøver; fase 3: 11 vandprøver). Nummerering af vandprøverne fremgår af Tabel 1, 2 og 3.

DNA ekstraheret fra hver vandprøve er analyseret i 3 tekniske gentagelser. De 20 prøver i fase 1 er hver analyseret med to forskellige qPCR systemer. Der er således udført $(20+20+33+11) \times 3 = 252$ qPCR analyser. Derudover er der analyseret standarder (positive kontroller) og negative kontroller.

LOD og LOQ varierede for de forskellige qPCR-analyser:

- For prøverne 008-016 var LOD = Ct 39,9 og LOQ = Ct 39.
- For prøverne 017-019, 021-022, 024-026, 029-030 + 032 var LOD = Ct 39 og LOQ = Ct 33,5.
- For prøverne 033-035, 042-050, 053-057 var LOD = Ct 37,7, LOQ = Ct 35,6.
- For prøverne 036-041 og 058-067 var LOD = Ct 38,2 og LOQ = Ct 37,35.
- For prøverne i fase 3 var LOD = Ct 38,0 og LOQ = Ct 34,0.

Ct værdier højere end de angivne LOD Ct værdier blev betragtet som negative. Dette svarer til en lavere DNA koncentration end detektionsgrænsen ($< LOD$). Samtidig skal mindst 2 af de 3 tekniske replikater have Ct værdier under LOD, for at prøven bliver betragtet som positiv, dvs. den er reproducerbar.

Tabel 1. Resultater fra qPCR analyserne af vandprøverne indsamlet fra Sølsted mose under fase 1. Ct værdier er angivet for de to forskellige anvendte detektionssystemer (MFCB og MisFosCB) samt en faglig vurdering af analyseresultatet. Alle resultater er gennemsnit af tre tekniske gentagelser.

Prøve ID	Lokalitet	Prøveindsamlingsdato	Ct Avg (MFCB)	Ct Avg (MisFosCB)	Konklusion
008	A	21-05-2019	No Ct	No Ct	NEGATIV
009	A	21-05-2019	No Ct	No Ct	NEGATIV
010	A	21-05-2019	40	38,70	sample<LOD, ikke reproducerbar
011	B	21-05-2019	No Ct	No Ct	NEGATIV
012	B	21-05-2019	No Ct	No Ct	NEGATIV
013	B	21-05-2019	39,8	No Ct	sample<LOD, ikke reproducerbar
014	C	21-05-2019	39,8	39,90	sample<LOD, ikke reproducerbar
015	C	21-05-2019	36,8	34,80	>LOQ
016	C	21-05-2019	38,4	37,80	>LOQ
017	D	21-05-2019	38,3	37,60	>LOQ
018	D	21-05-2019	38,4	37,90	>LOQ, ikke reproducerbar
019	D	21-05-2019	39,2	37,80	>LOQ, ikke reproducerbar
021	D	21-05-2019	38,7	36,40	>LOQ
022	D	21-05-2019	39	38,60	>LOQ, ikke reproducerbar
024	E	21-05-2019			Inhibering af IPC (ingen konklusion)
025	E	21-05-2019			Inhibering af IPC (ingen konklusion)
026	E	21-05-2019			Inhibering af IPC (ingen konklusion)
030	akvarie	22-05-2019	23,6	23,40	>LOQ
029	akvarie	22-05-2019	23,3	23,70	>LOQ
032	akvarie	22-05-2019	24	23,60	>LOQ

4.1 Fase 1 – Screeningundersøgelse i Sølsted mose

Der blev fundet eDNA fra dyndsmørling på to ud af fem lokaliteter i projektets fase 1 (lokalitet C og D, se også Figur 1). På lokalitet C blev der påvist eDNA fra dyndsmørling i to ud af tre prøver, mens der blev påvist eDNA fra dyndsmørling i en ud af tre prøver på lokalitet D (Tabel 1). Én af de to prøver, der blev konserveret med ATL buffer var ligeledes positiv prøve ID 021 (Ct 36,40, >LOQ).

Der blev ligeledes taget vandprøver i et akvarie (123 L) indeholdende to voksne individer af dyndsmørling hos Bernt René Voss Grimm (Kolding). Disse prøver blev taget for at have en positiv reference til de øvrige prøver fra Sølsted Mose. Alle prøver taget i akvariet var positive (prøve ID 029, 030 og 032, Tabel 1).

4.2 Fase 2 – Kombineret rusefiskeri og eDNA undersøgelser

Der blev indsamlet vandprøver ved og omkring ruse 1, 3, 5 og 6 (se Figur 1). Resultaterne fremgår af Tabel 2.

Tabel 2. Resultater fra qPCR analyserne af vandprøverne indsamlet fra Sølsted mose under fase 2. Ct værdier er angivet samt en faglig vurdering af analyseresultatet. Alle resultater er gennemsnit af tre tekniske gentagelser.

Prøve ID	Lokalitet	Prøvetagningsdato	Ct Avg (MisFosCB)	Konklusion
033	Ruse 6	06-06-2019	36,53	>LOD, <LOQ, reproducerbar
034	Ruse 6	06-06-2019	35,30	>LOQ
035	Ruse 6	06-06-2019	35,80	>LOD, <LOQ, reproducerbar
036	Ruse 1	06-06-2019	36,27	>LOQ
037	Ruse 1	06-06-2019	35,70	>LOQ
038	Ruse 1	06-06-2019	35,90	>LOQ
039	Ruse 1, 40m	06-06-2019	39,00	<LOD, reproducerbar
040	Ruse 1, 40m	06-06-2019	38,85	<LOD, reproducerbar
041	Ruse 1, 40m	06-06-2019	39,30	<LOD, reproducerbar
042	Ruse 3	06-06-2019		Ingen Ct
043	Ruse 3	06-06-2019	38,77	<LOD, reproducerbar
044	Ruse 3	06-06-2019		Ingen Ct
045	Ruse 3, 50m	06-06-2019		Ingen Ct
046	Ruse 3, 50m	06-06-2019		Ingen Ct
047	Ruse 3, 50m	06-06-2019	39,10	<LOD, ikke reproducerbar
048	Ruse 3, 100m	06-06-2019		Ingen Ct
049	Ruse 3, 100m	06-06-2019		Ingen Ct
050	Ruse 3, 100m	06-06-2019		Ingen Ct
053	Ruse 3, 50m øst	06-06-2019		Ingen Ct
054	Ruse 3, 50m øst	06-06-2019		Ingen Ct
055	Ruse 3, 50m øst	06-06-2019	37,30	>LOD, <LOQ, ikke reproducerbar
056	Ruse 3, 100m øst	06-06-2019		Ingen Ct
057	Ruse 3, 100m øst	06-06-2019	37,60	>LOD, <LOQ, ikke reproducerbar
058	Ruse 3, 100m øst	06-06-2019		Ingen Ct
059	Ruse 5	06-06-2019		Inhibering af IPC (ingen konklusion)
060	Ruse 5	06-06-2019	34,47	>LOQ
061	Ruse 5	06-06-2019	33,20	>LOQ
062	Ruse 5, 50m	06-06-2019		Inhibering af IPC (ingen konklusion)
063	Ruse 5, 50m	06-06-2019	44,50	<LOD, ikke reproducerbar
064	Ruse 5, 50m	06-06-2019	42,53	<LOD, reproducerbar
065	Ruse 5, 100m	06-06-2019	36,70	>LOQ
066	Ruse 5, 100m	06-06-2019	38,20	>LOD, <LOQ, reproducerbar
067	Ruse 5, 100m	06-06-2019	38,07	>LOD, <LOQ, reproducerbar

Resultatet for ruse 1 viste ved første prøvetagnings-lokalitet (prøve ID 036-038) at der i 3/3 vandprøver (biologiske gentagelser) var en positiv påvisning af DNA fra dyndsmerling (>LOQ, se Tabel 2). Ruse 1, 40m lå for alle de 3 vandprøver (biologiske gentagelser) under grænsen for LOD og blev derfor betragtet som negative.

For ruse 3 (prøverne ID 042-044) blev der påvist positivt signal i 1/3 vandprøver men tæt på detektionsgrænsen (LOD). Derfor anses denne prøve som "måske positiv" (gul kategori). Ved ruse 3, 50m og 100m blev der ikke påvist DNA fra dyndsmerling. For ruse 3, 50m øst og ruse 3, 100m øst blev der i 1/3 vandprøver påvist en "måske positiv" forekomst af eDNA fra dyndsmerling.

Ved ruse 5 (prøve ID 059-061) blev der påvist DNA fra dyndsmerling i 2/3 vandprøver. Den ene prøve var inhiberet (hæmmet DNA signal) og derfor ikke mulig at konkludere på. Ruse 5, 50m blev der i 2/3 vandprøver ikke påvist DNA fra dyndsmerling (<LOD). Den sidste prøve var inhiberet. For ruse 5, 100m blev DNA fra dyndsmerling påvist i alle tre vandprøver, hvilket også blev påvist ved ruse 6. Alle resultater er gengivet i Tabel 2.

4.3 Fase 3 – Fortynding af eDNA fra dyndsmerling i vandløb

Resultatet af qPCR analyserne i fase 3 var alle positive for eDNA fra dyndsmerling (Tabel 3). Dog var tre prøver under LOD og tilhører derfor kategorien "måske positive".

Tabel 3. Resultater fra qPCR analyserne af vandprøverne indsamlet fra vandløb ved Obbekær enge under fase 3. Ct værdier er angivet samt en faglig vurdering af analyseresultatet. Derudover er der angivet relative mængder af eDNA ift. mængden af eDNA i koncentratet.

Prøve ID	Lokalitet	Filtreret volumen	Ct Avg (MisFosCB)	C-relativ. Relativ eDNA koncentration ift. eDNA koncentrat	Konklusion
103	Obbekær Negativ	900		0	Negativ
104	eDNA koncentrat	1475	26,26	100%	>LOQ
105	15 m (x100)	920	37,32	0,014%	>LOD <LOQ
106	15 m (x100)	900	37,79	0,010%	>LOD <LOQ
107	15 m (x100)	1100	37,32	0,012%	>LOD <LOQ
108	70 m (x1000)	800	37,27	0,017%	>LOD <LOQ
109	70 m (x1000)	700	37,09	0,023%	>LOD <LOQ
110	70 m (x1000)	690	39,22	0,003%	<LOD, reproducerbar
111	200 m (x3000)	700	36,92	0,026%	>LOD <LOQ
112	200 m (x3000)	700	38,27	0,008%	<LOD, reproducerbar
113	200 m (x3000)	700	36,68	0,032%	>LOD <LOQ

For de tre prøveindsamlingspunkter (15m, 70m, 200m) i vandløbet ved Obbekær, var den gennemsnitlige relative koncentration af eDNA (C-relativ, beregnet i forhold til eDNA koncentrat fra 1000 L tank med 20 dyndsmerlinger) som følger:

- C-relativ, 15 m: 0,012% (Standardafvigelse 18%)
- C-relativ, 70m: 0,015% (Standardafvigelse 67%)
- C-relativ, 200m: 0,023% (Standardafvigelse 56%).

4.4 Usikkerhedsberegninger

I alt er der analyseret 116 negative kontroller i fase 1 og 2. Af alle de negative kontroller var ingen positive, dvs. $z=0$ og $n=116$. Disse indsættes i Ligning 1 og P estimeres med betafordeling. Værdierne for P når $l = 3$ (antal biologiske gentagelser) er 0,975, 0,024, 0,0004 og $P < 0,0001$ for m (antallet af falske negative prøver) henholdsvis = 0, 1, 2 og 3. Det betyder, at hvis mindst én prøve af de 3 vandprøver taget samme sted antages at være "rigtig" positiv, så er risikoen for at tage fejl (dvs. en falsk positiv) estimeret til $1-0.975= 0.025$. Med denne fremgangsmåde er der altså en maksimal risiko på 2,5% for en falsk positiv, hvis konklusionen alene baseres på en ud af tre vandprøver taget samme sted. Baseres konklusionen på to positive ud af tre vandprøver er den tilsvarende risiko for falsk positiv mindre ($2,5\% \times 2,5\% = 0,1\%$).

5 Diskussion

5.1 Fase 1

I fase 1 blev fem lokaliteter udvalgt, hvor der i tidligere forsøg af Sigsgaard m.fl. (2015), blev fundet spor af dyndsmørling med eDNA metoden. Der blev fundet spor af dyndsmørling på to ud af de fem lokaliteter. Dette bekræftede, at der stadig findes dyndsmørling i Sølsted Mose, og at disse kan eftersøges med eDNA.

Resultaterne med de to testede detektionssystemer, MFCB (Thomsen et al. 2012) og Assay MisfosCB (Upubliceret), var meget sammenlignelige, idet begge detektionssystemer gav positive resultater på de samme vandprøver. Dog var Ct værdien for MisfosCB lavere (stærkere signal) end for MFCB i 10/12 positive vandprøver. Derfor blev MisfosCB anvendt som detektionssystem i projektets fase 2 og 3.

5.2 Fase 2

På tre ud af fire prøvetagningssteder, hvor dyndsmørlingen blev fanget i ruserne, blev der påvist DNA efter arten i de vandprøver, der blev udtaget lige ved ruserne. Der var ikke nødvendigvis dyndsmørling i ruserne, da vandprøverne til eDNA analyser blev indsamlet, men i alle tilfælde var der fanget dyndsmørling i ruserne inden for 7 dage forud for vandprøvetagning. Ved rusetømning blev fiskene genudsat, hvorefter de naturligt kan vandre op- eller nedstrøms. Dette kan forklare, at der ikke var positive prøver ved ruse 3.

Ved ruse 3 i Sejersbæk var der svag vandstrøm under rusefiskeriet og prøvetagning (egne observationer), mens der kun var stillestående vand ved ruserne 1, 5 og 6 (Figur A1, bilag). Ved ruserne 1, 5 og 6 var der endog så lidt vand, at det ikke kunne lade sig gøre at tage vandprøver med op til 100 m afstand på begge sider af ruserne (se Figur A1, bilag). Der var også en meget svag tendens til fortynding af eDNA signalet i nedstrøms retning fra ruserne, mens prøverne indsamlet i opstrøms retning havde højere eDNA signal (Tabel 2).

Ved ruse 5 var der en lidt stærkere tendens til aftagende styrke i eDNA signalet med stigende afstand fra ruserne, mens der for ruse 1 og 6 ikke var entydige tendenser til ændret signal med stigende afstand fra ruserne (Tabel 2). Disse resultater indikerer flere kilder til eDNA fra dyndsmørling i kanalsystemerne, og ikke bare der hvor ruserne er placeret. Maskevidden i ruserne var cirka 2 cm, hvilket tillader små individer af dyndsmørling at komme igennem, hvorfor de mindste individer af dyndsmørling ikke har været fanget. Disse forhold kan forklare det usystematiske mønster i styrken af eDNA signaler fra dyndsmørling med stigende afstand fra ruserne.

Dog er det sandsynligt, at det meget stærke eDNA signal ved ruse 5 var et resultat af de indfangede individer af dyndsmørling i selve ruserne. Da eDNA signalet med en afstand på 50 m til ruserne samtidig var lavt ($< LOD$), indikerer det både, at der næppe var dyndsmørling 50 m fra ruserne - men også at afstanden mellem prøvetagningssteder i kanalsystemer med stillestående vand bør være ≤ 50 m for at fange eDNA fra tilstedeværende individer.

5.3 Fase 3

Tilsætning af en kendt kilde til eDNA fra dyndsmørling til et kanaliseret vandløb ved Obbekær enge uden øvrige kilder til eDNA gav i udgangspunktet optimale betingelser for at bestemme en fortynding af eDNA med stigende afstand til kilden. På denne måde har eDNA'et ikke været påvirket af den nedbrydning, der normalt forårsages af kanalens biogeokemi, og det har ikke haft mulighed for at blive bundet til partikler i vandfasen. Vi detekterede eDNA fra dyndsmørling på alle prøvetagningssteder (15, 70 og 200 m fra eDNA kilden) med koncentrationer, der var sammenlignelige med prøver indsamlet i Sølsted mose (fase 2). Der var ingen tydelig negativ sammenhæng mellem den gennemsnitlige koncentration og afstand til eDNA kilden. Dette antyder, at eDNA fra dyndsmørling ikke altid opløses homogent i vandvolumet, men i stedet transporteres nedstrøms som større eller mindre aggregater eller faner. Derfor har volumen af den indsamlede/filtrerede vandprøve også stor betydning for sandsynligheden for en positiv påvisning af eDNA fra en given art. Fx viste Wilcox et al. (2016), at sandsynligheden for ikke at kunne påvise fem individer af kildeørred 200 m opstrøms i et vandløb var 2,7% i en 5 l vandprøve, mens denne sandsynlighed steg til 48,4%, hvis der kun blev indsamlet 1 l vand. Dette betyder at filtreringsvolumen, filtrens porestørrelser og antallet af indsamlede vandprøver har en indvirkning på sandsynligheden for påvisning (efter Andersen m.fl. eDNA rapport under revision).

Resultaterne viste, at spredningen i styrken af eDNA signalet (C-relativ) mellem vandprøver steg med stigende afstand til eDNA kilden. Med andre ord skal der et større antal vandprøver til at detektere eDNA ved stigende afstand til eDNA kilden på grund af lavere sandsynlighed for at fange eDNA i en enkelt prøve. I praksis er placeringen af eDNA kilden sædvanligvis ukendt. Der må tages hensyn til dette forhold ved planlægning af prøvetagningstæthed. Disse resultater understøttes af Wilcox et al. (2016), der også har påvist, at akvatiske arter ikke frigiver eDNA i vandet i en konstant mængde. Frigivelsen afhænger dels af størrelsen på individerne samt af deres stress niveau. Samtidig påpeger (Wilcox et al. 2016) vigtigheden af, hvor prøverne bliver udtaget i forhold til, hvor arten befinder sig. Det skyldes at transportafstanden for eDNA er bestemt af partikelstørrelsen, der varierer for eDNA. eDNA kan forekomme i klumper, der fx kan adsorbere til sedimentet, hvilket igen påvirker transport eksistens og nedbrydningstid. Dvs. eDNA er således ikke homogent fordelt i vandet. Det må understreges, at antallet af vandprøver ikke kan erstattes af tekniske replikater i laboratoriet.

Fremier et al. (2019) undersøgte, hvordan vandløbets hydrologi og geomorfologi (slyngninger, topologi, sedimentets kornstruktur mm) påvirker eDNA transport, tilbageholdelse og overlevelse. Undersøgelsen blev udført ved at udlede kontrollerede mængder vand med eDNA indsamlet fra en vandtank med 30kg hvid stør (*Acipenser transmontanus*) i fem forskellige vandløb, hvor arten ikke forekom. Vandløbene blev kortlagt og beskrevet (topologi, vandføring, slyngninger mm), og vandprøverne blev indsamlet på bestemte tidspunkter langs vandløbet. Resultatet viste, at eDNA tilbageholdelsen i vandløbene varierede mellem vandløb. eDNA tilbageholdelsen (retentionen) blev bestemt af, hvor lang tid vandet opholdt sig et bestemt sted samt vand-flowet i overfladen. Dette betød, at eDNA formodentlig tilbageholdes gennem adsorption til biofilm og andre overflader i vandløbslejet. Den bedste geomorfe proxy for eDNA tilbageholdelsen i vandløbet var vandspejlsfaldet nedstrøms. Det betyder, at antallet af prøver, der udtages, bør øges i vandløb med lav hældning eller i vandløb, hvor der er stor forskel i strømhastigheden mellem overflade og bund for at kompensere for tilbageholdelsen af eDNA i den benthiske zone, og der bør i sådanne tilfælde overvejes om, der skal tages prøver af vandløbssedimentet (Fremier et al. 2019).

6 Konklusion

Det kan konkluderes, at eDNA metoden (detektionssystemet MisfosCB) er velegnet til påvisning af dyndsmørling.

Hvis prøvetagning til eDNA analyser udføres inden for få meter ift. det sted i vandløbet, hvor arten findes, så vil prøven i langt de fleste tilfælde være positiv. Resultaterne viste dog også vigtigheden af at udtage flere vandprøver per prøveindsamlingssted for at påvise arten, hvis man ikke ved, hvor dyrene præcist forekommer. Behovet for flere vandprøver per prøveindsamlingssted stiger med stigende afstand til kilden til eDNA.

På baggrund af resultaterne anbefales en prøvetagningstæthed på højst 200 m mellem hvert prøvetagningssted i vandløb med rindende vand, mens denne prøvetagningstæthed bør mindskes yderligere, når kanalsystemer med stillestående vand undersøges for forekomst af dyndsmørling. Dyndermørlingens habitatpræferencer betyder formentlig, at den især vil kunne findes under forhold, der er sammenlignelige med Sølsted mose med ringe vandføring og mudret bund. Derfor vil prøvetagningskravene ift. afstand mellem prøvetagningssteder også skulle afspejle dette, og det bør tydeligt fremgå i en fremtidig indskrivning af eDNA metoden i den tekniske anvisning for overvågning af dyndsmørling. Ved hvert prøvetagningssted bør der udtages mindst 3 vandprøver. Med en afstand til eDNA kilden på 200 m i vandløbet ved Obbekær enge (fase 3) var 1 ud af 3 (33%) vandprøver negative for eDNA. Ved udtagning af tre vandprøver 200 m fra kilden opnås i denne situation en risiko for falsk negative resultater (dvs. alle tre vandprøver er negative) på ca. $33\% \times 33\% \times 33\% = 4\%$. Hvis antallet af vandprøver øges fra 3 til 4 vil denne risiko reduceres til cirka 1% ($33\% \times 33\% \times 33\% \times 33\%$). Denne minimale risiko vil i de fleste tilfælde være tilfredsstillende. Derfor anbefales mindst tre gentagelser og en prøvetagningstæthed på mindst 200 m i vandløb med rindende vand.

Det må understreges, at den anbefalede afstand mellem prøvetagningssteder kun vedrører dyndsmørling og ikke kan overføres direkte til andre arter. Som Sigsgaard et al. (2015) foreslog, kan eDNA metoden benyttes i overvågningen til at få udbredelsesdata for arten, hvor den kan benyttes som et screeningsværktøj til at udpege områder, hvor den konventionelle metode efterfølgende vil kunne påvise artens fysiske tilstedeværelse samt aldersfordeling og reproduktionspotentiale.

Usikkerhedsberegningerne viste, at der med det givne store antal negative kontroller som er medtaget, opnås en stor sikkerhed for, at undgå falske positive eDNA signaler (dvs. at arten findes, hvor de positive prøver er udtaget). Sådanne usikkerhedsestimater anbefales derfor generelt udført som standard, når eDNA benyttes til at påvise forekomst af arter. Derved øges sikkerheden for, at de pågældende resultater er troværdige. Resultaterne bør tillige på udvalgte steder konfirmeres ved sekvensering af PCR produkter. Dette er særligt relevant, hvis eDNA fra en art påvises med qPCR i områder og på lokaliteter, hvor arten ikke tidligere er kendt, så forekomsten ikke alene er baseret på et qPCR-produkt.

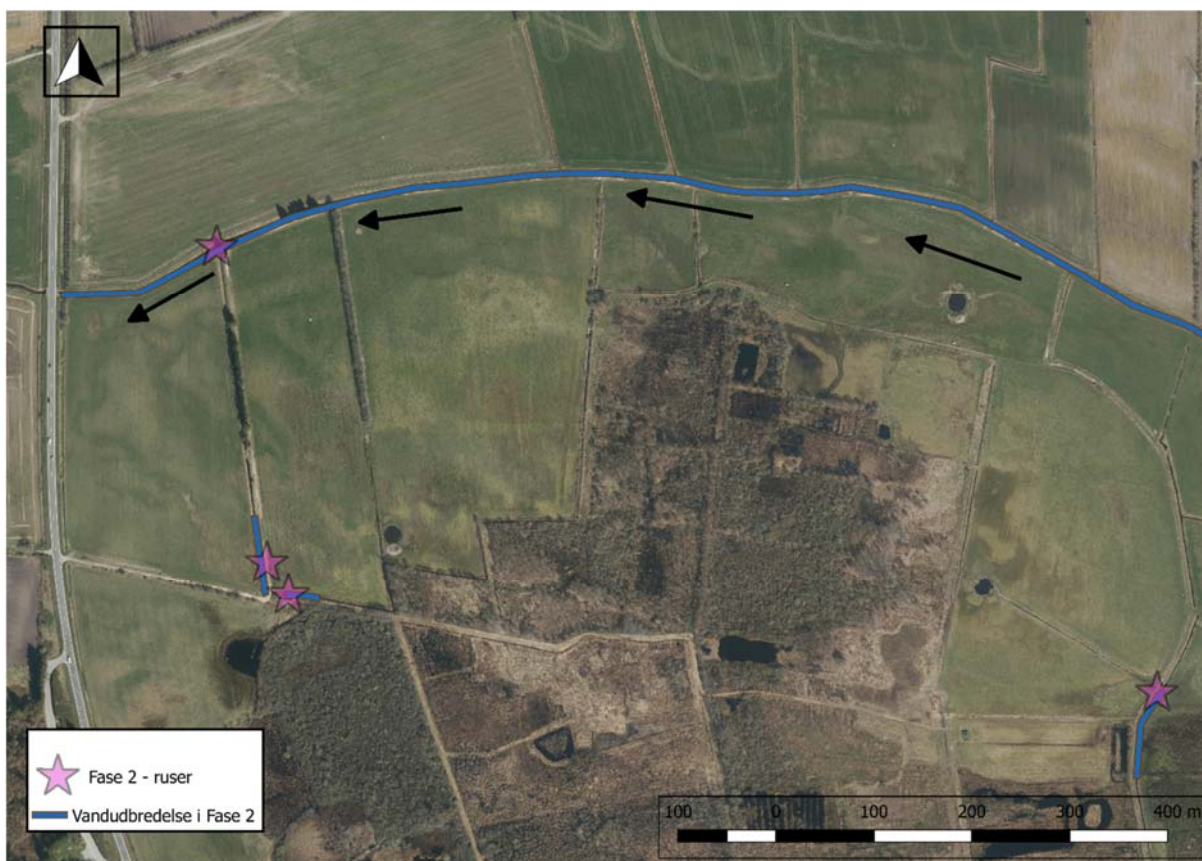
7 Acknowledgements

Vi er taknemmelige for den hjælp, vi har fået fra René Voss Grimm ved Kolding (Hvilested dambrug), for de individer af dyndsmerling han lånte os til projektet og for generelt at udvise stor hjælpsomhed og imødekommenhed. Vi er taknemmelige for Tønder kommunes hjælp omkring koordineringen af vores projekt med kommunens konventionelle befiskning efter dyndsmerling i Sølsted mose, der muliggjorde projektets fase 2. Vi takker Peter Borgen Sørensen for faglig sparring ift. bedømmelse og beregning af usikkerheder ved eDNA analyserne.

8 Referencer

- Agersnap, S., W. B. Larsen, S. W. Knudsen, D. Strand, P. F. Thomsen, M. Hesselsoe, P. B. Mortensen, T. Vralstad, and P. R. Moller. 2017. Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS One* 12: e0179261.
- Aisopou, A., P. L. Bjerg, A. T. Sonne, N. Balbarini, L. Rosenberg, and P. J. Binning. 2015. Dilution and volatilization of groundwater contaminant discharges in streams. *Journal of Contaminant Hydrology* 172: 71-83.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T. 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55: 611-622.
- Forbes, C., M. Evans, N. Hastings, and B. Peacock. 2011. *Statistical distributions*, 4th edition (John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey).
- Fremier, A. K., K. M. Strickler, J. Parzych, S. Powers, and C. S. Goldberg. 2019. Stream Transport and Retention of Environmental DNA Pulse Releases in Relation to Hydrogeomorphic Scaling Factors. *Environmental Science & Technology* 53: 6640-49.
- Hartvich, Petr, Stanislav Lusk, and Jitka Rutkayová. 2010. Threatened fishes of the world: *Misgurnus fossilis* (Linnaeus, 1758) (Cobitidae). *Environmental Biology of Fishes* 87: 39.
- Knudsen, S. W., R. B. Ebert, M. Hesselsoe, F. Kuntke, J. Hassingboe, P. B. Mortensen, P. F. Thomsen, E. E. Sigsgaard, B. K. Hansen, E. E. Nielsen, and P. R. Moller. 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.
- Møller, P. R., M. Beck, and H. Carl. 2012. Dyndsmerring. in H. Carl and P.R. Møller (eds.). *Atlas over danske ferskvandsfisk* (Naturhistorisk museum: Copenhagen).
- Sigsgaard, E. E., H. Carl, P. R. Moller, and P. F. Thomsen. 2015. Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation* 183: 46-52.
- Thomsen, P. F., J. Kielgast, L. L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M. T. P. Gilbert, L. Orlando, and E. Willerslev. 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 2565-73.
- Wilcox, T. M., K. S. McKelvey, M. K. Young, A. J. Sepulveda, B. B. Shepard, S. F. Jane, A. R. Whiteley, W. H. Lowe, and M. K. Schwartz. 2016. Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation* 194: 209-16.

9 Bilag



Figur A1. Oversigtskort over Sølsted mose med placering af ruserne samt en angivelse af, hvor i kanalsystemerne, der var stående eller rindende vand (blå farve).