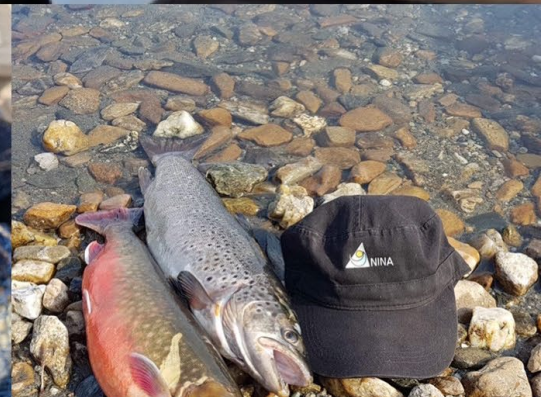


1778

NINA Rapport

Miljø-DNA: uttestinging av innsamlingsmetodikk og labanalyser for påvisning av kreps og fisk i ferskvann

Frode Fossøy, David A. Strand, Brett K. Sandercock & Stein Ivar Johnsen



NINAs publikasjoner

NINA Rapport

Dette er NINAs ordinære rapportering til oppdragsgiver etter gjennomført forsknings-, overvåkings- eller utredningsarbeid. I tillegg vil serien favne mye av instituttets øvrige rapportering, for eksempel fra seminarer og konferanser, resultater av eget forsknings- og utredningsarbeid og litteraturstudier. NINA Rapport kan også utgis på engelsk, som NINA Report.

NINA Temahefte

Heftene utarbeides etter behov og serien favner svært vidt; fra systematiske bestemmelsesnøkler til informasjon om viktige problemstillinger i samfunnet. Heftene har vanligvis en populærvitenskapelig form med vekt på illustrasjoner. NINA Temahefte kan også utgis på engelsk, som NINA Special Report.

NINA Fakta

Faktaarkene har som mål å gjøre NINAs forskningsresultater raskt og enkelt tilgjengelig for et større publikum. Faktaarkene gir en kort framstilling av noen av våre viktigste forskningstema.

Annen publisering

I tillegg til rapporteringen i NINAs egne serier publiserer instituttets ansatte en stor del av sine forskningsresultater i internasjonale vitenskapelige journaler og i populærfaglige bøker og tidsskrifter.

Miljø-DNA: uttesting av innsamlingsmetodikk og labanalyser for påvisning av kreps og fisk i ferskvann

Frode Fossøy
David A. Strand
Brett K. Sandercock
Stein Ivar Johnsen

Fossøy, F., Strand, D. A., Sandercock, B. K. & Johnsen, S.I. 2020.
Miljø-DNA: uttesting av innsamlingsmetodikk og labanalyser for
påvisning av kreps og fisk i ferskvann. NINA Rapport 1778. Norsk
institutt for naturforskning.

Lillehammer

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-4535-7

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

[Åpen]

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

KVALITETSSIKRET AV

Annette Taugbøl

ANSVARLIG SIGNATUR

Forskningsjef Jon Museth (sign.)

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Miljødirektoratet

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

M-1622|2020

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Marthe Tangvold Bårdsen

FORSIDEBILDE

Stein Ivar Johnsen

NØKKEWORD

- Norge, Trøndelag, Viken

- Miljø-DNA, edelkreps, signalkreps, ørret, abbor, gjedde

KONTAKTOPPLYSNINGER

NINA hovedkontor
Postboks 5685 Torgarden
7485 Trondheim
Tlf: 73 80 14 00

NINA Oslo
Gautadalléen 21
0349 Oslo
Tlf: 73 80 14 00

NINA Tromsø
Postboks 6606 Langnes
9296 Tromsø
Tlf: 77 75 04 00

NINA Lillehammer
Vormstuguvegen 40
2624 Lillehammer
Tlf: 73 80 14 00

NINA Bergen
Thormøhlens gate 55
5006 Bergen
Tlf: 73 80 14 00

www.nina.no

Sammendrag

Fossøy, F., Strand, D. A., Sandercock, B. K. & Johnsen, S.I. 2020. Miljø-DNA: uttesting av innsamlingsmetodikk og labanalyser for påvisning av kreps og fisk i ferskvann. NINA Rapport 1778. Norsk institutt for naturforskning.

Miljø-DNA er en relativ ny metode for overvåking av arter og økosystemer som brukes i økende omfang. Fra en vannprøve er det mulig å gi et øyeblikksbilde av hvilke makro- og mikroorganismer som er tilstede i vannet, uten å måtte fange selve organismen. Norsk institutt for naturforskning (NINA) og Veterinærinstituttet (VI) og har i flere år samarbeidet om overvåking av ferskvannskreps (edelkreps *Astacus astacus* og signalkreps *Pacifastacus leniusculus*) samt krepsepest *Aphanomyces astaci* og har utviklet miljø-DNA som metode for overvåking av disse artene. NINA har også utviklet miljø-DNA som metode for overvåking av fremmed ferskvannsfisk.

Bruk av miljø-DNA gir store muligheter for synergieffekter da DNA fra innsamlede vannprøver i ett prosjekt kan inneholde verdifull informasjon for andre prosjekter, men valg av metode for innsamling og analysering av miljø-DNA er ofte avhengig av hvilke typer organismer man ønsker å overvåke. Ved å sammenligne standard miljø-DNA protokoller for ferskvannskreps og krepsepest med standard miljø-DNA protokoller for overvåking av fisk, kan vi avgjøre om disse metodene kan brukes om hverandre.

Vi har tatt fem vannprøver fra bunn (krepsemetode) og overflate (fiskemetode) fra fem innsjøer hvor det også ble teinefisket etter kreps. Prøvene ble filtrert direkte i felt ved hjelp av et glassfiberfilter. Filtrene ble så delt i to for å teste to ulike protokoller for preservering og DNA ekstrahering. I tillegg ble det tatt to vannprøver per innsjø med et lukket kapselfilter i vannkanten, en enkel metode ofte brukt til folkeforskning. Alle prøvene er analysert med artsspesifikke mar-kører for edelkreps, signalkreps, krepsepest, ørret *Salmo trutta*, gjedde *Esox lucius* og abbor *Perca fluviatilis*.

Resultatene fra undersøkelsen viser at hovedprotokollene til VI og NINA stort sett påviste alle artene i samtlige innsjøer der de er tilstede, mens den enklere prøvetakingen i vannkanten, ofte brukt i folkeforskning, ikke ga like gode resultater. Mengden DNA fra ørret var noe høyere i overflaten (fiskemetode), mens mengden DNA fra kreps, gjedde og abbor var noe høyere med bunnprøver (krepsemetode). Dette skyldes mest sannsynlig ulik habitatbruk av de ulike artene. Den modellerte sannsynligheten for å påvise en art viste imidlertid liten forskjell mellom metodene. Det var betydelig mer DNA fra fisk sammenlignet med kreps, selv i innsjøene med høy krepsetetthet, noe som tyder på at kreps avgir mindre DNA til omgivelsene enn fisk. Det var også noe høyere sannsynlighet for påvisning og større mengde ekstrahert DNA fra preserverings- og ekstraksjonsmetoden for fisk (fiskemetode) sammenlignet med metoden brukt for kreps (krepsemetode).

Dette viser at det er mulig å utnytte synergieffekter mellom prosjekter, men at det er viktig å vurdere habitatspreferanser til artene man undersøker for å øke sannsynligheten for påvisning. Det er også rom for å øke påvisningssannsynlighet ved å optimalisere protokollen for preservering og DNA ekstraksjon for krepsemetoden. Det er også behov for videre uttesting og optimalisering av folkemetoden da innsamling av vannprøver fra frivillige øker mulighetene med miljø-DNA overvåking.

Frode Fossøy, NINA, Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim, frode.fossoy@nina.no

David Allan Strand, Veterinærinstituttet, Ullevålsveien 68, 0454 Oslo, david.strand@vetinst.no

Brett K. Sandercock, NINA, Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim, brett.sandercock@nina.no

Stein Ivar Johnsen, NINA, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer, stein.ivar.johnsen@nina.no

Innhold

2.1	Lokaliteter for innsamling av miljø-DNA	7
2.2	Miljø-DNA prøvetaking	9
2.3	Miljø-DNA analyser	9
2.3.1	Ekstraksjon av DNA	9
2.3.2	Analyser av kreps og krepsepest med qPCR	10
2.3.3	Analyser av fisk med ddPCR	10
2.4	Occupancy modellering	11
3.1	Analyser av kreps og krepsepest med qPCR	12
3.2	Analyser av fisk med ddPCR	13

Forord

Det nasjonale overvåkingsprogrammet for edelkreps startet opp i 2001, og har i hovedsak basert seg på innsamling av data fra teinefiske og dykkeundersøkelser. Siden 2001 er det gjort frem-skrutt innen forskning på miljø-DNA, dvs. at det åpnet seg muligheter for å overvåke tilstedeværelse av ferskvannsorganismer ved å samle inn vannprøver. I 2018 ble derfor overvåkingsprogrammet for edelkreps endret, miljø-DNA implementert, og samarbeidet med Veterinærinstituttet og krepsepestovervåkingen ble en realitet. Som en opsjon i overvåkingsprogrammet fra 2018-2022 ønsket Miljødirektoratet at vi så på om det var mulig å bruke data fra andre overvåkingsprogram, f.eks. på fisk, for å kunne utnytte synergiene i forhold til feltinnsamling. Denne rapporten presenterer hovedtrekkene og sammenligner resultatene fra «standard» innsamling og analyse av miljø-DNA fra fiske- og krepseovervåking i Norge.

Rapporten er skrevet av Frode Fossøy, David Strand, Brett Sandercock og Stein I. Johnsen. En stor takk rettes til alle personer som hjulpet til med analyser og databearbeiding.

07.02.2020

Stein I. Johnsen (prosjektleder)

1 Innledning

Miljø-DNA representerer en ny metode for overvåking av arter og økosystemer der innsamling av prøver ikke er avhengig av langvarig innsats eller taksonomisk ekspertise i felt (Taberlet mfl. 2012, Valentini mfl. 2016). Metoden drar nytte av at alle organismer frigir DNA til omgivelsene sine og som dermed gjør det mulig å påvise ulike arter ved hjelp av arts-spesifikke genetiske markører. Da DNA brytes forholdsvis raskt ned i naturen, vil en påvisning av en art ved hjelp av miljø-DNA indikere at denne arten finnes på den undersøkte lokaliteten ved prøvetakingstidspunktet. Sammenligninger med konvensjonelle metoder har vist at miljø-DNA ofte er en mer sensitiv metode (Thomsen mfl. 2012). Miljø-DNA har særlig vært brukt til å påvise sjeldne arter og/eller uønskede fremmede arter (Taberlet mfl. 2012, Valentini mfl. 2016). NINA og VI har i flere år jobbet med overvåking av ferskvannskreps (edelkreps *Astacus astacus* og signalkreps *Pacifastacus leniusculus*) og krepsepest *Aphanomyces astaci* i Norge og utviklet miljø-DNA som metode for påvisning av disse artene (Strand mfl. 2011, Johnsen mfl. 2014, Johnsen mfl. 2019, Strand mfl. 2019). NINA har gjennom andre prosjekter også utviklet miljø-DNA som metode for påvisning av fremmed ferskvannsfisk (Fossøy mfl. 2017, Fossøy mfl. 2018).

Innsamling av vannprøver for miljø-DNA analyser gir store muligheter for synergieffekter. Etter ekstraksjon av DNA fra en miljøprøve vil man i utgangspunktet ha isolert DNA fra alle organismene i denne lokaliteten. Så selv om man i utgangspunktet har tatt en prøve for analysering av en art eller artsgruppe, vil prøvene i teorien også inneholde DNA fra alle andre arter i miljøet. Dette betyr at prøver innsamlet som del av et prosjekt også kan være verdifulle for andre prosjekter. Videre fungerer også DNA-ekstrakter fra miljø-prøver som historiske referanseprøver for artsmangfoldet i lokaliteten fra tidspunktet prøven ble samlet inn.

Valg av metode for innsamling, og ekstraksjon og analysering av miljø-DNA og analyse fra vann har vist seg å være svært viktig for resultatet. Blant annet vil valg av prøvetakingssted, filtertype, preservering av filter, og DNA-ekstraksjonsmetode være avgjørende for sensitiviteten til analysen, dvs. om man klarer å påvise en art eller ikke (Fossøy mfl. 2017, Fossøy mfl. 2018, Rusch mfl. 2018, Wittwer mfl. 2018, Fossøy mfl. 2019, Wacker mfl. 2019). I denne rapporten undersøker vi hvordan miljø-DNA-metodene utviklet så langt for overvåking av henholdsvis kreps og fisk i ferskvann fungerer på tvers av artsgruppene.

For overvåking av ferskvannskreps og krepsepest blir det tatt vannprøver fra bunnen av innsjøene (Strand mfl. 2011, Strand mfl. 2019). For overvåking av fisk er det mest vanlig å ta prøver fra overflaten, gjerne fra land (Fossøy mfl. 2017, Fossøy mfl. 2018). Et viktig spørsmål for å kunne utnytte synergier mellom ulike prosjekter er derfor hvordan ulike metoder for prøvetaking påvirker sannsynligheten for å påvise ulike arter. Vil for eksempel prøver tatt fra overflaten for påvisning av fisk også være egnet for påvisning av kreps? Og vil prøver tatt på bunnen for påvisning av kreps også være egnet for påvisning av fisk? I tillegg til å undersøke prøvetakingmetoder har vi også testet hvordan preservering av filter i felt og DNA-ekstraksjonsmetode påvirker sannsynligheten for å påvise kreps og fisk i ferskvann. Vi har ikke testet hvordan hvert trinn påvirker resultatet i denne rapporten, men har fokusert på to ulike etablerte protokoller for å undersøke om det er mulig å utnytte synergieffekter mellom ulike miljø-DNA prosjekter finansiert av norsk forvaltning. I tillegg til de to etablerte metodene for innsamling testet vi også en enklere form for prøvetaking som blant annet blir brukt i folkeforskningsprosjektet «1000 rivers» (www.1000rivers.net). Dette er et lukket kapselfilter (NatureMetrics) som tillater filtrering av en relativ stor mengde vann samtidig som metoden er «berøringsfri». Dette gjør filteret svært godt egnet i folkeforskningsprosjekter siden man aldri berører selve filteret under prøvetaking og dermed begrenser faren for kontaminering på tvers av prøver.

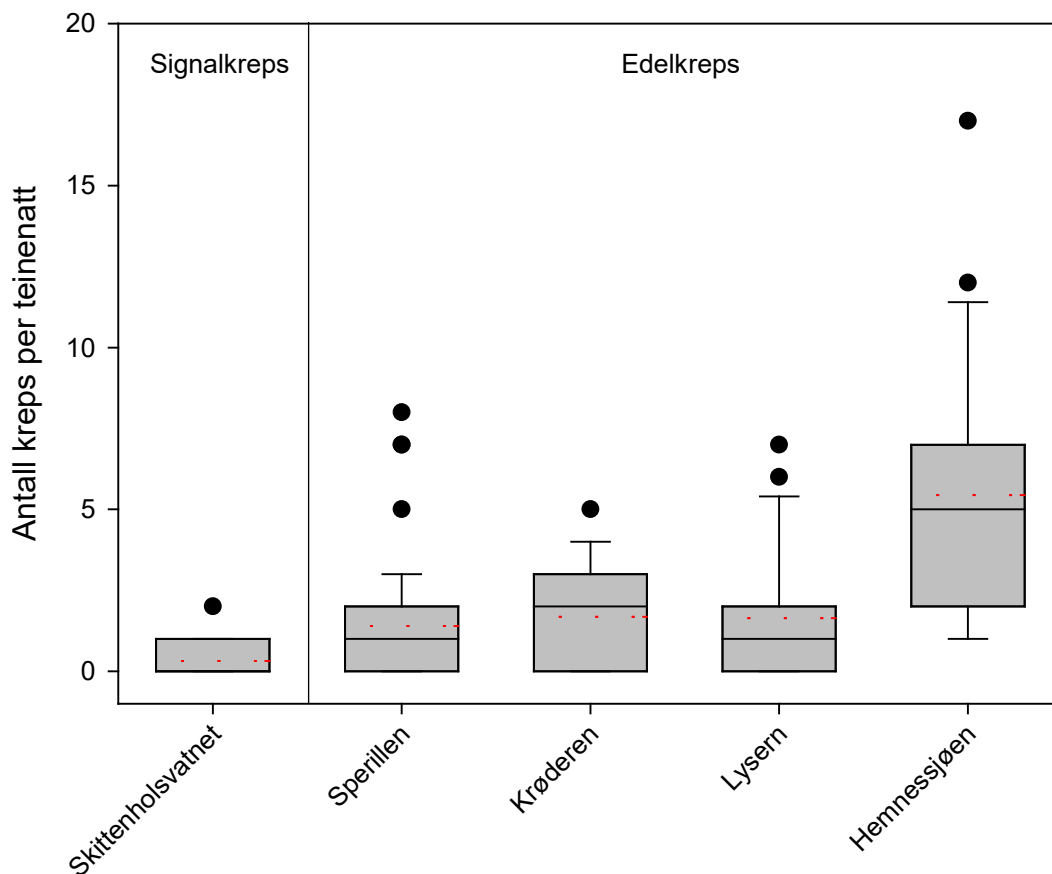
2 Materiale og metoder

2.1 Lokalteter for innsamling av miljø-DNA

Innsamling av vannprøver for analyse av miljø-DNA fra fisk og kreps ble gjort fra fem ulike innsjøer (**Figur 1**). I en av innsjøene, Skittenholsvatnet, er det en tynn bestand av signalkreps (se også Johnsen mfl. (2011) samt **Tabell 2**), mens det i resten av innsjøene er bestander av edelkreps med ulik tetthet (**Figur 1** og **Figur 2**). Sentrale vannkjemiske parametere for forekomst av kreps og for analyse av miljø-DNA er gitt i **Tabell 1**. I alle lokalitetene ble det testet for forekomst av ørret, gjedde og abbor. Fiskearter i de ulike lokalitetene er gitt i **Tabell 2**.



Figur 1. Geografisk plassering av lokaliteter inkludert i denne undersøkelsen. Skittenholsvatnet har en bestand av signalkreps, mens de resterende lokalitetene har bestander av edelkreps.



Figur 2. Antall kreps fanget per teinennatt i de undersøkte lokalitetene. Et datapunkt tilsvarer fangst per innsats (CPUEteine) fra en teine. Boksene omfatter de midtre 50 % av CPUEteine-verdiene. Medianen og gjennomsnittet vises med henholdsvis heltrukken svart og stiplet rød linje. De vertikale linjene utenfor boksene viser 5 og 95 prosentilene og punktene (●) viser verdier utenfor dette intervallet. Skittenholsvatnet har en bestand av signalkreps, mens de resterende lokalitetene har bestander av edelkreps.

Tabell 1. Utvalgte vannkjemiske parametere fra de ulike lokalitetene. < betyr at verdien er under kvantifiseringsgrensen.

Lokalitet	pH	Fargetall (mg Pt/l)	Suspendert stoff (mg/l)	Suspendert stoff (gløderest) (mg/l)	Tot P (µg/l)	Tot N (µg/l)	TOC (mg/l)	Jern (µg/l)	Al-ila-bilt (µg/l)	Al-Reaktivt (µg/l)	Kalsium (mg/l)
Skittenholsvatnet	6,6	17	2,5	< 1,5	20	40	3	4,8	21	27	0,74
Sperillen	7	16	19	13	9,5	210	3,4	11	7,3	10	2,3
Krøderen	7,1	20	< 2	< 1,5	8,8	170	3,6	15	12	15	2,3
Lyseren	7,2	15	< 2	< 1,5	20	230	5,4	9,8	< 5	< 5	3,4
Hemnessjøen	7,3	24	< 2	< 1,5	20	490	6,8	24	< 5	< 5	4,6

Tabell 2. Oversikt over arter av fisk og kreps i de undersøkte lokalitetene.

Lokalitet/art	Ørret	Abbor	Gjedde	Flere arter	Edelkreps	Signal- kreps
Skittenhols- vatnet	X					X
Sperillen	X	X	X	X	X	
Krøderen	X	X	X	X	X	
Lyseren	X	X	X	X	X	
Hemnes- sjøen	X (tynn be- stand)	X	X	X	X	

2.2 Miljø-DNA prøvetaking

Tre miljø-DNA prøvetakingsmetoder ble testet ut og sammenlignet. For metode 1 og 2 ble det tatt fem prøver langs samme transekt som ble prøvofisket med teiner fra båt, hvor en prøve ble tatt fra overflaten, mens en ble tatt rett over bunn. Vannprøvene ble samlet før teinefisket for å unngå evt. kontaminering fra teinene. Disse to metodene representerer standard prøvetakingsmetoder for kreps (bunnprøve) og fisk (overflateprøve) fra henholdsvis VI og NINA. For metode 1 og 2 ble 5 liter vann filtrert gjennom et 2.0 µm glassfiber filter (AP2504700, Millipore) som brukes som standard av begge institusjoner. Alle prøvene ble filtrert ved hjelp av en peristaltisk pumpe og delt i to for å sammenligne to DNA ekstraksjonsmetoder. En halvdel av filteret ble tørket på silica og den andre halvdel ble lagt på ATL-buffer (Qiagen).

I tillegg til de to etablerte metodene for innsamling testet vi også en enklere form for prøvetaking som blant annet blir brukt i folkeforskningsprosjektet «1000 rivers» (www.1000rivers.net). Et kapselfilter (NatureMetrics) bestående av to membraner på henholdsvis 5.0 µm og 0.8 µm tillater filtrering av en relativt stor mengde vann samtidig som metoden er «berøringsfri» ved at man kun tilsetter buffer (ATL) til kapselen i felt og ekstraherer DNA fra kapselen uten å fjerne filterene. Vi har i dette forsøket filtrert 3-5 liter vann ved hjelp av en peristaltisk pumpe, men vi bemerker at dette sjelden blir gjort i folkeforskningsprosjekt der man bruker en manuell sprøyte for å presse vannet gjennom filteret. Som oftest vil frivillige filtrere maks en liter vann.

Vi hadde også i utgangspunktet tenkt å inkludere en filtertype til, av typen Sterivex 0.45 µm, men etter en utprøving av dette filteret ved den første lokaliteten besluttet vi å utelate det fra testen vår. Filtrering av vann går sakte sammenlignet med de andre filterene, og det er kun mulig å filtrere et relativt lite volum vann i lokaliteter med høy turbiditet.

2.3 Miljø-DNA analyser

2.3.1 Ekstraksjon av DNA

DNA fra hvert glassfiberfilter ble ekstrahert med to ulike metoder. DNA fra den ene halvdel som ble lagret på silica ble ekstrahert med en CTAB protokoll, som er standard for VIs krepseovervåking og den andre halvdel av filteret lagret på ATL-buffer ble isolert med NucleoSpin Plant II Midi kit (Macherey-Nagel) som er standard for NINAs miljø-DNA analyser for fisk. Ekstraksjon av DNA fra NatureMetrics filteret ble gjort etter protokoll fra NatureMetrics, basert på et Blood & Tissue kit (Qiagen).

2.3.1.1 CTAB

Halvdel av glassfiberfilteret som var preservert med silicagel, ble overført til et 15ml falkon rør med 2 ml CTAB buffer og 40µl proteinase-K for isolering av DNA. Prøven ble deretter isolert i

henhold til Strand mfl. (2019) med inkubering på 1 time på 65°C, vasking med kloroform og deretter felling med isopropanol. DNA pelleten ble eluert i 100µl TE-buffer (pH8).

2.3.1.2 NucleoSpin Plant II Midi

Den ene halvdel av glassfiberfiltrene ble preservert i 5 ml Eppendorfrør med 4050 µl ATL-buffer (Qiagen) direkte etter prøvetakning og oppbevart i romtemperatur frem til isolering. Ved isolering ble 450 µl proteinase-K (Qiagen) tilsatt direkte i 5 ml rørene og inkubert ved 56°C over natt. DNA ble så isolert med et NucleoSpin Plant II Midi kit (Macherey-Nagel) etter produsentens protokoll, men med lysering- og vaskebuffer fra Qiagen. DNA ble eluert i 200 µl forvarmet AE-buffer (Qiagen) og deretter reeluert på samme kolonne for å maksimere utbyttet av DNA.

2.3.1.3 Qiagen Blood & Tissue (NatureMetrics filter)

DNA-ekstraksjonen av NatureMetrics filtrene ble fulgte en modifisert Qiagen Blood & Tissue protokoll (Spens mfl. 2017) der 130 µl 1:10 fortynnet proteinase-K (Qiagen) ble tilsatt direkte i kapselfiltrene og deretter inkubert ved 56°C over natt. Lysatet ble deretter presset ut og tilsatt lik mengde AL-buffer og EtOH og inkubert på nytt ved 56°C i 30 minutter. DNA ble videre ekstrahert etter produsents protokoll, eluert i 200 µl forvarmet AE-buffer og deretter reeluert på samme kolonne for å maksimere utbyttet av DNA.

2.3.2 Analyser av kreps og krepspest med qPCR

Påvisning og kvantifisering av ferskvannskreps ble analysert ved hjelp av kvantitativ real-time PCR (qPCR). Prøvene fra Skittenholvannet ble analysert med artsspesifikke markører for signalkreps *Pacifastacus leniusculus* (Rusch mfl. I review) og krepspest *Aphanomyces astaci* (Vrålstad mfl. 2009). Resten av prøvene ble analysert med artsspesifikk markør for edelkreps *Astacus astacus* (Rusch mfl. i review). For hvert qPCR-oppsett ble det tatt med fire fortyninger av en standardrekke for relativ kvantifisering av antall DNA kopier i prøvene. Standardrekken ble også brukt som en positiv kontroll og det ble i tillegg tatt med en negativ kontroll (dH₂O som templat).

qPCR oppsett for kreps: Hver reaksjon bestod av 12.5µl TaqMan environmental mastermix, 0.5 µM av forward og revers primer, 0.25 µM probe, dH₂O og 5 µl DNA-templat. qPCR reaksjonen ble kjørt på en CFX96 Touch Real-Time PCR system (Biorad) med følgene program: Hotstart og denaturering ved 95°C i 10 min etterfulgt av 50 sykluser med denaturering ved 95°C i 15 sek, annealing og elongering ved 60°C i 1 min.

qPCR oppsett for krepspest: Hver reaksjon bestod av 12.5 µl TaqMan environmental mastermix, 0.5 µM av forward og revers primer, 0.2 µM probe, dH₂O og 5 µl DNA-templat. qPCR reaksjonen ble kjørt på en CFX96 Touch Real-Time PCR system (Biorad) med følgene program: Hotstart og denaturering ved 95°C i 10 min etterfulgt av 50 sykluser med denaturering ved 95°C i 15 sek, annealing og elongering ved 62°C i 30 sek.

CFX manager (Biorads qPCR software) ble bruk til å kontrollere standardkurve og estimere antall DNA kopier per reaksjon for de påviste artene. En prøve er vurdert som positiv hvis minst en av fire qPCR repliakter amplifiseres før syklus 41 (Cut-off ≤ Cq41).

2.3.3 Analyser av fisk med ddPCR

Påvisning og kvantifisering av fisk ble analysert ved hjelp av digital-PCR (ddPCR: droplet-digital-PCR). Vi analyserte artsspesifikke markører for ørret *Salmo trutta* (Gustavson mfl. 2015), gjedde *Esox lucius* (Fossøy mfl. 2017) og abbor *Perca fluviatilis* (Furlan & Gleeson 2016). For hvert PCR-oppsett ble det tatt med en positiv kontroll (DNA fra arten som templat) og en negativ kontroll (dH₂O som templat). Hver ddPCR reaksjon bestod av 0.9 µM forward og revers primer, 0.25 µM probe, 10 µL ddPCR™ Supermix for Probes (ingen dUTP), dH₂O og DNA-templat. I dette studiet ble samtlige prøver analysert med 1 µl DNA-templat i PCR reaksjonen. Dråper ble automatisk generert ved hjelp av en QX200 AutoDG robot (Bio-Rad), og PCR-amplifisering ble utført i en Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) med følgende temperaturer: først et denatureringssteg ved 95°C i 10 min, etterfulgt av 40 sykluser med denaturering ved 95°C i 30 sek, annealing og elongering ved 58°C eller 60°C i 1 min og et siste denatureringssteg ved 98°C

i 10 min før avkjøling ved 4°C. Dråpene ble så automatisk avlest for tilstedeværelse eller fravær av fluorescens ved hjelp av en QX200™ Droplet Reader (Bio-Rad). Positive og negative dråper ble separert fra hverandre ved hjelp av QuantaSoft software v. 1.7.4 (Bio-Rad) og dette blir videre brukt til å beregne tilstedeværelse og kvantifisere DNA fra de ulike artene. Antall DNA-kopier per liter vann ble så utregnet via formelen:

$$1. \text{ DNA}_{\text{kopier/L}} = (\text{DNA}_{\text{konsentrasjon}} / \text{PCR-volum}_{\text{ddPCR}}) * \text{Templatvolum} / \text{Vannvolum}$$

Hvor $\text{DNA}_{\text{konsentrasjon}}$ blir beregnet av QuantaSoft, PCR-volumet er 20 µl, Templatvolumet er DNA-mengden som inngår i PCR-reaksjonen og vannvolumet er mengden vann filtrert i felt. Vi satte en minimumsgrense på tre positive dråper for å karakterisere en prøve som positiv for å redusere sannsynligheten for falske positiver.

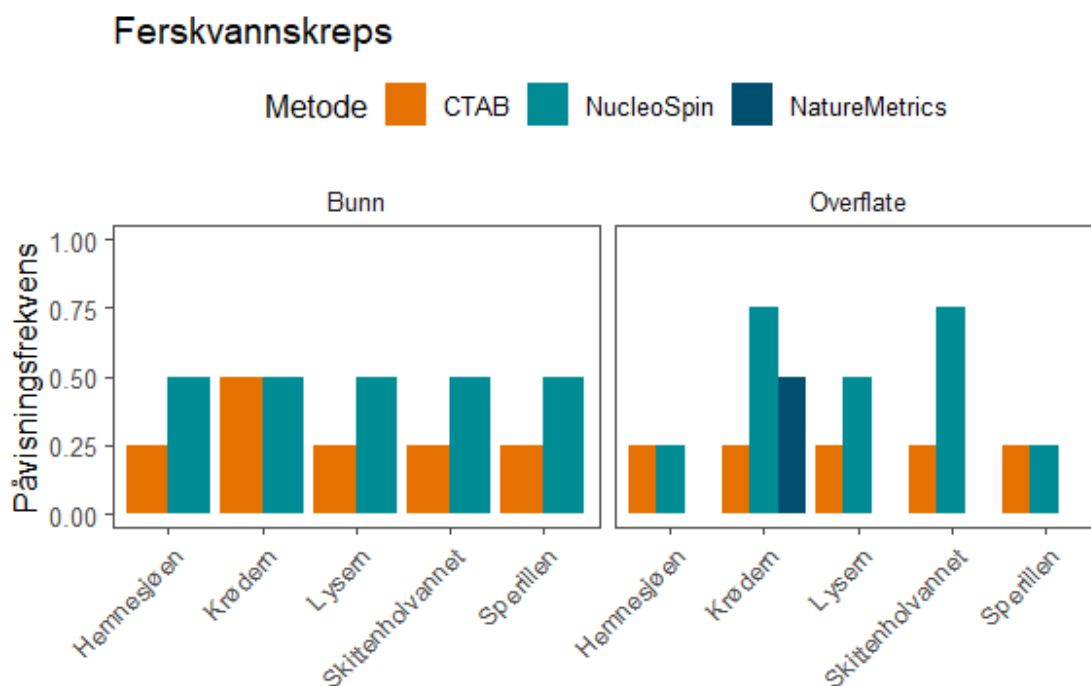
2.4 Occupancy modellering

Modellering av «occupancy» ble gjort ved hjelp av pakken eDNAoccupancy (Dorazio & Erickson 2018) i programmet R (R Core Team 2019). Denne modelleringen muliggjør hierarkiske estimater for tre sannsynlighet der ψ viser sannsynligheten for at arten finnes i en lokalitet, θ viser sannsynligheten for at DNA fra arten finnes i DNA-prøven gitt at arten finnes i lokaliteten, og p viser sannsynligheten for at vi påviser arten i en PCR-analyse gitt at DNA fra arten finnes i prøven. Modellene ble kjørt med 4000 iterasjoner etter burnin på 1000 iterasjoner.

3 Resultater

3.1 Analyser av kreps og krepsepest med qPCR

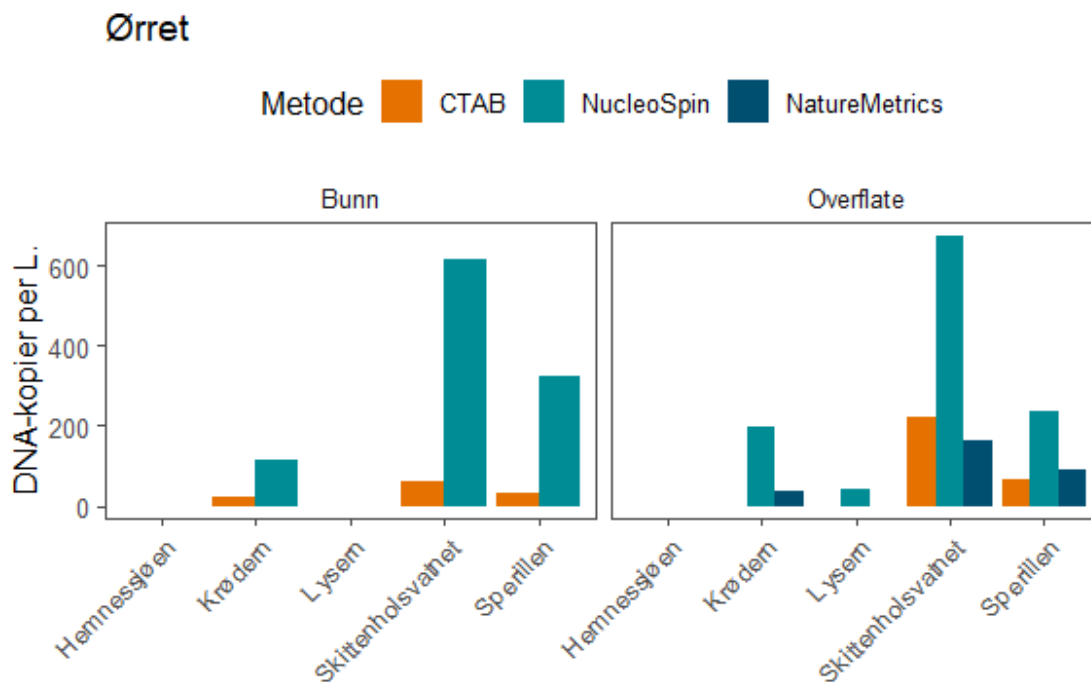
Det ble påvist signalkreps i Skittenholsvannet, men det ble ikke påvist krepsepest i vannet. Edelkreps ble påvist i alle de fire innsjøene i på Østlandet (**Figur 3**). Ferskvannkreps ble påvist ved både bunnprøver og overflateprøver, og med begge hovedprotokollene (metode 1 og 2), i samtlige innsjøer i denne testen. For alle positive prøver for krepse-DNA ble det påvist under 10 DNA kopier per reaksjon, som er under kvantifiseringsgrensen. Derfor ble ikke antall DNA kopier per liter vann estimert for kreps, men kun påvisningsfrekvens. Påvisningsfrekvensen var noe høyere med NucleoSpin protokollen enn med CTAB protokollen både for bunn og overflate prøver. Occupancy modellering viste at sannsynligheten for å påvise kreps med NucleoSpin metoden var noe høyere (0.23) enn med CTAB protokollen (0.09), men ingen forskjell mellom overflate (0.99) og bunnprøver (0.99) (**Figur 7**). Disse verdiene er en god del lavere enn *theta* i denne analysen, noe som tyder på at vannprøven og DNA-prøven inneholder krepse-DNA, men at PCR-metoden ikke klarer å påvise det. Her finnes det altså rom for forbedringer og en videre optimalisering av PCR-metoden kan øke sensitiviteten betraktelig. Med NatureMetrics filtrere ble ferskvannskreps kun påvist i en av innsjøene.



Figur 3. Påvisning av ferskvannskreps ved hjelp av qPCR for 5 innsjøer. For hver innsjø ble det filtrert 5 bunnprøver og 5 overflateprøver gjennom et 2.0 μm glassfilterfilter fra båt der DNA fra en halvdel av filteret ble ekstrahert med en CTAB protokoll og den andre halvdel med et NucleoSpin plantekit (Machery-Nagel). I tillegg ble det filtrert to NatureMetrics kapsefilter fra overflaten ved land. Hver prøve ble analysert i 4 replikater og påvisningsfrekvensen viser andelen positive analyser. Grafene viser resultater for edelkreps i alle innsjøer utenom Skittenholsvannet, der resultatet viser signalkreps.

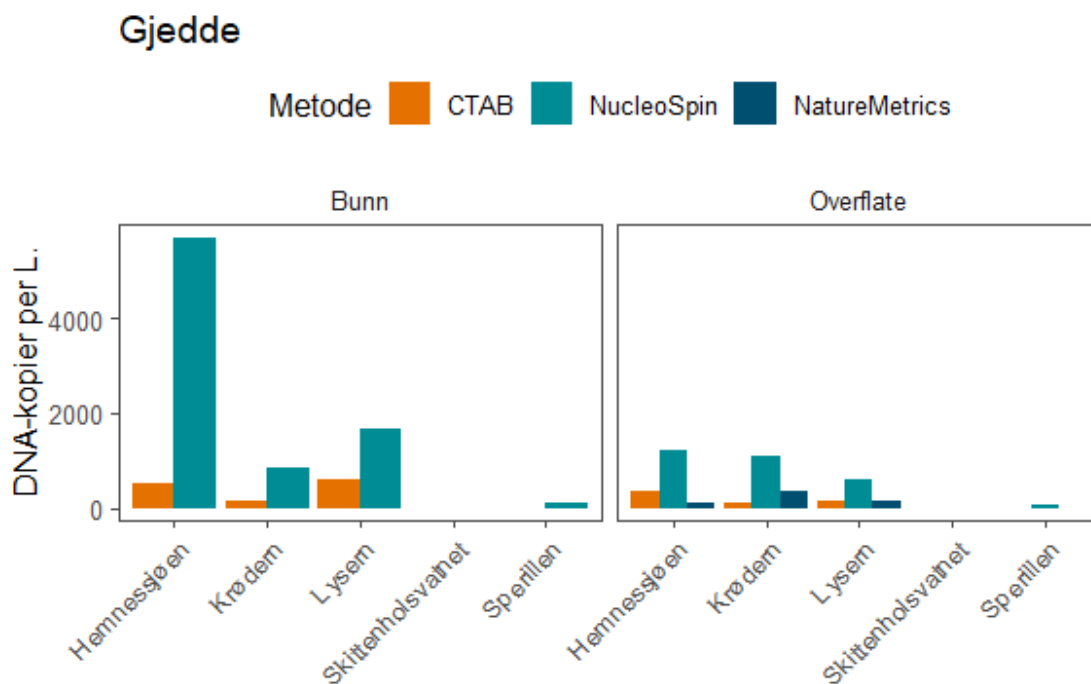
3.2 Analyser av fisk med ddPCR

Ørret ble påvist i samtlige innsjøer utenom Hemnessjøen, men ble kun påvist i overflateprøven fra Lysern (**Figur 4**). NucleoSpin protokollen påviste ørret i flere innsjøer og viste en høyere DNA-konsentrasjon sammenlignet med CTAB protokollen. Occupancy modellering viste en noe høyere sannsynlighet for å påvise ørret med NucleoSpin protokollen (0.65) sammenlignet med CTAB protokollen (0.51), men viste liten forskjell mellom overflate (0.80) og bunn (0.83) (**Figur 7**). NatureMetricsfilteret påviste ørret i tre av innsjøene.



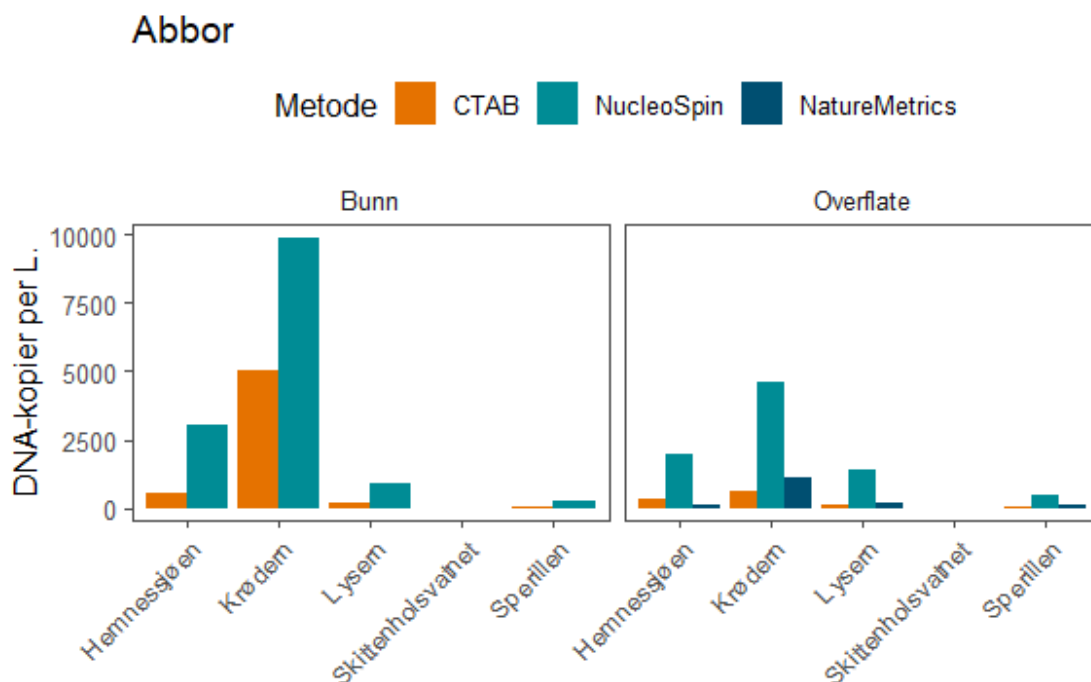
Figur 4. Påvisning av ørret ved hjelp av ddPCR for 5 innsjøer. For hver innsjø ble det filtrert 5 bunnprøver og 5 overflateprøver gjennom et 2.0 µm glassfilterfilter fra båt der DNA fra en halvdel av filteret ble ekstrahert med en CTAB protokoll og den andre halvdel med et NucleoSpin plantekit (Machery-Nagel). I tillegg ble det filtrert to NatureMetrics kapselfilter fra overflaten ved land. Hver prøve ble analysert i 2 replikater og grafen viser antall DNA-kopier per liter vann estimert fra analysene.

Gjedde ble påvist i samtlige innsjøer utenom Skittenholsvannet (**Figur 5**). Alle tre metodene påviste gjedde i tre av lokalitetene mens bare NucleoSpin protokollen påviste gjedde i Sperillen. NucleoSpin protokollen viste også en høyere DNA-konsentrasjon sammenlignet med de to andre metodene. DNA-konsentrasjonen var noe høyere i bunnprøvene sammenlignet med overflateprøvene. Occupancy modellering viste en noe høyere sannsynlighet for å påvise gjedde med NucleoSpin protokollen (0.98) sammenlignet med CTAB protokollen (0.89), og en noe høyere sannsynlighet for prøver tatt fra overflaten (0.95) sammenlignet med prøver tatt fra bunnen (0.88) (**Figur 7**).

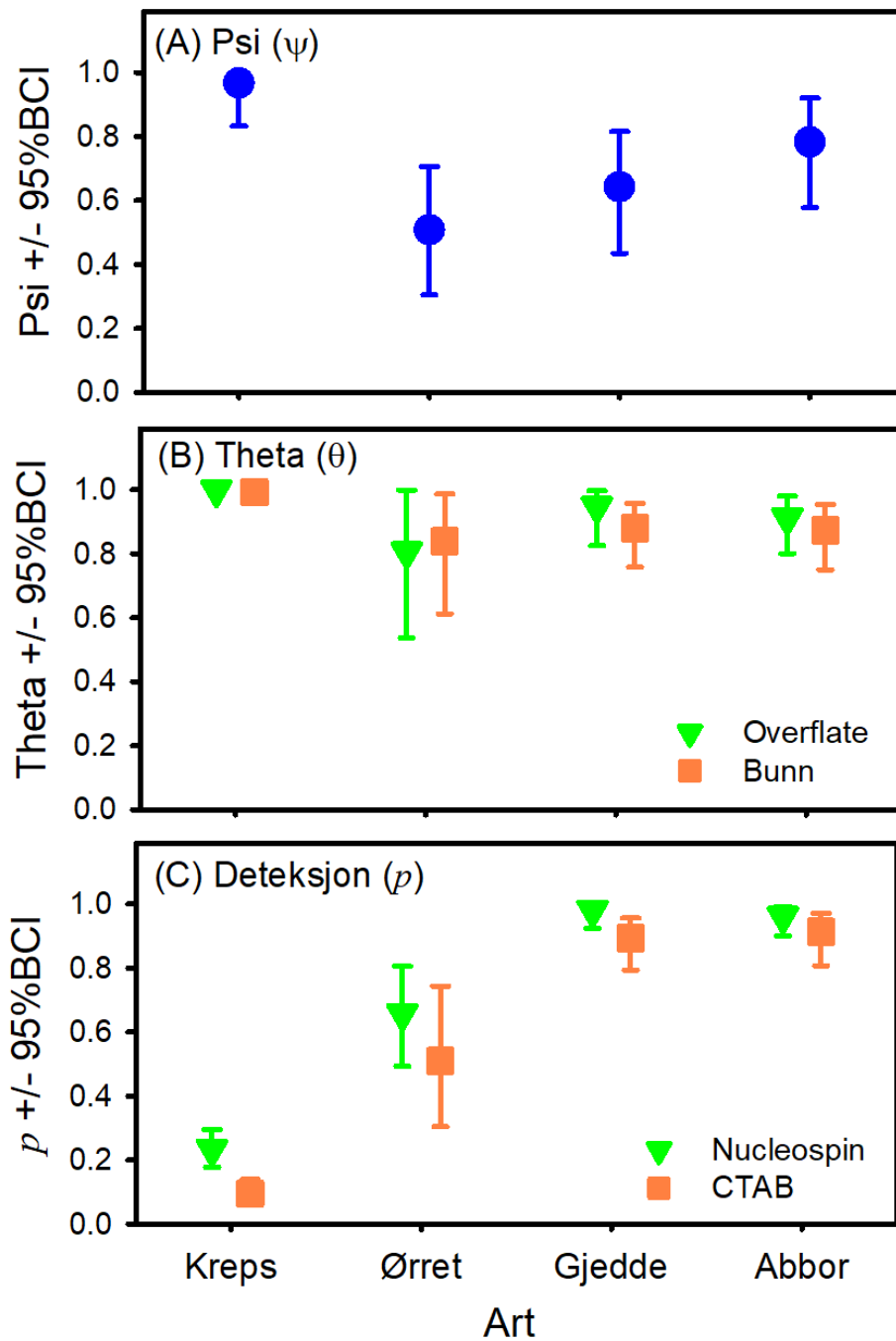


Figur 5. Påvisning av gjedde ved hjelp av ddPCR for 5 innsjøer. For hver innsjø ble det filtrert 5 bunnprøver og 5 overflateprøver gjennom et 2.0 μ m glassfilterfilter fra båt der DNA fra en halvdel av filteret ble ekstrahert med en CTAB protokoll og den andre halvdel med et NucleoSpin plantekit (Machery-Nagel). I tillegg ble det filtrert to NatureMetrics kapselfilter fra overflaten ved land. Hver prøve ble analysert i 2 replikater og grafen viser antall DNA-kopier per liter vann estimert fra analysene.

Abbor ble påvist i samtlige innsjøer utenom Skittenholsvannet (**Figur 6**). NucleoSpin protokollen viste en høyere DNA-konsentrasjon sammenlignet med de to andre metodene. Occupancy modellering viste en noe høyere sannsynlighet for å påvise abbor med NucleoSpin protokollen (0.96) sammenlignet med CTAB protokollen (0.91) og en noe høyere sannsynlighet for prøver tatt fra overflaten (0.91) sammenlignet med prøver tatt fra bunnen (0.87) (**Figur 7**).



Figur 6. Påvisning av abbor ved hjelp av ddPCR for 5 innsjøer. For hver innsjø ble det filtrert 5 bunnprøver og 5 overflateprøver gjennom et 2.0 µm glassfilterfilter fra båt der DNA fra en halvdel av filteret ble ekstrahert med en CTAB protokoll og den andre halvdel med et NucleoSpin plantekit (Machery-Nagel). I tillegg ble det filtrert to NatureMetrics kapselfilter fra overflaten ved land. Hver prøve ble analysert i 2 replikater og grafen viser antall DNA-kopier per liter vann estimert fra analysene.



Figur 7. Resultater fra occupancy modellering av miljø-DNA resultatene. (A) Psi viser sannsynligheten for at arten finnes i en lokalitet, (B) theta viser sannsynligheten for at DNA fra arten finnes i DNA-prøven gitt at arten finnes i lokaliteten, og (C) p viser sannsynligheten for at vi påviser arten i en PCR-analyse gitt at DNA fra arten finnes i prøven.

4 Diskusjon

I denne rapporten har vi sammenlignet innsamlingsprotokoller og labanalyser for miljø-DNA prøver på tvers av organismegrupper. Et av hovedmålene var å undersøke om to ulike etablerte protokoller for henholdsvis kreps og fisk i ferskvann kan brukes på tvers av prosjekter og dermed gjøre det mulig å utnytte synergieffekter fra miljø-DNA prøver finansiert av norsk forvaltning. I tillegg til de to etablerte metodene for innsamling testet vi også en enklere form for prøvetaking som blant annet blir brukt i folkeforskningsprosjektet «1000 rivers» (www.1000rivers.net).

Resultatene fra denne testen viser at de to hovedprotokollene stort sett påviser alle artene vi undersøkte i samtlige innsjøer, og dermed kan brukes til å utnytte synergieffekter mellom prosjekter. NatureMetricsfilteret, som blir brukt i blant annet folkeforskningsprosjekter, viste en lav sannsynlighet for å påvise ferskvannskreps, men her må det bemerkes at det kun ble tatt to prøver og ikke fem som for de andre filtrerene, og at disse prøvene ble tatt ved land og ikke fra båt. Vi anser derfor at en videre uttesting av disse filtrerene bør gjennomføres for å undersøke hvordan folkeforskning kan brukes til overvåking av kreps. Utgangspunktet med to prøver i overflaten ved land var basert på at et «folkeforskningsprosjekt» må innebære et relativt lavt innsatsnivå for at det skal kunne gjennomføres.

Prøvetaking av vannprøver fra overflaten eller bunnen av en innsjø hadde ulik effekt avhengig av art. Mengden DNA fra ørret var noe høyere i overflateprøver, mens mengden DNA fra kreps, gjedde og abbor var noe høyere med bunnprøver. Dette er mest sannsynlig relatert til artsspesifikk habitatbruk. Men den modellerte sannsynligheten for å påvise en art viste liten forskjell mellom overflate og bunnprøver, noe som også styrker muligheten for å bruke miljø-DNA prøver på tvers av prosjekter.

Det var stor forskjell på antall DNA-kopier per liter når man sammenligner fisk med kreps. For fisk var DNA-kopier per liter opp mot 10 000 i enkelte prøver, mens for kreps lå alle positive prøver under kvantifiseringsgrensen på 10 DNA kopier per qPCR reaksjon (tilsvarer under 40 DNA-kopier per liter), selv ved høye tettheter av kreps. Dette tyder på at kreps avgir mindre miljø-DNA til omgivelsene enn fisk, og har derfor lavere sannsynlighet for påvisning sammenlignet med fisk.

Både mengden DNA ekstrahert og sannsynligheten for påvisning, var noe høyere med NucleoSpin protokollen sammenlignet med CTAB protokollen. Dette representerer altså to ulike DNA-ekstraksjonsmetoder, men også to ulike preserveringsmetoder. Mens CTAB protokollen preserverer filtrerene på silica i felt, preserverer NucleoSpin protokollen filtrerene direkte i ATL-buffer i felt. Tidligere undersøkelser ved NINA indikerer at preservering på silica har lavere DNA-utbytte enn preservering i ATL-buffer med samme DNA-ekstraksjonsmetode, og at preserveringen derfor kan forklare noe av forskjellen vi finner i denne rapporten. Dette resultatet medfører at sensitiviteten, altså sannsynligheten for å påvise lave tettheter, kan økes ved å endre protokollen for overvåking av kreps og krepsepest i fremtiden.

5 Referanser

- Dorazio, RM & Erickson, RA. 2018. ednaoccupancy: An R package for multiscale occupancy modelling of environmental DNA data. *Mol Ecol Resour* 18(2): 368-380.
- Fossøy, F, Dahle, S, Eriksen, LB, Spets, MH, Karlsson, S & Hesthagen, T. 2017. Bruk av miljø-DNA for overvåking av fremmede fiskearter - utvikling av artsspesifikke markører for gjedde, mort og ørekyt. Norsk institutt for naturforskning. NINA Rapport 1299.
- Fossøy, F, Thaulow, J, Anglès d'Auriac, M, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Mo, TA, Sandlund, OT & T., H. 2018. Bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy for overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk. Norsk institutt for naturforskning. NINA Rapport 1586.
- Fossøy, F, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Pettersen, O, Sandercock, BK, Solem, Ø, Hindar, K & Mo, TA. 2019. Monitoring presence and abundance of two gyrodactylid ectoparasites and their salmonid hosts using environmental DNA. *Environmental DNA* 10.1002/edn3.45(0).
- Furlan, EM & Gleeson, D. 2016. Environmental DNA detection of redfin perch, *Perca fluviatilis*. *Conservation Genetics Resources* 8(2): 115-118.
- Gustavson, MS, Collins, PC, Finarelli, JA, Egan, D, Conchúir, RÓ, Wightman, GD, King, JJ, Gauthier, DT, Whelan, K, Carlsson, JEL & Carlsson, J. 2015. An eDNA assay for Irish *Petromyzon marinus* and *Salmo trutta* and field validation in running water. *Journal of Fish Biology* 87(5): 1254-1262.
- Johnsen, SI, Strand, D, Hansen, M, Biering, E & Vrålstad, T. 2011. Signalkreps og krepsepest i Skittenholvatnet og Oppsalvatnet, Hemne kommune - Kartlegging, vurdering av spredningsrisiko og forslag til tiltak. - NINA Rapport 753. 27 s. + vedlegg.
- Johnsen, SI, Skurdal, J & Garnås, E. 2014. Status og overvåking av krepsebestanden i Steinsfjorden i Buskerud 1979-2014. NINA Rapport 1048. Norsk institutt for naturforskning.
- Johnsen, SI, Strand, DA, Rusch, J & Vrålstad, T. 2019. Nasjonal overvåking av edelkreps og spredning av signalkreps - presentasjon av overvåkingsdata og bestandsstatus. NINA Rapport 1590. Norsk institutt for naturforskning.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rusch, J, Mojzisoová, M, Strand, D, Svabodová, Vrålstad, T & Petrusek, A. I review. Simultaneous detection of native crayfish and invasive crayfish pathogen in a wide range of habitats in Central Europe.
- Rusch, JC, Hansen, H, Strand, DA, Markussen, T, Hytterød, S & Vrålstad, T. 2018. Catching the fish with the worm: a case study on eDNA detection of the monogenean parasite *Gyrodactylus salaris* and two of its hosts, Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Parasites & Vectors* 11(1): 333.
- Spens, J, Evans, AR, Halfmaerten, D, Knudsen, SW, Sengupta, ME, Mak, SST, Sigsgaard, EE, Hellström, M & Yu, D. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution* 8(5): 635-645.
- Strand, DA, Holst-Jensen, A, Viljugrein, H, Edvardsen, B, Klaveness, D, Jussila, J & Vrålstad, T. 2011. Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Diseases of Aquatic Organisms* 95(1): 9-17.

- Strand, DA, Johnsen, SI, Rusch, JC, Agersnap, S, Larsen, WB, Knudsen, SW, Møller, PR & Vrålstad, T. 2019. Monitoring a Norwegian freshwater crayfish tragedy: eDNA snapshots of invasion, infection and extinction. *Journal of Applied Ecology* 56(7): 1661-1673.
- Taberlet, P, Coissac, E, Hajibabaei, M & Rieseberg, LH. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21(8): 1789-1793.
- Thomsen, PF, Kielgast, J, Iversen, LL, Møller, PR, Rasmussen, M & Willerslev, E. 2012. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE* 7(8): e41732.
- Valentini, A, Taberlet, P, Miaud, C, Civade, R, Herder, J, Thomsen, PF, Bellemain, E, Besnard, A, Coissac, E, Boyer, F, Gaboriaud, C, Jean, P, Poulet, N, Roset, N, Copp, GH, Geniez, P, Pont, D, Argillier, C, Baudoin, J-M, Peroux, T, Crivelli, AJ, Olivier, A, Acqueberge, M, Le Brun, M, Møller, PR, Willerslev, E & Dejean, T. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25(4): 929-942.
- Vrålstad, T, Knutsen, A, Tengs, T & Holst-Jensen, A. 2009. A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology* 137: 146-155.
- 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*(10.1002/edn3.10).
- Wittwer, C, Nowak, C, Strand, DA, Vrålstad, T, Thines, M & Stoll, S. 2018. Comparison of two water sampling approaches for eDNA-based crayfish plague detection. *Limnologica* 70: 1-9.

Norsk institutt for naturforskning, NINA, er en uavhengig stiftelse som forsker på natur og samspillet natur–samfunn.

NINA ble etablert i 1988. Hovedkontoret er i Trondheim, med avdelingskontorer i Tromsø, Lillehammer, Bergen og Oslo. I tillegg driver NINA Sæterfjellet avlsstasjon for fjellrev på Oppdal, og forskningsstasjonen for vill laksefisk på lms i Rogaland.

NINAs virksomhet omfatter både forskning og utredning, miljøovervåking, rådgivning og evaluering. NINA har stor bredde i kompetanse og erfaring med både naturvitere og samfunnsvitere i staben. Vi har kunnskap om artene, naturtypene, samfunnets bruk av naturen og sammenhenger med de store drivkreftene i naturen.

ISSN:1504-3312
ISBN: 978-82-426-4535-7

Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim

Besøks-/leveringsadresse: Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim

Telefon: 73 80 14 00, Telefaks: 73 80 14 01

E-post: firmapost@nina.no

Organisasjonsnummer 9500 37 687

<http://www.nina.no>



Samarbeid og kunnskap for framtidens miljøløsninger