

Overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk ved bruk av miljø-DNA



RAPPORT

Hovedkontor

Gaustadalléen 21
0349 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Region Sør

Jon Lilletuns vei 3
4879 Grimstad
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Region Innlandet

Sandvikaveien 59
2312 Ottestad
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Region Vest

Thormøhlensgate 53 D
5006 Bergen
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Danmark

Njalsgade 76, 4. sal
2300 København S, Danmark
Telefon (45) 39 17 97 33

Internett: www.niva.no

Tittel Overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk ved bruk av miljø-DNA	Løpenummer NIVA 7435-2019	Dato 09.12.2019
Forfatter(e) Anette Engesmo Steen W. Knudsen Guttorm Christensen Martin Hesselsøe Marc Anglès d'Auriac	Fagområde Overvåking	Distribusjon Åpen
	Geografisk område Norge	Sider 29 + vedlegg

Oppdragsgiver(e) Miljødirektoratet	Oppdragsreferanse Sunniva Aagaard
Oppdragsgivers utgivelse: Miljødirektoratet rapport M-1628 2020	Utgitt av NIVA Prosjektnummer 190130

Sammendrag

Fire emneord 1. Miljø-DNA 2. Molekylær overvåking 3. Fremmed ferskvannsfisk 4. Miljøovervåking	Four keywords 1. eDNA 2. Molecular monitoring 3. Intrusive freshwater fish 4. Environmental monitoring
--	--

Denne rapporten er kvalitetssikret iht. NIVAs kvalitetssystem og godkjent av:

Anette Engesmo
Prosjektleder

Markus Lindholm
Forskningsleder

ISBN 978-82-577-7170-6
NIVA-rapport ISSN 1894-7948

© Norsk institutt for vannforskning. Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse.

**Overvåking og kartlegging av fremmed
ferskvannsfisk ved bruk av
miljø-DNA**

2019

Forord

NIVA har på oppdrag av Miljødirektoratet evaluert bruk av miljø-DNA som overvåkningsmetode for spredning av fremmed ferskvannsfisk i Norge. Oppdragsgiver valgte 12 fiskearter som er av spesielt høy interesse og hvor det var ønskelig med mulighet for molekylær overvåkning.

Prosjektet er gjennomført som et samarbeid mellom NIVA, Akvaplan-niva og NIRAS. Prosjektet har vært ledet av Anette Engesmo fra NIVA og Marc Anglès d'Auriac har vært ansvarlig for molekylære analyser og molekylær metodeutvikling. Guttorm Christensen fra Akvaplan-niva har vært ansvarlig for feltinnsamling og fagansvarlig på fisk. Martin Hesselsøe fra NIRAS Danmark har vært fagansvarlig for filtrering. Han har i tillegg, sammen med Steen W. Knudsen (NIVA) fungert som løpende kvalitetssikrer av molekylære resultater. Markus Lindholm (NIVA) har kvalitetssikret rapporten.

Det rettes en stor takk til Sunniva Aagaard hos Miljødirektoratet for stødig ledelse av prosjektet og for gode- og konstruktive tilbakemeldinger gjennom prosjektperioden. Jarle Steinkjer, Steinar Sandøy og Hege Sangolt har også bidratt med innspill fra Miljødirektoratet.

Dette prosjektet har vært gjennomført i tett samarbeid med alle samarbeidspartnere og jeg vil til slutt takke Marc, Martin, Steen og Guttorm for fantastisk oppfølging gjennom prosjektperioden og mange konstruktive prosjektmøter.

Oslo, 9. Desember 2019

Anette Engesmo

Innhold

1	Introduksjon.....	7
2	Metode	8
2.1	Prøvetakning.....	8
2.2	Viktige hensyn ved prøvetakning.....	10
2.3	Molekylære metoder	11
2.3.1	DNA-isolering.....	11
2.3.2	Etablering av nye qPCR markører.....	11
2.3.3	Sekvensering av sørv og suter	12
2.3.4	qPCR.....	12
2.3.5	Ørret som inhiberingskontroll	15
2.3.6	Definisjon av deteksjonsgrenser (LOD og LOQ):	15
2.3.7	Bruk av kalibrert qPCR produkt som standardkurve	16
2.3.8	Plot av miljø-DNA data på kart	17
3	Resultater og diskusjon.....	17
3.1	qPCR inhiberingskontroll	17
3.2	Kalibrert qPCR produkt som standardkurve	18
3.3	Artsspesifikke qPCR protokoller.....	18
	Sørv	18
	Suter	18
	Solabbor	18
3.4	Sekvensering av sørv og suter	19
3.5	Resultater miljø-DNA	19
4	Konklusjon	25
4.1	Viktige hensyn for å unngå krysskontaminering.....	25
5	Referanser.....	27

Sammendrag

Dette prosjektet er gjennomført på oppdrag fra Miljødirektoratet og målsetningen var å utvikle og teste ut et system for bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy i overvåkning og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk for forvaltningen. Vi har testet ulike eksisterende metodikk for feltarbeid, prøvetaking og molekylære protokoller og forenklet disse der dette har vært mulig. I denne rapporten sammenfatter vi erfaringene gjort i alle deler av prosessen, fra felt til ferdig data, og gir anbefalinger om prioriteringer og veien videre for perfektjonering av dette potensielt viktige verktøyet for miljøforvaltningen. Det er ikke gjennomført omfattende feltprøvetaking i dette prosjektet.

Eksisterende prøvetakningsprotokoll for bruk av Sterivex-filter er blitt forenklet ved at filtreringen gjøres i felt og filteret fikseres på ATL-buffer og oppbevares i romtemperatur. Denne behandlingen av filtrene ser ut til å medføre et visst tap av DNA, men er samtidig en betydelig forenkling for prøvetaker ved at man kan unngå å ta med tørris i felt. Videre har vi benyttet en ny qPCR polymerase, noe som ser ut til å minimere påvirkningen av inhibitorer i miljø-DNA.

Eksisterende qPCR markører for gjedde, abbor, ørekyt, karuss, mort, karpe, regnbueørret og pukkellaks er blitt validert og testet på miljø-DNA. Det ble gjennomført en modifisering av markøren for karpe for å eliminere «støy» i qPCR reaksjonen. Vi kunne ikke påvise ørekyt fra noen lokaliteter, men vi mener dette var reelle negative prøver og ikke reflekterer svakheter ved markøren. Tidligere benyttet markør for bekkerøye viste seg ikke å fungere, og det foreligger derfor ikke resultater for denne arten. Resultatene for pukkellaks var særs gode, og vi hadde tydelig deteksjon av arten fra alle prøvetatte elver i Finnmark. Det har blitt utviklet nye qPCR markører for sørv, suter og solabbor. Ved videre utvikling av metodikk bør det legges vekt på prøvetaking på optimal tid på året (for eksempel gytetid), og det bør også undersøkes hvorvidt prøvetaking bør skje i habitater knyttet til arten som skal kartlegges. Videre vil innsjøens hydrologi påvirke hvor robuste resultater som kan ventes. Våre resultater har understreket viktigheten av at alle protokoller for nye arter må utvikles og optimaliseres individuelt, der det tas hensyn til målartens biologi og økologi.

Artsspesifikke markører har i hovedsak blitt testet på miljø-DNA fra lokaliteter med kjent forekomst av målartene. Dette ble gjort for å validere metodikken for, og for å kunne bruke de innsamlede miljø-DNA prøvene som en slags «fasit» for hvilke arter vi bør detektere. Likevel har undersøkelsene påvist sørv fra fire hittil ukjente lokaliteter: Høgstlidammen, Mortensplasztjenn, Sollidammen og Tuftdammen.

Summary

Title: Monitoring of invasive freshwater fish using environmental DNA (eDNA)

Year: 2019

Author(s): Anette Engesmo, Steen W. Knudsen, Guttorm Christensen, Martin Hesselsøe og Marc Anglès d'Auriac

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN 978-82-577-7170-6

This project is conducted on behalf of the Norwegian Environment Agency and the objective *was to develop and test a system for using environmental DNA (eDNA) as a supplementary tool of monitoring and mapping of invasive freshwater fish*. The focus has been on molecular method development and the assays are therefore mainly tested on environmental samples from sites with known prevalence of the target species. Extensive field sampling has not been carried out in this project.

We have tested various existing methodologies for fieldwork, sampling and molecular protocols and simplified these where possible. In this report, we summarize the experiences gained in all parts of the process, from field to finished data, and provide recommendations on priorities and the way forward for perfecting this potentially important tool for environmental authorities.

The existing sampling protocol for using Sterivex filters has been simplified by conducting the filtering in the field and fixing the filter on the ATL buffer before storing it at room temperature. This treatment seems to cause some loss of DNA, but it also leads to a significantly easier sampling due to not having to bring dry ice into the field. Furthermore, we have used a new qPCR polymerase, which appears to have minimized the influence of inhibitors in the environmental samples.

Existing qPCR assays for pike, perch, minnow, crucian carp, roach, carp, rainbow trout and pink salmon have been validated and tested. A modification of the marker for carp was carried out to eliminate "noise" in the qPCR reaction. We could not detect minnow from any sites, but we believe these were real negative samples and did not reflect a problem with the qPCR assay. The previously used assay for brook trout did not work and therefore there are no results for this species. The results for pink salmon were very good, and we had clear detection of the species from all sample rivers in Finnmark. New qPCR assays have been developed for rudd, tench and pumpkinseed. Further development of methodology should emphasize sampling at the optimum time of year (e.g. spawning), and it should also be investigated whether sampling should take place in habitats related to the species being mapped. Finally, the hydrology of the lake will affect how robust results can be expected. Our results have emphasized the importance of all protocols for new species must be developed and optimized individually, with particular regard to the biology and ecology of the target species.

Species-specific qPCR assays have mainly been tested on environmental samples from sites with known prevalence of the target species. Nevertheless, the investigations have detected rudd from four hitherto unknown localities: Høgstlidammen, Mortensplasstjenn, Sollidammen and Tuftdammen.

1 Introduksjon

Fremveksten av miljø-DNA (eDNA) metodikk gir et helt nytt sett med muligheter for å forbedre og forenkle økosystemovervåking. Feltet er i rask utvikling og det tas i bruk stadig nye organismer (Angles d'Auriac et al. 2019; Fossøy et al. 2018; Foote et al. 2012; Piaggio et al. 2014; Agersnap et al. 2017; Clusa et al. 2017; Marshall and Stepien 2019).

Prinsippet for miljø-DNA er at alle levende organismer har en unik genetisk signatur som vil «lekke» ut i miljøet fordi DNA stadig skiller ut gjennom naturlige prosesser: Som avskalling av epidermale celler og naturlige sekreter, og vevsrester knyttet til avføring, reproduksjon, smoltifisering, skade eller predasjon. Dette kalles miljø-DNA. Det er altså mulig å isolere den genetiske signaturen fra en fisk direkte fra en vannprøve. Miljø-DNA vil imidlertid brytes ned over tid og blir i akvatiske økosystemer borte i løpet av noen uker (Pilliod et al. 2013; Lacoursière-Roussel et al. 2016; Barnes et al. 2014). Fordi det brytes ned relativt fort vil en molekylær deteksjon implisere at det har vært et levende individ av den aktuelle arten, i det følgende betegnet som 'målararten', til stede relativt nylig (Sigsgaard et al. 2017; Andruszkiewicz, Sassoubre, and Boehm 2017; Collins et al. 2018; Jo et al. 2019). Metoden er ikke-invasiv og forstyrrer ikke individene som prøvetas. Bruk av miljø-DNA har av disse årsakene vist seg å være spesielt egnet til oppdagelse og sporing av sjeldne eller innvandrende arter, ikke minst for deteksjon av uønskede arter. Et eksempel på dette er fremmede arter av fisk (se for eksempel Harper et al. (2018)), der det bare er få individer til stede i etableringsfasen, og som derfor er tilsvarende vanskelige å spore opp ved tradisjonelle metoder. Introduksjon av fremmede arter i ferskvannssystemer kan føre til tap av lokalt biologisk mangfold og til økosystemiske endringer i innsjøer (Nunes et al. 2015). For å kunne begrense de mulige skadevirkningene fra nye arter er det viktig å oppdage introduksjonen tidlig. Bruk av miljø-DNA til overvåking av fremmede ferskvannsfisk vil kunne bidra til at man raskere kan igangsette tiltak for å begrense skadene.

Fremmede arter er arter som opptrer utenfor sitt naturlige utbredelsesområde (Artsdatabanken). Regionalt fremmede arter er arter som naturlig hører til i deler av Norge, men som har blitt flyttet eller vandret til nye steder i landet. Disse anses som fremmede arter i områdene hvor de ikke naturlig hører hjemme (Artsdatabanken). Det gjennomføres en risikovurdering av både fremmede arter og regionalt fremmede arter, samt av enkelte såkalte dørstokkarter. I vurderingene inngår artenes antatte økologiske effekt samt hvilket potensiale darten har for spredning og etablering. Vurderingene plasseres i kategorier fra Svært høy risiko (SE) til ingen kjent risiko (NK).

Kvaliteten på miljø-DNA analyser vil aldri være bedre enn de innsamlede prøvene. Korrekt prøvetakningsprotokoll og enhetlig behandling av prøvene er en forutsetning for å lykkes. Sted, vanndybde og tidspunkt på året vil ofte være utslagsgivende for hvilke arter som detekteres. Erfaring viser at DNA-rester i vannmiljøet spres effektivt hvis vannmassene blandes. Derfor kan sen høst og tidlig vår, når innsjøer normalt sirkulerer, være spesielt aktuelle for prøvetakning. Sjikting i innsjøer, for eksempel assosiert med termoklin eller salinitet, kan motsatt bidra til redusert innblanding av miljø-DNA. Derfor er det viktig å vurdere hvor i vannsøylen vannprøven bør tas. I tillegg vil det være sesongvariasjoner i mengden av miljø-DNA, avhengig av den aktuelle artens økologi og livssyklus. Særlig i forbindelse med fiskens gyteperiode kan man også forvente større mengder av miljø-DNA i vannet (Sigsgaard et al. 2017). Få studier har undersøkt fordelingen av miljø-DNA i vannsøylen, men det er rimelig å anta at vannprøver tatt langs bunnen vil ha sterkere signaler fra bunnlevende arter. Ved prøvetaking nær bunnen er det imidlertid viktig å unngå eller begrense mengden av organiske og uorganiske partikler i prøven. Partiklene kan (særlig i ferskvann) inneholde humusstoffer, som ødelegger eller reduserer følsomheten av de molekylærbiologiske undersøkelsene. For eksempel kan humusstoffer i noen tilfeller hemme selve «polymerase chain reaction» (PCR) prosessen (Goldberg et

al. 2015). Det er riktignok mulig å skille DNA fra humusstoffene før analysen, men det reduserer følsomheten betydelig.

Det er videre vist at miljø-DNA lagres lenge i sedimenter (Turner et al. 2015), og oppvirvling av sedimenter i vannprøven kan dermed lett bety DNA-kontaminering fra organismer som tidligere var en del av økosystemet, men som ikke nødvendigvis er det i dag.

Krysskontaminering har vært et tilbakevendende problem ved bruk av miljø-DNA og alle aspekter av både prøvetaking, prøvebehandling og analyse må vektlegge sikker behandling av prøvene. I dette prosjektet har vi vist at ved å bruke engangsprodukter for prøvetakning og ved å iverksette rigide vaskeprotokoller i lab er det mulig å arbeide med miljø-DNA uten krysskontamineringsproblematikk.

Denne utredningen ble utført på oppdrag fra Miljødirektoratet. Oppdraget var å utvikle og teste ut et system for bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy i overvåkning og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk for forvaltningen. Prosjektet har blitt behandlet som en fortsettelse av fjorårets miljø-DNA prosjekt som var et samarbeid mellom NINA og NIVA, vi har i stor grad bygd videre på resultatene fra Fossøy et al. (2018). Grunnet prosjektets korte varighet ble det valgt å ikke gjennomføre prøvefiske parallelt med hovedoppdraget, men å fokusere intensivt på molekylær metodeutvikling. Oppdragsgiver identifiserte 12 arter av ferskvannsfisk som målgruppe, hvor alle er klassifisert som enten fremmede eller regionalt fremmede arter (<https://www.artsdatabanken.no/fremmedartslista2018>). Vi har testet ulike eksisterende metodikk for feltarbeid og prøvetaking, og for protokoller og forenklet disse der dette har vært mulig. Vi har validert, og forbedret når nødvendig, eksisterende qPCR protokoller for ørret (*Salmo trutta*), gjedde (*Esox lucius*), pukkellaks (*Oncorhynchus gorbuscha*), ørekyt (*Phoxinus phoxinus*), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), karpe (*Cyprinus carpio*), karuss (*Carassius carassius*), abbor (*Perca fluviatilis*) og mort (*Rutilus rutilus*). Vi har ikke klart å validere hverken den eksisterende markøren eller protokollen for bekkerøye (*Salvelinus fontinalis*). Videre har vi utviklet nye og godt fungerende qPCR protokoller for sørv (*Scardinius erythrophthalmus*), suter (*Tinca tinca*) og solabbor (*Lepomis gibbosus*). Det ble samlet inn og sekvensert 11 individer av suter og 7 individer av sørv for generering av referansesekvenser. Rapporten sammenfatter erfaringene gjort i alle deler av prosessen, fra felt til ferdig data, og gir anbefalinger om prioriteringer og veien videre for perfektjonering av dette potensielt viktige verktøyet for miljøforvaltningen.

2 Metode

Det følgende kapitlet gir en kort gjennomgang av arbeidet som er gjort og metodikken som ble anvendt. Mer grundige beskrivelser finnes i referansene, for eksempel Thomsen et al. (2012), Agersnap et al. (2017) og Knudsen et al. (2018; 2019), med unntak av der endringer er gjort i dette prosjektet, som er beskrevet i detalj.

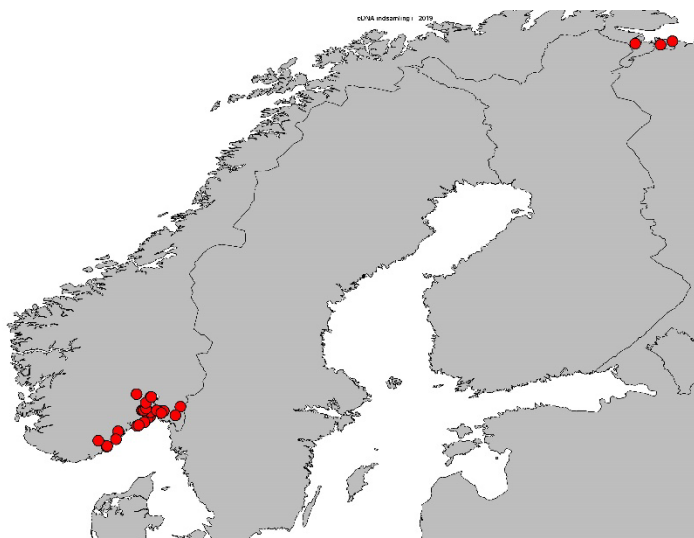
2.1 Prøvetakning

I 2019 ble det samlet inn vannprøver fra sju elver og 24 innsjøer med kjente fiskebestander (**Tabell 1**, **Figur 1** og **Vedlegg A**). De aktuelle elvene og innsjøene ble valgt for å utgjøre en «fasit» slik at prosjektet kunne fokusere på molekylær metodeutvikling. Utvelgelsen av lokasjonene var basert på informasjon fra Artsdatabanken, fiskekart utarbeidet av Fylkesmannen, rapporter og/eller muntlig informasjon fra Fylkesmann eller fra lokale jeger og fiskeforeninger. Det ble tilstrebet å finne innsjøer

Tabell 1. Oversikt over alle lokalitetene hvor det er analysert miljø-DNA prøver, inkludert oversikt over hvilke arter vi forventet å finne på lokaliteten.

Innsjø	Fylke	Kommune	Kilde	Gjedde	Abbor	Ørekyte	Karuss	Mort	Solabbor	Karpe	Bekke- røye	Regnbue- ørret	Pukkel- laks	Sørv	Suter	Ørret
Drengsrudbekken	Akershus	Asker	R*, M								X			X		X
Kråkstadelva	Akershus	Nedre Eiker	A									X				
Øvre Bårdsruddam	Akershus	Røyken	M						X					X		
Daletjenn	Aust-Agder	Arendal	A, R, M		X					X				X	X	
Høgstlidammen	Aust-Agder	Gjerstad	A									X				
Løvdalsvatn	Aust-Agder	Tvedestrand	A, R, M		X											X
Mortensplasztjenn	Aust-Agder	Arendal	R, M								X	x?			X	X
Solbergvann	Aust-Agder	Arendal	A, R		X					X				X	X	X
Tovdalselva	Aust-Agder	Åmli	A, R	X	X						X				X	X
Overnbekken	Buskerud	Modum	A, R, M								X					X
1. dammen	Vestfold	Tønsberg	FM, M							X						
Akersvannet	Vestfold	Stokke	F, FM	X	X	X								X		
Bakkanetjønn	Vestfold	Larvik	F, FM							X						X
Bergsvannet	Vestfold	Holmestrand	F, FM	X	X	X		X						X		
Borrevannet	Vestfold	Horten	F, FM	X	X	X		X						X	X	
Bugårdsdammen	Vestfold	Sandefjord	F, FM	X	X		X									
Hallevannet	Vestfold	Larvik	F, FM, M	x?	X									X		X
Korssjøen	Vestfold	Holmestrand	F, FM	X	X	X		X								
Revovannet	Vestfold	Re (Tønsberg)	F, FM	X	X			X								
Sollivannet	Vestfold	Holmestrand	F, FM				X								X	
Tuftdammen	Vestfold	Sande	FM, M							X?					X	
Ulfsbakktjern	Vestfold	Larvik	F, FM							X						
Bjørnrødsvann	Østfold	Råde	F	X	X			X						X		
Flesjøvannet	Østfold	Våler	F	X	X			X						X	X	
Molbekktjern	Østfold	Moss	A						X							
Rødenessjøen	Østfold	Marker	F, M	X	X	X		X						X		X
Stomperudtjernet	Østfold	Rakkestad	F	X	X		X	X						X		
Vansjø	Østfold	Råde	F	X	X			X						X	X	
Grene Jakobselv	Finnmark	Sør-Varanger	FM, r										X			X
Karpelva	Finnmark	Sør-Varanger	FM, r										X			X
Neiden	Finnmark	Sør-Varanger	FM, r										X			X

Kilder: A=Artsdatabanken, F=fiskekart, FM=Fylkesmannen, R*=Hestehagen og Kleiven 2013, R=Kleiven og Hesthagen 2012, r=Berntsen *et al.* 2018, M=muntlig lokalkjent. x? = usikker muntlig informasjon fra lokalkjent



Figur 1 Oversikt over stasjoner hvor miljø-DNA ble samlet inn i 2019.

der flere enn en av de 12 prioriterte artene er til stede slik at man kan få testet flest mulige markører for hver prøve (innsjø). I ni av innsjøene var det registrert minst fire av de 12 prioriterte artene, mens det i de resterende lokalitetene var en til tre arter til stede. De fleste innsjøene ligger på Østlandet og Sørlandet, da det var i disse områdene de fleste aktuelle artene er vanligst. Pukkellaks har klart høyest tetthet i Finnmark, og tre elver i Finnmark knyttet til denne arten ble prøvetatt. Innsamling av miljø-DNA-prøver på Østlandet og Sørlandet ble gjennomført på fra 23. juli til 31. august. De tre elvene i Finnmark ble prøvetatt 15. oktober, etter

oppvandringen av pukkellaks. Det ble samlet inn to parallelle prøver fra hver lokalitet, disse er tatt fra samme sted, direkte etter hverandre (det er prøvetatt en lokasjon per innsjø, med unntak av Akersvannet og Borrevannet, der det er samlet prøver fra to lokasjoner, **Vedlegg A**). Ved prøvetaking ble 1,5 liter overflatevann fylt i sterile engangsposer ved hjelp av engangs plastikkbeger. Vannposen ble montert i en lukket filtreringsopsats og oppsettet ble satt under trykk ved bruk av manuell pumpe eller elektrisk luftkompressor (**Vedlegg B**). Trykket ble satt til 3 bar. Tiden brukt på filtrering var 20 – 30 minutter per prøve. Filtrert vannvolum varierte fra 110 ml til 1200 ml per filter, avhengig av mengden partikler i vannet. Filteret ble deretter umiddelbart konservert med lysisbuffer (ATL). Til filtrering ble det benyttet Sterivex-filter som består av filter i en kapsel som reduserer faren for krysskontaminering og gjør det enkelt å tilsette ATL for oppbevaring og transport til laboratoriet.

Det mest hensiktsmessige tidspunktet for innsamling av prøver til miljø-DNA er trolig i gytetiden, når det er mest eksudater til stede i vannmassene. Prosjektets begrensede varighet gjorde imidlertid at innsamling i forbindelse med gytetiden bare lot seg gjøre for pukkellaks.

Som presisert ovenfor ble det ikke gjennomført prøvefiske i forbindelse med prøvetaking, da fokuset for prosjektet har vært å etablere fungerende molekylære protokoller.

2.2 Viktige hensyn ved prøvetaking

Det er vanligvis nødvendig med oppkonsentrering av vann for at prøver skal inneholde høye nok konsentrasjoner av miljø-DNA for analyse. Det finnes flere forskjellige filtreringsmetoder og filtre for dette, som alle har sine fordeler og ulemper. Den vanligste metoden er såkalt «dead-end filtration» med Sterivex kolonnefilter (Spens et al. 2017; Deiner et al. 2018). Fordelen med denne metoden er at filtret er inne i en kapsel og faren for krysskontaminering ved prøvetaking dermed begrenses. Etter filtrering må filtrene konserveres slik at DNAet ikke brytes ned før det kommer til laben. Det anbefales at filtrering og påfølgende fiksering gjøres umiddelbart etter prøvetaking. Degradering av DNA vil kunne føre til at lavere konsentrasjoner av miljø-DNA, og i verste fall at prøven blir registrert som negativ. En grei måte for fiksering av feltprøver har vært innfrysing på medbrakt tørris eller flytende nitrogen. Det er upraktisk i overvåkningsammenheng å være avhengig av å ha med tørris i

felt og vi har derfor valgt en annen fremgangsmåte, der filteret konserveres direkte på ATL fikseringsbuffer og oppbevares i romtemperatur.

Vannprøvene ble filtrert ved bruk av et "Pressure Assisted Filtration system» (PAF) umiddelbart etter prøvetaking eller senest etter 2 timer. Ved denne metoden føres prøven gjennom en filtermembran med overtrykk, uten bruk av mekaniske pumper som kan komme i kontakt med prøven. Overtrykksfiltrering gjør det også mulig å påføre et betydelig høyere trykk på filtermembranen, sammenlignet med vakuumfiltrering. Ved vakuumfiltrering ville det ikke være mulig med en trykkforskjell til membranen på mer enn 1 bar. Ved trykkfiltrering er den begrensende faktoren for trykkbelastningen kun filtermembranens styrke. Videre må en sikre at filteret ikke ødelegges på grunn av for høyt trykk. Utstyret en bruker til trykkassistert filtrering forhindrer også at filteret belastes utover spesifikasjonene fra leverandøren (maks 3 bar). Ved alternativ filtrering med håndholdt sprøyte vil det være vanskelig å unngå å overbelaste filtermembranen. Hele metoden for filtrering følger tidligere protokoll som ble utviklet i forbindelse med overvåking av fremmede marine arter i danske havner (Andersen et al., 2016; 2017; Knudsen et al., 2018, samt **Vedlegg B**).

Utstyret som brukes til trykkassistert filtrering, kombinert med engangs-kit til filtrering gir størst mulig sikkerhet for å unngå krysskontaminering, fordi prøven kun kommer i kontakt med engangsmaterialer. Det er heller ingen kontakt mellom prøven og pumpeutstyr som driver prøven gjennom filteret. Ved prøvetaking er følgende faktorer viktige for å minimere risikoen for krysskontaminering:

- Prøvene må aldri tas av personer som samtidig arbeider med håndtering av organismer som er målart i prøven.
- Prøvetakere skal alltid bruke engangshansker.
- Prøvetakingen skal utføres med engangsutstyr, eventuelt må alt utstyr som flyttes mellom lokaliteter kles mellom hver forflytting.
- Prøver skal aldri komme i kontakt med hverandre. Det må som utgangspunkt tas en blank prøve (negativ kontroll) i felt, samtidig med den øvrig innsamling, for eksempel av springvann.

2.3 Molekylære metoder

2.3.1 DNA-isolering

Samtlige feltprøver ble fraktet direkte til Sharelab AS i Forskningsparken, hvor de ble oppbevart i kjøleskap frem til DNA ekstraksjon. Denne lab'en ble valgt for å forhindre krysskontaminering inn i NIVA's hovedlab, der de senere qPCR kjøringene skulle utføres. Filtrene ble ekstrahert med DNeasy blood & tissue kit fra Qiagen, med protokoll i henhold til Spens et al. (2017).

2.3.2 Etablering av nye qPCR markører

Det ble designet nye artsspesifikke primere og prober (heretter omtalt som samlet som markører) for tre arter: sørv, suter og solabbor (**Tabell 2**). Foreslåtte primer- og probesekvenser ble manuelt kvalitetssikret og validert gjennom følgende steg:

- **In silico test:** Både primere og prober (der det var mulig) ble designet til å være spesifikk mot den ønskede artens DNA ved hjelp av DNA-sekvenser fra både målarten og andre beslektede arter, hentet ut fra NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). De designede primere og prober ble optimalisert ved hjelp av dataprogrammet Geneious v10.1.3 (Kearse et al. 2012).
- **In vitro test:** De nye qPCR markørene ble videre testet på DNA ekstrahert fra vev fra målarten. Avslutningsvis ble de nye markørene vurderet for optimal primer- og probe

konsentrasjon og optimal arbeidstemperatur for annealing (T_a) for å sikre best mulig deteksjon av miljø-DNA. Optimalisering av konsentrasjoner ble basert på fremgangsmåten beskrevet i tidligere miljø-DNA studier (Agersnap et al., 2016; Knudsen et al., 2019). Dette er oppsummert i **Tabell 2**.

- **In vivo test:** *In vitro*-testede qPCR protokoller ble testet og validert på vannprøver innsamlet i felt.

Det ble i tillegg samlet inn vevsprøver av sørv og suter for DNA-sekvensering. Totalt ble det samlet inn 25 vevsprøver av sørv fra Melautjørn og Hallevannet og 23 vevsprøver av suter fra Tuftdammen, Kroktjern, Vinnkultjern og Nedre Bårdsruddam («Kasut»). Markøren for solabbor ble testet på en vevsprøve samlet inn fra Øvre Bårdsruddam i 2018. Samtlige vevsprøver er DNA-isolert med Qiagen's Blood and Tissue Kit og ett individ fra hver lokalitet ble benyttet til å teste de nyutviklede qPCR markørene.

2.3.3 Sekvensering av sørv og suter

Vevsprøver fra 11 individer av sørv og 7 individer av suter ble sekvensert ved bruk av universelle fiskeprimere for det mitokondrielle genet cytochrome c oxidase I (COI) for å generere referansesekvenser. Et 655bp (707bp med primere) amplikon ble generert ved bruk av SsoFast mastermix (Bio-Rad) og primerne FishF1 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' og FishR1 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' (Ward et al. 2005), etter protokollen i Anglès d'Auriac et al. 2019. Sekvensrensing ble utført ved bruk av BigDye XTerminator Purification kit (Life Technologies, Applied Biosystems) og analysert i en ABI3730XL DNA-analysator (Life Technologies, Applied Biosystems). Sporefileanalyser ble utført ved bruk av CodonCode Aligner v7 (CodonCode Corporation).

2.3.4 qPCR

Alle qPCR kjøring er gjort ved NIVAs hovedlaboratorium i Oslo, med to CFX96 Bio-Rad qPCR instrumenter. Primer- og probe sekvenser (markører), samt nøkkelinformasjon for protokollene er oppsummert i **Tabell 2**. Alle qPCR reaksjoner er kjørt med 5 µl templat og totalt reaksjonsvolum på 25. Vi benyttet PerfeCTa qPCR ToughMix (QuantaBio), og det ble kjørt triplikater av alle prøver. Ved qPCR kjøring av miljøprøver inkluderes alltid en positiv kontroll i form av standardkurve laget av kalibrert genomisk DNA fra målarten. I tillegg inkluderes to typer negative kontroller: I tre brønner tilsettes 5 µl rent vann (dH₂O) til reaksjonen istedenfor templat. Disse brønnene forsegles først og fungerer som kontroll mot krysskontaminering av reagensene. I midten av plata er det ytterligere seks «blanke brønner» hvor det også tilsettes 5 µl dH₂O til reaksjonen, disse forsegles sist og fungerer som kontroll mot krysskontaminering ved lasting av prøvene. Alle kontroller som er benyttet i prosjektet er oppsummert i **Tabell 3**. Det ble også implementert strenge vaskerutiner på laben for å redusere muligheten for krysskontaminering: Alle overflater, samt pipetter, gjenbruksvarer og håndtak ble vasket før og etter hver bruk, først med 1 % klorløsning og deretter med EtOH.

qPCR reagenset TaqMan Environmental Mastermix er mye brukt for analyser av miljø-DNA (Fossøy et al. 2017; Andersen et al. 2016; Knudsen et al. 2018). I dette prosjektet testet vi et annet reagens, PerfeCTa qPCR ToughMix, ved å reanalysere en prøve fra Øvre Bårdsruddam for solabbor. Tidligere har vi ikke påvist solabbor på denne lokaliteten pga. inhibisjon i prøven (Fossøy et al. 2018). Den nye prøven var positiv ved bruk av det nye reagenset. På bakgrunn av dette besluttet vi å benytte PerfeCTa qPCR ToughMix på alle prøvene som er analysert i dette prosjektet.

Tabell 2. Markører og qPCR protokoller for alle fremmede fiskearter inkludert i dette prosjektet. Kons. (nM) angir den optimale sluttkonsentrasjon av primere og probe, dette er den konsentrasjonen som er vurdert å gjøre protokollen mest spesifikk for målarten, og er den som ble brukt i alle qPCR analysene.

Art / markør	Sekvens navn	Sekvens (fram, reverse og probe)	Ta °C	Kons. (nM)	Amp. (bp)	Ref.
Ørret (<i>Salmo trutta</i>) / Cyt B	CarimSt-F	CGCCCGAGGACTCTACTATGGT	60	600	108	Carim et al. (2016)
	CarimSt-R	GGAAGAACGTAGCCACGAA		300		
	CarimSt-P	FAM-CGGAGTCGACTGCTAC-MGBNFQ		250		
Gjedde (<i>Esox lucius</i>) / Cyt B	El_CytB_177-199_F	CTCCACAGCCTTCTCATCAGTCT	60	900	65	Fossøy et al. (2017)
	El_CytB_218-241_R	TTCGGATAAGTCAGCCGTAGTTAA		900		
	El_CytB_201-216_P	HEX-CCACATCTGCCGGGAC-MGB-EQ		250		
Ørekyt (<i>Phoxinus phoxinus</i>) / CTRL	Orekyt_CTRL_19-42_F	GGATGGCTAACCCATATCTCAACT	60	900	69	Fossøy et al. (2017)
	Orekyt_CTRL_68-88_R	GTCAAACCCCAAAAGCAAGGA		900		
	Orekyt_CTRL_51-64_P	Cy5-CGCACGCTCTCGAA-MGB-EQ		250		
Pukkellaks (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>) / COI	Oncgor_CO1_F09	TCCTTCCTCCTCCTCTTTC	60	400	163	Andersen et al. (2017)
	Oncgor_CO1_R06	TGGCCCCTAAAATTGATGAG		400		
	Oncgor_CO1_P06	FAM-CAGGGGCATCCGTCGACTTAACTAT-BHQ-1		100		
Regnbueørret, (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) / NADH	Omyk_F	AGTCTCTCCCTGTATATCGTC	60	300	102	Wilcox et al. (2015)
	Omyk_R	GATTTAGTTCATGAAGTTGCGTGAGTA		600		
	Omyk_P	FAM-CCAACAACCTTTAACCATC-MGB-NFQ		250		
Abbor (<i>Perca fluviatilis</i>) / 12S rDNA	P.flu_12S_F	GGGATTAGATACCCCACTATGCCT	60	900	92	Furlan and Gleeson (2016)
	P.flu_12S_R	GGTTTCAAGCTGATGCTCGTAGTT		900		
	P.flu_12S_probe	FAM-CCATAAACATTGGTAGCACACT-MGB-EQ		250		
Bekkerøye (<i>Salvelinus fontinalis</i>) / CytB	BekkeR_BRK2_F	CCACAGTGCTTCACCTTCTATTTCTA	60	900	140	Wilcox et al. (2013)
	BekkeR_BRK2_R	GCCAAGTAATATAGCTACAAAACCTAATAGATC		900		
	BekkeR_BRK2_P	FAM-ACTCCGACGCTGACAA-MGB-EQ		250		
Karpe (<i>Cyprinus carpio</i>) / ITS1	CpITS1-F	TTCAAAGACCCCCGTAAC	58	900	84	Minamoto et al. (2017)
	CpITS1-R	GCCATGCCGCACACA		900		
	CpITS1-P	FAM-TCACGACCCCTTATTTTTCCAAAACC-BHQ1		120		
Karuss (<i>Carassius carassius</i>) / CytB	CruCarp_CytB_984F	AGTTGCAGATATGGCTATCTTAA	60	900	118	Harper et al. (2018)
	CruCarp_CytB_1101R	TGGAAAGAGGACAAGGAATAAT		600		
	CruCarp_CytB_1008Probe	FAM-ATGGATTGGAGGCATACCAGTAGAACACC-BHQ-1		125		

Mort (<i>Rutilus rutilus</i>) / 16S	Mort_16S_312-331_F	TCCGAGTGGACTGGGCTAAA	60	900	100	Fossøy et al. (2017)
	Mort_16S_351-374_R	CAGATGTTCTGCGGCTTATAGATG		900		
	Mort_16S_334-348_P	FAM-CCCAAAGCCAAGAGA-MGB-EQ		250		
Solabbor (<i>Lepomis gibbosus</i>) / Mitochondrial cytb	Pumpkinseed:CytB-F	GCCGCCACTGTAATTCACC	58	200	75	Denne studien
	Pumpkinseed:CytB-R	TGCGTCCGAGTTTAAGCCTA		1000		
	Pumpkinseed:CytB-P	FAM-CACGAAACAGGCTCCAACAACCC-BHQ-1		250		
Sørø (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>) / Mitochondrial COI	Rudd:COI570F19	CAATGCTTCTTACAGACCG	58	200	80	Denne studien
	Rudd:COI627R23	GTGTTGATATAAGATTGGGTCTC		400		
	Rudd:COI597P21	FAM-ATACCACATTCTCGACCCAG-BHQ-1		250		
Suter (<i>Tinca tinca</i>) / Mitochondrial COI	Tench:COI543F20	TCTTCTATCACTTCCGGTTC	58	200	70	Denne studien
	Tench:COI590R23	TGTAGTGTTAAGATTACGGTCTG		400		
	Tench:COI566P20	FAM-CTGCTGGGATCACAATGCTT-BHQ-1		250		

For karpe ble den opprinnelig publiserte proben modifisert ved at TAMRA-quencheren (som er brukt i den opprinnelige publikasjonen (Minamoto et al. 2017)) ble byttet ut med BHQ1 (black hole quencher). Det eliminerte unødvendig bakgrunnsstøy i reaksjonen og den publiserte markøren fungerte godt med denne modifikasjonen

2.3.5 Ørret som inhiberingskontroll

Vannprøver inneholder ofte PCR-hemmende stoffer, spesielt i ferskvann, der partikler og humusstoffer er vanlig, dette kan nødvendigvis utgjøre en stor feilkilde ved analyse av miljø-DNA. Alle innsamlede miljø-DNA prøver ble testet for mulig inhibisjon ved bruk av en egen positiv kontroll. Prinsippet er å bruke en markør for en vanlig fiskeart, i dette tilfellet ørret (*Salmo trutta*), som ekstraksjon- og inhiberingskontroll for miljø-DNA prøvene. Alle innsamlede miljø-DNA prøver ble testet for inhibisjon på følgende måte: Miljø-DNA prøven ble analysert for ørret alene, de ble analysert med 2,5 µl miljø-DNA prøve, tilsatt 2,5 µl kalibrert DNA av ørret og med 2,5 µl dd H₂O tilsatt 2,5 µl kalibrert ørret-DNA. Opprinnelig var det foresatt å bruke en markør for ørret publisert av Matejusova et al. (2008), men denne ga ikke akseptabel PCR effektivitet (utenfor den aksepterte effektiviteten 95-105 %), og vi byttet derfor til en markør publisert av Carim et al. (2016) (**Tabell 2**), som fungerte godt. Alle kontrollene som er brukt i prosjektet er oppsummert i **Tabell 3**.

Tabell 3. Oversikt over alle positive og negative kontroller som skal inkluderes i alle qPCR-kjøringer. Kontroll 1, 2 og 3 ble brukt ved testing av de innsamlede miljø-DNA prøvene, mens kontroll 4, 5 og 6 ble brukt ved alle ordinære prøvekjøringer.

Navn	Beskrivelse	Hvilken prøve	Hensikt
1 Miljø ekstraksjon positiv kontroll	<i>S. trutta</i> deteksjon	Test alle miljø-DNA prøver	miljø-DNA ekstraksjon positiv kontroll (og inhibering kontroll)
2 Miljø inhibering kontroll	2,5 µL miljø-DNA prøve tilsatt 2,5 µL kalibrert <i>S. trutta</i> DNA	Test alle miljø-DNA prøver	Inhibering kontroll
3 Positiv kontroll	2,5 µL dd H ₂ O tilsatt 2,5 µL µL kalibrert <i>S. trutta</i> DNA	Test alle miljø-DNA prøver	qPCR kontroll som også brukes for å evaluere miljø inhibering kontroll.
4 Positiv kontroll	5 µL kalibrert DNA av mållarten	Ordinære prøvekjøringer	Standardkurve for mållarten, inkludert i alle prøvekjøringer.
5 Negativ kontroll	5 µL dd H ₂ O brukes som prøve i 3 brønner per plate på alle prøvekjøringer.	Ordinære prøvekjøringer	Kontroll for krysskontaminering av reagenser, lastes og forsegles først.
6 Negativ kontroll	5 µL dd H ₂ O brukes som prøve i 6 brønner (i midten av plata) på alle prøvekjøringer.	Ordinære prøvekjøringer	Kontroll for krysskontaminering ved lastning av prøve. Disse brønnene forsegles sist.

2.3.6 Definisjon av deteksjonsgrenser (LOD og LOQ):

I alle qPCR analyser av miljø-DNA prøver ble det også inkludert en positiv kontroll, i form av DNA isolert fra vev fra mållarten. Den positive kontrollen ble analysert i en fortytningsserie med kjent DNA-konsentrasjon, for å lage en standardkurve. Denne standardkurven ble benyttet til å gi et estimat for hvor mye miljø-DNA fra mållarten som var til stede i prøven. Konsentrasjonen av miljø-DNA i prøven fungerer som en grov proxy for artstetthet der prøven ble tatt.

Deteksjonsgrensen (LOD, limit of detection) defineres ut fra standardkurven som den laveste standardkonsentrasjonen som amplifiseres. Grensen for kvantifisering (LOQ, limit of quantification)

defineres ut fra den lavest reproduerbare standarden. På bakgrunn av de negative kontrollene, LOD og LOQ, er resultatene i denne rapporten er fargekodet i tre kategorier, disse brukes også i resultatgjennomgangen i **Tabell 4**:

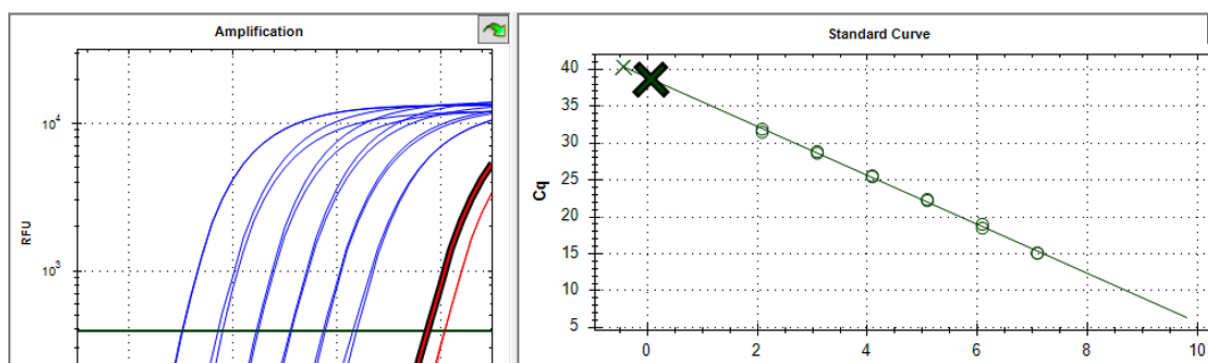
- 1) **Positive prøver (grønne)** er prøver med klar qPCR amplifisering av målarten.
- 2) **Usikre positive prøver (oransje)** har qPCR amplifisering av målarten, men som amplifiserer senere enn den laveste standarden, eller bare en eller to av triplikatene amplifiserer.
- 3) **Negative prøver (røde)** er de hvor det ikke er qPCR amplifisering av målarten.

For prøvene som faller i den grønne kategorien (positive prøver) og er over LOQ vil det være mulig å relatere resultatene fra miljø-DNA prøvene med den kjente konsentrasjonen i standardkurven. På denne måten kan man anslå tetthet av arten på stedet prøven ble samlet. Dette krever en del videre arbeid og dataanalyse og er ikke innbefattet i dette prosjektet.

Den oransje kategorien (usikre, positive prøver) omfatter miljø-DNA prøver som viser positive qPCR signaler for målarten, men hvor signalet enten ikke er reprodukbart, eller hvor qPCR signalet er lavere enn den laveste standard. Disse er definert ved at kun en eller to av triplikatene amplifiserer.

2.3.7 Bruk av kalibrert qPCR produkt som standardkurve

Det er mulig å lage standardkurvene fra rensert og kalibrert qPCR produkt istedenfor å lage dem av genomisk DNA, som er vanlig. Etter at en qPCR reaksjon er utført er det generert enorme mengder av mål-DNAet – langt mer enn hva man finner i naturlige prøver. Fordelen med dette er for det første at man kan regne ut antall kopier av genet man amplifiserer fra molekylvekten til produktet. Dermed blir det mulig å regne ut antall kopier av målgenet i den naturlige prøven. Slik kan man i prinsippet også gi et visst estimat for populasjonsstørrelsen til målarten. Den andre fordelen er at det rensede DNAet, med høy startkonsentrasjon gjør det mulig å konstruere standardkurver med stor dynamisk «range», altså man kan amplifisere standarder med både høye og lave konsentrasjoner. Dette er vist i **Figur 2** hvor seks standarder amplifiserer (blå linjer). Det muliggjør kvantifisering av resultater over et spekter på 10^6 kopier av genet som er amplifisert. Svakheten ved denne fremgangsmåten er at man risikerer krysskontaminering, på grunn av de høye DNA nivåene i qPCR produktene. I dette prosjektet testet vi denne fremgangsmåten for tre arter: ørret, gjedde og abbor. Det ble implementert meget strenge forhåndsregler for å unngå krysskontaminering og qPCR platene ble åpnet utendørs og langt unna lab'området (taket av Forskningsparken/Blindern). Likevel ble det påvist (riktignok lave) nivåer av krysskontaminering, de røde linjene i **Figur 2** viser amplifisering i de negative kontrollene for gjedde.



Figur 2. Standardkurve generert av kalibrert qPCR produkt av gjedde. De blå linjene viser 6 standarder som har amplifisert godt, dette representerer et spekter fra veldig mye til veldig lite mål-DNA i prøven. Dessverre vises også krysskontaminering ved at de negative kontrollene amplifiseres (røde linjer). Høyre side viser den kalkulerte regresjonslinjen til standardkurven, med meget gode qPCR verdier, E=100% og $r^2=0,998$.

2.3.8 Plot av miljø-DNA data på kart

Kartet med miljø-DNA nivåer og innsamlingslokaliteter ble generert i R v3.5 (R Core Team, 2018) med pakkene: 'mapdata' (Becker et al., 2018), 'scales' (Wickham et al., 2018a), 'RColorBrewer' (Neuwirth, 2014), og 'tidyr' (Wickham et al., 2018b).

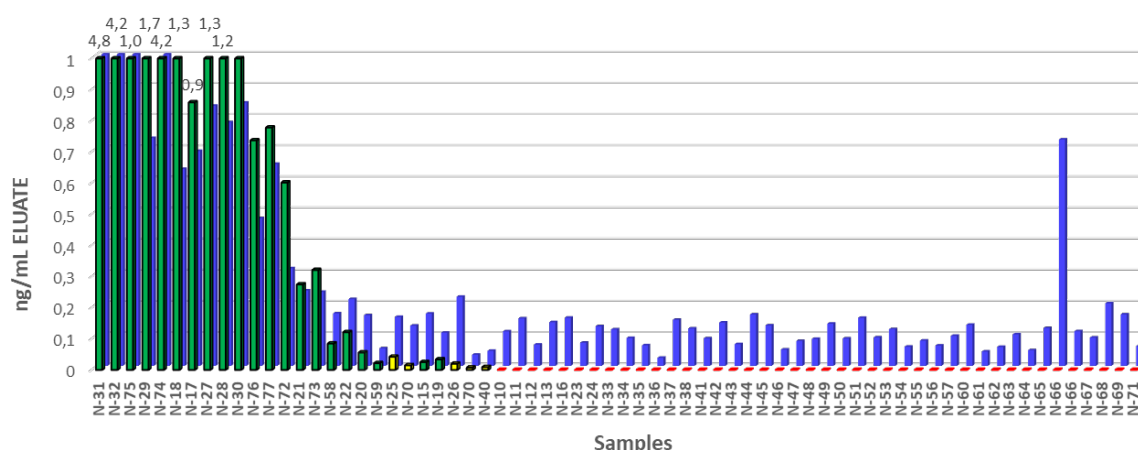
3 Resultater og diskusjon

I dette prosjektet har vi analysert miljø-DNA prøver med den molekylære metoden qPCR med tanke på at metodikken skal kunne implementeres av forvaltningen for tidlig deteksjon av invaderende fremmed ferskvannsfisk. Her presenterer vi resultatene fra miljø-DNA analysene for ørret, gjedde, pukkellaks, ørekyt, regnbueørret, karpe, karuss, abbor og mort, samt resultatene fra de nytviklede markørene for sørv, suter og solabor.

3.1 qPCR inhiberingskontroll

Vi benyttet ørret som positiv kontroll for å få et estimat for omfanget av feilkilder i prøvene som ble analysert i dette prosjektet. Ørret ble valgt fordi det ble antatt at den fantes i de fleste systemene. Da en andel av prøvetakningslokalitetene imidlertid er små dammer hvor det forventes å finne karpfisker fungerte dette likevel bare delvis. Samtlige miljø-DNA prøver (totalt 66 stk.) ble testet for inhibering etter oppsettet beskrevet i seksjon 2.3.4, ved bruk av kalibrert ørret DNA. Reaksjonene ble kjørt med PerfeCTa qPCR ToughMix (**Figur 3**). Figuren viser en oversikt fra inhiberingstesten, prøvenummeret er de samme som oppgitt i **Vedlegg A**. Alle grønne søyler viser amplifisering av ørret-DNA mens de røde er prøver uten påviselig ørret-DNA. Blå søyler er kalibrert ørret-DNA tilsatt miljø-DNA prøvene. Om man forventer inhibering skal prøvene ikke amplifisere, (eventuelt skal amplifiseringen øke når DNA-mengden man tilsetter reaksjonen halveres, noe som ikke skjedde; resultater ikke vist).

Resultatene var overraskende gode og vi så ingen tegn til inhibering bortsett fra Tuftdammen, som viste svak inhibering. Selv om det blir påvist lave nivåer av inhibering i disse prøvene tester likevel



Figur 3. Oversikt over alle miljø-DNA prøvene som ble analysert. Prøvenummer viser til vannforekomst gitt i Vedlegg A (Den høye blå søylen for prøve N-66 er resultat av en manuell feil, ved at prøvebrønnen ble tilsatt kalibrert ørret-DNA to ganger).

både markøren for sørv og suter positivt på lokaliteten. Vår evaluering er at det lave inhibisjonsnivået kan forklares, hvertfall delvis, av polymerase-byttet til PerfeCTa qPCR ToughMix.

3.2 Kalibrert qPCR produkt som standardkurve

Opprinnelig ønsket vi å bruke kalibrert qPCR produkt som standardkurve (se avsnitt 2.3.6). **Figur 2** viser en kalibrert standardkurve generert av qPCR produkt fra gjedde. Metoden utløste imidlertid lave nivåer av krysskontaminering. Videre viser det seg at krysskontamineringen har påvirket resultatet når vi har analysert miljø-DNA prøvene for gjedde og abbor. Alle negative kontroller viser forskjellige grader av krysskontaminering for gjedde, og i mindre grad for abbor. Forsøket med kalibrert qPCR produkt ble også gjort for ørret, men her har vi underveis byttet hvilket qPCR markør som ble brukt, noe som sannsynligvis forklarer at det ikke ble problemer med denne. Krysskontamineringsproblemer er høyst spesifikke, så selv om et miljø er kontaminert med en type DNA vil ikke dette påvirke andre analyser. Vi har gått bort fra praksisen om å bruke qPCR produkter til standardkurvene og vil i fremtiden ikke anbefale å åpne forseglede qPCR plater med miljø-DNA under noen omstendigheter.

3.3 Artsspesifikke qPCR protokoller

Valideringen av de tidligere publiserte markørene (**Tabell 2**) viste at alle fungerte tilfredsstillende, med unntak av solabbor og bekkerøye. Det ble designet ny markør og hele protokollen testet og validert for solabbor, samt for sørv og suter. Protokollen for bekkerøye fungerte ikke på hverken referansmateriale (vevsprøve fra bekkerøye) eller miljø-DNA prøvene. Denne markøren er tidligere validert av NINA (Fossøy et al. 2018) og grunnen til svikende funksjon kan være at de bestilte primerne eller proben (oligoer) ikke fungerte. Dette er et uvanlig problem, men det kan skje. Det var dessverre ikke tid til å bestille opp nye oligoer og gjøre arbeidet på nytt. Vi fikk derfor ingen resultater for bekkerøye og den er ikke omtalt videre i resultatene.

Sørv

Det er blitt designet en ny markør og validert ny qPCR protokoll for sørv (**Tabell 2**). Protokollen produserer gjentagende gode qPCR resultater og effektiviteten ligger nært opptil 100 % (mellom 98.8 og 100.1 %), R^2 verdier 0.997 (en kjøring med 0.984). Markøren er imidlertid ikke helt artsspesifikk, da den også vil amplifisere de nært beslektede artene *Scardinius elmaliensis*, *S. hesperidicus*, *S. knezevici*, *S. plotizza*, *S. racovitzai* og *S. scardafa*. Ingen av disse artene er registrert i Norge (Freyhof and Kottelat 2007), og sannsynligheten for kryssamplifisering vil derfor ikke være svært liten. I tillegg vil en registrering av de sistnevnte artene også bli registrert som invaderende, og vi vurderer derfor markøren som tilstrekkelig spesifikk.

Suter

Det er blitt designet en ny artsspesifikk markør og validert ny qPCR protokoll for suter (**Tabell 2**). Protokollen produserer gjentagende optimale qPCR resultater med effektivitet på 100 % og R^2 verdier 0.999.

Solabbor

Det er blitt designet en ny artsspesifikk markør og validert ny qPCR protokoll for solabbor (**Tabell 2**). Protokollen produserer gjentagende gode qPCR resultater med effektivitet på 104 % og R^2 verdier 0.999.

3.4 Sekvensering av sørv og suter

Det ble sekvenser totalt 11 individer av sørv og 7 individer av suter. De resulterende sekvensene ble gjort allment tilgjengelige ved publisering i NCBI Genbank med GenBank accession numbers MT216173 - MT216188.

3.5 Resultater miljø-DNA

Alle resultater er oppsummert i **Tabell 4** og en mer detaljert gjennomgang følger under. Verdt å nevne er likevel at med unntak av for gjedde og abbor (beskrevet i seksjon 3.2) så har vi ikke sett noe krysskontaminering i dette prosjektet, og samtlige negative kontroller har vært negative.

Tabell 4. Oversikt over alle resultater fra analyser av miljø-DNA i dette prosjektet. Alle lokaliteter hvor arten er registrert tidligere og vi følgelig forventet å registrere miljø-DNA av målarten er merket med «X». Positive prøvesvar (tilstedeværelse av arten, detektert med miljø-DNA) er grønne, usikre prøver er oransje og negative prøver (ikke detektert tilstedeværelse med miljø-DNA) er røde.

Innsjø	Fylke	Gjedde	Abbor	Øre- kyte	Karuss	Mort	Sol- abbor	Karpe	Regnbu eørret	Pukkel- laks	Sørv	Suter	Ørret
Drengsrudbekken	Akershus										X		X
Kråkstadelva	Akershus								X				
Øvre Bårdsruddam	Akershus						X				X		
Daletjenn	Aust-Agder		X					**			X	X	
Høgstlidammen	Aust-Agder								X		*		
Løvdalsvatn	Aust-Agder		X		?								X
Mortensplasztjenn	Aust-Agder								?			X	X
Solbergvatn	Aust-Agder		X					X			X	X	X
Tovdalselva	Aust-Agder												X
Overnbekken	Buskerud												X
1. dammen	Vestfold							X					
Akersvannet	Vestfold	X	X	X							X		
Bakkanetjønn	Vestfold							X					X
Bergsvannet	Vestfold	X	X	X		X					X*		
Borrevannet	Vestfold	X	X	X		X					X	X	
Bugårdsdammen	Vestfold	X	X		X								
Hallevannet	Vestfold	?	X								X		X
Korssjøen	Vestfold	X	X	X		X							
Revovannet	Vestfold	X	X			X							
Sollivannet	Vestfold				X						*	X	
Tuftdammen	Vestfold				?			?				X	
Ulfsbakk tjern	Vestfold							X					
Bjørnrødvann	Østfold	X	X			X					X		
Flesjøvannet	Østfold	X	X			X					X	X	

Molbekktjern	Østfold						X						
Rødenessjøen	Østfold	X	X	X		X					X		X
Stomperudtjernet	Østfold	X	X		X	X					X		
Vansjø	Østfold	X	X			X					X	X	
Grense Jakobselv	Finnmark									X			X
Karpelva	Finnmark									X			X
Neiden	Finnmark									X			X

*en prøve klar positiv, en prøve klar negativ

** Det er registrert karuss i Daletjenn (**Tabell 1**), men dette var vi ikke klar over ta analysene ble utført. Miljø-DNA prøvene fra Daletjenn er derfor ikke analysert for karuss.

Gjedde (*Esox lucius*)

Gjedde er en regional fremmed art som naturlig kun skal befinne seg i på Østlandet, Trøndelag, Troms og Finnmark, men som i nyere tid har vært flyttet til nye vassdrag. Derfor er gjedde en viktig art å kunne påvise med sikkerhet. Det var ikke mulig å samle prøver på hva vi antar er et optimalt tidspunkt for gjedde i dette prosjektet og det var generelt relativt lave konsentrasjoner av miljø-DNA fra gjedde i prøvene. Gjedde gyter på våren (april-mai), og oppholder seg gjerne på grunne områder med mye vegetasjon der den venter i skjul på byttefisk. Optimalt tidspunkt for innsamling av prøver til analyser av miljø-DNA vil være under gyteperioden i april – mai. Vi anbefaler å optimalisere prøvetakingstidspunkt for gjedde ved fremtidig kartlegging av denne arten ved hjelp av miljø-DNA.

Det ble krysskontaminering på laben i forbindelse med forsøket om å bruke kalibrert qPCR produkt for generering av standardkurve (se avsnitt 2.2.6), noe som gjør resultatene for denne arten tvetydige. Som det kommer frem av **Tabell 4** kom ingen av prøvene ut negative og det var i tillegg amplifisering i alle negative kontroller. Dette viser tydelig et krysskontamineringsproblem, men amplifiseringen i de negative kontrollene gjør det mulig å anslå mengden av kontamineringen. Det er akseptabelt å anta at de prøvene som amplifiserer betydelig tidligere enn de negative kontrollene inneholder så mye mer miljø-DNA at de bør klassifiseres som positive. Det gjelder Borrevannet, Bjørnrødvann, Akersvannet, Bugårdsdammen og til en viss grad Vansjø.

Abbor (*Perca fluviatilis*)

Det ble registret krysskontamineringsproblemer med abbor (se avsnitt 2.3.6), men i betydelig lavere nivåer enn for gjedde. Dette gjør at resultatene for abbor er mer robuste. Også for abbor er graden av amplifikasjon i de negative kontrollene brukt til å definere hvilke prøver som anses som reelle positive prøver. På grunn av det lave nivået av krysskontaminering for denne markøren er det større sikkerhet til miljø-DNA resultatene. Dette fordi vi vet fra amplifiseringen av de negative kontrollene konsentrasjonen av miljø-DNA som kontaminerer prøvene, så når amplifiseringen skjer betydelig tidligere (altså prøven inneholder mer miljø-DNA enn kontamineringen) kan man være sikker på at det er en reell positiv prøve.

Alle lokaliteter som var forventet å være positive var det, med spesielt høye nivåer av miljø-DNA detektert i Stomperudtjern, Flesjøvannet, Bjørnrødvann og Bugårdsdammen. I Akersvannet ble det tatt prøver på to forskjellige steder og her har en lokalitet høye nivåer av miljø-DNA, mens den andre lokaliteten har så lave verdier at de ikke kan skilles fra krysskontamineringen. Akersvannet har tette bestander av abbor. Prøvene med høye verdier ble samlet inn i nærheten av en god fiskeplass for abbor og det ble observert abbor i vannet da prøven ble tatt. Den andre lokaliteten fra Akersvannet var tatt i litoral med mye vegetasjon, som kan ha vært mindre tilgjengelig for abbor. Bergsvannet hadde lave konsentrasjoner av miljø-DNA. Amplifisering gir inntrykk av å være korrekt, men nær grensen for krysskontaminering.

Ørekyt (*Phoxinus phoxinus*)

Det var ikke amplifisering på noen av lokalitetene hvor det ble forventet å finne ørekyt. Det ble kjørt en del ekstra prøver og det var kun på Mortensplasstjenn at det var antydning til deteksjon av miljø-DNA fra arten. Ørekyt er en liten karpefisk (8-10 cm) som gyter om sommeren, og opptrer ofte i stimer på grunt vann. Innsjøene som ble sjekket for ørekyt er i all hovedsak relativt store innsjøer og tettheten av ørekyt i disse er ikke kjent. Om tettheten er lav vil det kunne gjøre det utfordrende å påvise ørekyt ved hjelp av miljø-DNA. Markøren er manuelt sjekket og protokollen fungerer godt på vevsprøver, vi har derfor konkludert med at prøvene var negative og at den molekylære protokollen fungerte som den skulle. Det anbefales likevel videre testing for optimalisering av prøveinnsamling for ørekyt.

Karuss (*Carassius carassius*)

Deteksjon av karuss har fungert godt og den er detektert med miljø-DNA på tre av de fem lokalitetene hvor vi forventet å finne den. Konsentrasjonen av miljø-DNA i prøven var betydelig høyere i Sollivannet enn ved de andre to lokalitetene, Bugårdsvannet og Stomperudtjernet. Blant lokalitetene der vi hadde opplysninger om at arten skulle finnes var det kun i Løvdalsvatn og Tuftdammen at den ikke ble detektert. Informasjonen om at det var karuss i Løvdalsvatn ble gitt muntlig fra en lokal fritidsfisker og vi har ikke funnet annen dokumentasjon. Det er imidlertid påvist karuss i et annet Løvdalsvatn som ligger ved Risør, og forveksling av lokalitet kan være forklaringen på dette funnet. Informasjon om karuss i Tuftdammen er fra lokalkjente. Grunneier har fisket med ruser i dammen sommer og høst 2019 uten å påvise karuss.

Mort (*Rutilus rutilus*)

Protokollen fungere godt og arten ble detektert med miljø-DNA på alle lokalitetene der vi hadde opplysninger om at arten skulle finnes. Det var hovedsakelig relativt lave nivåer av miljø-DNA i prøvene som ble analysert. Den høyeste konsentrasjonen av miljø-DNA ble målt i prøvene fra Flesjøvannet.

Solabbor (*Lepomis gibbosus*)

Den nydesignede markøren for solabbor har fungert godt og vi har detektert arten i både Molbekktjern og Øvre Bårdsruddam. Konsentrasjonen av miljø-DNA i prøven var sterkest i Øvre Bårdsruddam.

Karpe (*Cyprinus carpio*)

Markøren for karpe har fungert greit, det er klar deteksjon av arten fra Solbergvatn og Ulfsbakktjern, med høye verdier av miljø-DNA detektert i Solbergvatn. Men vi detekterte den ikke i 1. dammen og Tuftdammen, og prøven fra Bakkanetjønn var usikker. Informasjon om tilstedeværelse av karpe i 1. dammen og Bakkanetjønn kommer fra lokalkjente personer, men opplysningene er noen år gamle. Informasjon om karpe i Tuftdammen har også sin opprinnelse fra lokalfolk og det ble funnet en død karpe i dammen våren 2019. Grunneier har fisket med ruser i dammen sommer og høst 2019 uten å påvise karpe. Han har kun fanget suter (som også ble påvist ved miljø-DNA).

Regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*)

Deteksjon av regnbueørret har fungert bra, begge de to lokalitetene som var forventet positive (Kråkstadelva og Høgstlidammen) gir tydelig positivt resultat ved qPCR analyse. Det var knyttet usikkerhet til hvorvidt arten ennå er til stede i Mortensplasztjenn og denne lokaliteten er negativ på analysene. Ifølge lokalfolk var det observert regnbueørret for noen år siden, og den er også nevnt i en NINA-rapport fra 2012 (Kleiven og Hestehagen 2012). Resultatene fra analysene gjennomført i dette prosjektet antyder at bestanden er borte eller liten.

Pukkellaks (*Oncorhynchus gorbuscha*)

Deteksjon av pukkellaks har fungert godt. Samtlige lokaliteter hvor det var forventet å finne pukkellaks (Neiden, Karpelva og Grense Jakobselv, alle i Finnmark) amplifiserte med qPCR og ble registrert som klare positiver.

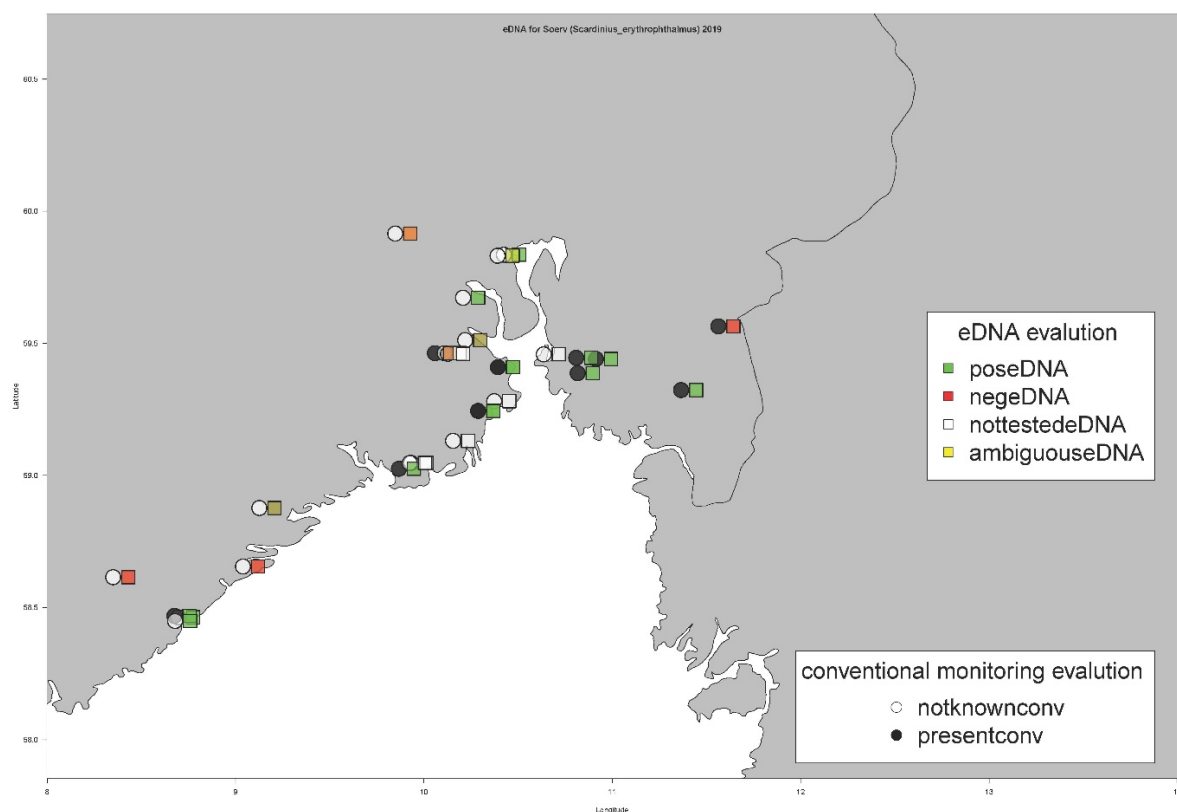
Sørv (*Scardinius erythrophthalmus*)

Den nydesignede markøren for sørv har fungert godt. Alle lokaliteter hvor vi forventet å finne arten har testet positive, med unntak av Rødenessjøen (**Figur 4**). Rødenessjøener en stor innsjø på mer enn 15km². Bestandstettheten av sørv i innsjøen er ikke kjent. I enkelte andre innsjøer registrerte vi meget høye konsentrasjoner av miljø-DNA fra sørv, særlig fra Daletjenn i Aust-Agder, der miljø-DNA prøvene inneholdt nesten like høy DNA-konsentrasjon som den høyeste konsentrasjonen i

standardkurven. Daletjenn har en tett bestand av sørv og det ble observert stimer med sørv under prøvetaking. Det ble også detektert sørv fra Drengsrudbekken, Øvre Bårdsruddam, Høgstlidammen, Mortensplasztjenn, Solbergvatn, Akersvannet, Bergsvannet, Borrevannet, Hallevannet, Sollivannet, Tuftdammen, Bjørnerødvann, Flesjøen, Stomperudtjernet og Vansjø.

Suter (*Tinca tinca*)

Den nydesignede markøren for suter har også fungert godt og gir positivt resultat på de fleste lokalitetene hvor arten skal finnes, med unntak av Sollivannet hvor den ikke kunne detekteres. I tillegg er prøven fra Vansjø usikker. Observasjonene av suter i Sollivatn er usikre og av eldre dato (1990-tallet). Sommeren 2019 ble det prøvofisket ved bruk av ruser og elektrisk fiskeapparat uten at det ble påvist suter. Det ble da kun fanget karuss i vannet, som også ble påvist ved bruk av miljø-DNA. Det kan derfor tyde på at bestanden av suter i innsjøen er liten, eller at den er utdødd. Vansjø er en stor innsjø med mange fiskearter og ulike delbasseng, til dels med liten hydrologisk kontakt. Tettheten av suter i innsjøen er usikker og om den er lav vil dette kunne være med å forklare resultatene.



Figur 4. Utbredelsen av sørv som detektert i dette prosjektet. Grønne firkanter indikerer lokaliteter hvor miljø-DNA-prøven var positiv for sørv, røde firkanter er lokaliteter som var negative for miljø-DNA. Sirkler med hvitt fyll indikerer lokaliteter hvor det ikke er kjent at arten skal befinne seg, mens svare sirkler indikerer kjent bestand av arten

4 Konklusjon

I denne rapporten har vi presentert resultater fra arbeidet med å utvikle og teste ut et system for bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy i overvåkning og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk for forvaltningen. Våre resultater bekrefter viktigheten av miljø-DNA som overvåkningsverktøy og dette kan, med riktig implementering, bli et verdifullt tilskudd til forvaltningens "verktøykasse".

Vi har gjennomgått og forenklet eksisterende prøvetakningsprotokoller og basert på våre funn anbefaler vi enkeltpakkede «Sterivex-filtre» for bruk i miljø-DNA analyser, sammen med PAF-filtreringssystemet. Dette minimerer krysskontamineringsrisikoen ved prøvetaking. Videre har vi forenklet prøvetakingsprosedyren ved å konservere filtrene direkte i ATL-buffer og lagre dem i romtemperatur. Prøver har i løpet av dette prosjektet vært lagret i romtemperatur i opptil åtte uker uten at det ser ut til å ha påvirket kvaliteten på prøven.

Eksisterende qPCR protokoller for gjedde, abbor, ørekyt, karuss, mort, regnbueørret og pukkellaks er validert. Det var lave konsentrasjoner av miljø-DNA i prøvene vi analyserte for gjedde, og i kombinasjon med krysskontamineringsproblemer gjorde dette tolkningen av resultatene for denne arten tvetydig. I videre undersøkelser bør prøvetakingstidspunkt, og også lokasjon i innsjøen, optimaliseres for denne arten. Vi kunne ikke detektere ørekyt i de innsamlede miljø-DNA prøvene, men både markøren og protokollen vi benyttet ser ut til å ha fungert godt, og vi har derfor konkludert med at det er reelle negative prøver. Videre utvikling må optimalisere prøvetakingen for å øke sannsynligheten for å detektere ørekyt. Protokollen for pukkellaks fungerte godt og vi har detektert arten i alle de tre elvene som ble prøvetatt i Finnmark. Det samme gjelder protokollen for mort.

De tre nyutviklede protokollene for sørv, suter og solabor har fungert godt og ga robuste resultater.

Konsentrasjonene av miljø-DNA i prøvene var svært varierende. Dette kan trolig knyttes til de ulike innsjøenes morfologi (størrelse, dyp, bassengform og vannets oppholdstid) og fiskeartenes biologi. Disse forskjellene understreker også viktigheten av å inkludere kunnskap om målartenes biologi og økologi selv om man arbeider med molekylære metoder. Alle protokoller må valideres individuelt. Det som fungerer godt for en art vil ikke nødvendigvis fungere for en annen art.

Å åpne plater med qPCR produkter er ikke tilrådelig. På tross av at alle tiltak for rent arbeid ble implementert opplevde vi krysskontaminering for de to artene der dette ble gjort.

4.1 Viktige hensyn for å unngå krysskontaminering

Krysskontaminering er den tilbakevendende bekymringen ved bruk av miljø-DNA, og det er av høyeste viktighet for at analysene som gjøres skal være relevante. Basert på erfaringer i dette prosjektet kan noen viktige forholdsregler for å unngå krysskontaminering oppsummeres som følger:

Feltarbeid:

- Separate pakkede filtre (for eksempel Sterivex-kolonnefilter) beskytter prøven mot kontaminering.
- PAF filtreringssystem minimerer kontakten mellom prøve og flerbruksutstyr.
- Prøvene skal ikke aldri tas av personer som samtidig håndterer organismer som er målart i prøven.

- Prøvetakere skal alltid bruke engangshansker.
- Prøvetakingen skal utføres med engangsutstyr, eventuelt må alt utstyr som flyttes mellom lokaliteter kleses mellom hver forflytting.
- Prøver skal aldri komme i kontakt med hverandre. Det må som utgangspunkt tas en blank prøve (negativ kontroll) i felt.

Lab-arbeid:

- DNA fra miljø-prøvene bør isoleres på en fysisk adskilt lab fra der hvor qPCR analysene skal kjøres.
- Alle overflater, håndtak, pipetter og gjenbruksplastikk vaskes før og etter bruk med 1 % klorløsning etterfulgt av EtOH.
- Negative kontroller i qPCR oppsettet skal inkluderes. Dette gjøres ved å bruke dH₂O som prøve i enkelte brønner. I denne undersøkelsen har vi hatt ni blanke kontroller:
 - Tre brønner som kontrollerer krysskontaminering av reagenser, disse lastes og forsegles først.
 - Seks brønner midt i plata som lastes og forsegles sist. Disse kontrollerer for krysskontaminering ved lasting av reagenser og prøve.
- Aldri åpne forseglede brønner/rør med qPCR produkter.

Rapportering

- Amplifisering av negative kontroller skal alltid rapporteres og diskuteres.

5 Referanser

- 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.
- Andersen, J.H., E. Kallenbach, J. Thaulow, M. Hesselsøe, D. Bekkevold, B.K. Hansen, L.M.W. Jacobsen, C.A. Olesen, P.R. Møller, and S.W. Knudsen. 2017. "Development of species-specific eDNA-based test systems for monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters." In, 77. Norwegian Institute for Water Research.
- Andersen, JH, Brink, M, Kallenbach, E, Hesselsøe, M, Knudsen, SW, Støttrup, JG, Møller, PR, Eikrem, W, Oug E. 2018. Sampling protocol for monitoring of non-indigenous species in selected Danish harbours. Norsk institutt for vannforskning.
- Andersen, JH, Kallenbach, E, Hesselsøe, M, Knudsen, SW, Møller, PR, Bekkevold, D, Hansen, BK, Thaulow, J. 2016. Steps toward nation-wide monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters under the Marine Strategy Framework Directive. Norsk institutt for vannforskning.
- Andruszkiewicz, E. A., L. M. Sassoubre, and A. B. Boehm. 2017. 'Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight', *Plos One*, 12: e0185043.
- Angles d'Auriac, M. B., D. A. Strand, M. Mjelde, B. O. L. Demars, and J. Thaulow. 2019. 'Detection of an invasive aquatic plant in natural water bodies using environmental DNA', *Plos One*, 14: e0219700.
- Anglès d'Auriac MB, Le Gall L, Peña V, Hall-Spencer JM, Steneck RS, Fredriksen S, et al. Efficient coralline algal psbA mini barcoding and High Resolution Melt (HRM) analysis using a simple custom DNA preparation. *Scientific Reports*. 2019; 9(1):578. doi: 10.1038/s41598-018-36998-6.
- Barnes, M.A., C.R. Turner, C.L. Jerde, M.A. Renshaw, W.L. Chadderton, and D.M. Lodge. 2014. 'Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems', *Environmental Science & Technology*, 48: 1819-27.
- Becker, R.A., Wilks, A.R., 2018. Original S code by Richard A. Becker and Allan R. Wilks. R version by Ray Brownrigg. (2018). mapdata: Extra Map Databases. R package version 2.3.0. <https://CRAN.R-project.org/package=mapdata>
- Berntsen, H.H., Sandlund, O.T., Ugedal, O., Thorstad, E., Fiske, P., Urdal, K., Skaala, Ø., Fjeldheim, P.T., Skoglund, H., Florø-Larsen, B., Muladal, R., and Uglem, I. 2018. 'Pukkellaks i Norge, 2017'. NINA Rapport 1571.
- Carim, K. J., T. M. Wilcox, M. Anderson, D. J. Lawrence, M. K. Young, K. S. McKelvey, and M. K. Schwartz. 2016. 'An environmental DNA marker for detecting nonnative brown trout (*Salmo trutta*)', *Conservation Genetics Resources*, 8: 259-61.
- Clusa, L., L. Miralles, A. Basanta, C. Escot, and E. Garcia-Vazquez. 2017. 'eDNA for detection of five highly invasive molluscs. A case study in urban rivers from the Iberian Peninsula', *Plos One*, 12: e0188126.
- Collins, R. A., O. S. Wangensteen, E. J. O'Gorman, S. Mariani, D. W. Sims, and M. J. Genner. 2018. 'Persistence of environmental DNA in marine systems', *Commun Biol*, 1: 185.
- Deiner, Kristy, Jacqueline Lopez, Steve Bourne, Luke Holman, Mathew Seymour, Erin K. Grey, Anaïs Lacoursière, Yiyuan Li, Mark A. Renshaw, Michael E. Pfrender, Marc Rius, Louis Bernatchez, and David M. Lodge. 2018. 'Optimising the detection of marine taxonomic richness using environmental DNA metabarcoding: the effects of filter material, pore size and extraction method', *Metabarcoding and Metagenomics*, 2.

- Djurhuus, Anni, Jesse Port, Collin J. Closek, Kevan M. Yamahara, Ofelia Romero-Maraccini, Kristine R. Walz, Dawn B. Goldsmith, Reiko Michisaki, Mya Breitbart, Alexandria B. Boehm, and Francisco P. Chavez. 2017. 'Evaluation of Filtration and DNA Extraction Methods for Environmental DNA Biodiversity Assessments across Multiple Trophic Levels', *Frontiers in Marine Science*, 4.
- Fiskekart for Vestfold. 1994. Fylkesmannen i Vestfold, Miljøvernveddelingen.
- Fiskekart for Østfold, 2011. Fylkesmannen i Østfold.
- Foote, A. D., P. F. Thomsen, S. Sveegaard, M. Wahlberg, J. Kielgast, L. A. Kyhn, A. B. Salling, A. Galatius, L. Orlando, and M. T. Gilbert. 2012. 'Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals', *Plos One*, 7: e41781.
- Fossøy, F., J. Thaulow, M. B. Angles d'Auriac, H. Brandsegg, R. Sivertsgård, T.A. Mo, O.T. Sandlund, and T. Hesthagen. 2018. 'Bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy for overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk.' NINA Report 1586.
- Fossøy, Frode, Sondre Dahle, Line Birkeland Eriksen, Merethe Hagen, Sten Karlsson Spets, and Trygve Hesthagen. 2017. 'Bruk av miljø-DNA for overvåking av fremmede fiskearter – utvikling av artsspesifikke markører for gjedde, mort og ørekyt.' NINA Report 1299.
- Freyhof, J., and M. Kottelat. 2007. *Handbook of European freshwater fishes*.
- Furlan, Elise M., and Dianne Gleeson. 2016. 'Environmental DNA detection of redfin perch, *Perca fluviatilis*', *Conservation Genetics Resources*, 8: 115-18.
- Goldberg, Caren S., Katherine M. Strickler, and David S. Pilliod. 2015. 'Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms', *Biological Conservation*, 183: 1-3.
- Harper, Lynsey R, Nathan P Griffiths, Lori Lawson Handley, Carl D Sayer, Daniel S Read, Kirsten J Harper, Rosetta C Blackman, Jianlong Li, and Bernd Hänfling. 2018. 'Development of environmental DNA surveillance for the threatened crucian carp (*Carassius carassius*)', *bioRxiv*.
- Hesthagen, T. and E. Kleiven. 2013. 'Forekomst av reproduserende bestander av bekkerøye (*Salvelinus fontinalis*) i Norge pr. 2013'. NINA Rapport 900.
- Jo, T., H. Murakami, S. Yamamoto, R. Masuda, and T. Minamoto. 2019. 'Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution', *Ecol Evol*, 9: 1135-46.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Meintjes, and A. Drummond. 2012. 'Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data', *Bioinformatics*, 28: 1647-9.
- Kleiven, E. and T. Hesthagen. 2012. 'Fremmede fiskearter i ferskvann i Aust-Agder – Historikk, status og konsekvenser'. - NINA Rapport 665. 115 s. NIVA Rapport 12/001.
- Knudsen, S.W., M. Hesselsøe, P.R. Møller, and J.H. Andersen. 2018. 'Tekniske anvisninger for eDNA-baseret overvåking af ikke-hjemmehørende marine arter.' NIVA report 7203.
- Knudsen, SW, RB Ebert, PB Mortensen, F Kuntze, M Hesselsøe, J Hassingboe, PF Thomsen, EE Sigsgaard, E Egg & PR Møller (2019): Species-specific detection of six commercially important marine fishes in the Baltic Sea using environmental DNA. *J Exp Mar Biol Ecol* 510:31-45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.09.004>
- Lacoursière-Roussel, Anaïs, Guillaume Côté, Véronique Leclerc, Louis Bernatchez, and Marc Cadotte. 2016. 'Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management', *Journal of Applied Ecology*, 53: 1148-57.
- Majaneva, M., O. H. Diserud, S. H. C. Eagle, E. Bostrom, M. Hajibabaei, and T. Ekrem. 2018. 'Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity', *Sci Rep*, 8: 4682.

- Marshall, N. T., and C. A. Stepien. 2019. 'Invasion genetics from eDNA and thousands of larvae: A targeted metabarcoding assay that distinguishes species and population variation of zebra and quagga mussels', *Ecol Evol*, 9: 3515-38.
- Matejusova, I., F. Doig, S. J. Middlemas, S. Mackay, A. Douglas, J. D. Armstrong, C. O. Cunningham, and M. Snow. 2008. 'Using quantitative real-time PCR to detect salmonid prey in scats of grey *Halichoerus grypus* and harbour *Phoca vitulina* seals in Scotland - an experimental and field study', *Journal of Applied Ecology*, 45: 632-40.
- Minamoto, Toshifumi, Kimiko Uchii, Teruhiko Takahara, Takumi Kitayoshi, Satsuki Tsuji, Hiroki Yamanaka, and Hideyuki Doi. 2017. 'Nuclear internal transcribed spacer-1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio*', *Molecular Ecology Resources*, 17: 324-33.
- Neuwirth, E., (2014). RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. R package version 1.1-2. <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>
- Nunes, A.L., Tricarico, E., Panov, V.E. Cardoso, A.C. and Katsanevakis, S. 2015. 'Pathways and gateways of freshwater invasions in Europe'. *Aquatic Invasions* 10, 4: 359–370.
- Piaggio, A. J., R. M. Engeman, M. W. Hopken, J. S. Humphrey, K. L. Keacher, W. E. Bruce, and M. L. Avery. 2014. 'Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA', *Mol Ecol Resour*, 14: 374-80.
- Pilliod, D.S., C.S. Goldberg, R.S. Arkle, and L.P. Waits. 2013. 'Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples', *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70: 1123-30.
- R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Sigsgaard, E.E., I.B. Nielsen, H. Carl, M.A. Krag, S.W. Knudsen, Y. Xing, T.H. Holm-Hansen, P.R. Møller, and P.F. Thomsen. 2017. 'Seawater environmental DNA reflects seasonality of a coastal fish community', *Marine Biology*, 164: 128.
- Spens, Johan, Alice R. Evans, David Halfmaerten, Steen W. Knudsen, Mita E. Sengupta, Sarah S. T. Mak, Eva E. Sigsgaard, Micaela Hellström, and Douglas Yu. 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: 635-45.
- Thomsen, P. F., J. Kielgast, L. L. Iversen, P. R. Moller, M. Rasmussen, and E. Willerslev. 2012. 'Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples', *Plos One*, 7: e41732.
- Turner, Cameron R., Karen L. Uy, and Robert C. Everhart. 2015. 'Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water', *Biological Conservation*, 183: 93-102.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci*. 2005; 360(1462):1847-57. doi: 10.1098/rstb.2005.1716. PubMed PMID: ISI:000232719300005.
- Wickham, H., (2018a). scales: Scale Functions for Visualization. R package version 1.0.0. <https://CRAN.R-project.org/package=scales>
- Wickham, H., Henry, L. (2018b). tidyr: Easily Tidy Data with 'spread()' and 'gather()' Functions. R package version 0.8.1. <https://CRAN.R-project.org/package=tidyr>
- Wilcox, T. M., K. S. McKelvey, M. K. Young, S. F. Jane, W. H. Lowe, A. R. Whiteley, and M. K. Schwartz. 2013. 'Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity', *Plos One*, 8.
- Wilcox, Taylor M., Kellie J. Carim, Kevin S. McKelvey, Michael K. Young, and Michael K. Schwartz. 2015. 'The Dual Challenges of Generality and Specificity When Developing Environmental DNA Markers for Species and Subspecies of *Oncorhynchus*', *Plos One*, 10: e0142008.

Vedlegg

Vedlegg A: Tabell over prøvetakningslokasjoner med koordinater og filtreringsvolum

Vedlegg B: Filtreringsprotokoll

Vedlegg C: Kort resultat fra pilotforsøk angående fiksering av filter

Vedlegg A

Tabell A1. Oversikt over prøvetakningsstasjoner for miljø-DNA prøver. Posisjoner for innsjøer er oppgitt som midt i innsjøen. For elver og bekker, samt Akersvannet og Borrevannet er koordinatene for faktisk prøvetakning oppgitt. Volum angir mengden vann som ble filtrert fra de forskjellige lokasjonene.

Innsjø	Fylke	Kommune	Posisjon		Prøvetatt	Antall prøver	Prøvenr	Volum 1	Volum 2
Drengsrudbekken	Akershus	Asker	59.8308946	10.4308551	31.07.2019	2	31-32	500	500
Kråkstadelva	Akershus	Nedre Eiker	59.6644278	59.6644278	31.07.2019	2	35-36	310	310
Øvre Bårdsruddam	Akershus	Røyken	59.8347595	10.4645427	31.07.2019	2	33-34	1180	260
Daletjenn	Aust-Agder	Arendal	58.4681223	8.7158111	25.07.2019	2	17-18	320	450
Høgstlidammen	Aust-Agder	Gjerstad	58.876536	9.166333	28.07.2019	2	23-24	220	210
Løvdalsvatn	Aust-Agder	Tvedestrand	58.6549028	9.07955	25.07.2019	2	21-22	495	480
Mortensplasztjenn	Aust-Agder	Arendal	58.4487056	8.7191083	25.07.2019	2	19-20	910	420
Solbergvann	Aust-Agder	Arendal	58.4628723	8.7353472	25.07.2019	2	15-16	570	520
Tovdalselva	Aust-Agder	Åmli	58.7087354	8.333459	28.07.2019	2	27-28	500	480
Overnbekken	Buskerud	Modum	59.9150612	9.8877409	31.07.2019	2	29-30	450	500
1. dammen	Vestfold	Tønsberg	59.2812581	10.4129957	02.08.2019	2	50-51	750	720
Akersvannet st 1	Vestfold	Stokke	59.2533244	10.3399281	02.08.2019	2	52-55	500	520
Akersvannet st 2	Vestfold	Stokke	59.2351367	10.3215722	02.08.2019	2	52-55	520	520
Bakkanetjønn	Vestfold	Larvik	59.0470139	9.9647611	04.08.2019	2	58-59	240	250
Bergsvannet	Vestfold	Holmestrand	59.4630775	10.0981677	06.08.2019	2	62-63	350	380
Borrevannet st 1	Vestfold	Horten	59.4176248	10.4375848	23.07.2019	2	10.-13	300	300
Borrevannet st 2	Vestfold	Horten	59.3996283	10.4444032	23.07.2019	2	10.-13	250	300
Bugårdsdammen	Vestfold	Sandefjord	59.130875	10.1943694	04.08.2019	2	60-61	580	505
Hallevannet	Vestfold	Larvik	59.0250528	9.9073051	28.07.2019	2	25-26	670	580
Korsjøen	Vestfold	Holmestrand	59.463185	10.1504077	06.08.2019	2	64-65	820	450
Revovannet	Vestfold	Re (Tønsberg)	59.460525	10.1679833	06.08.2019	2	68-69	360	360
Sollivannet	Vestfold	Holmestrand	59.5116663	10.258841	06.08.2019	2	66-67	170	180
Tuftdammen	Vestfold	Sande	59.6718861	10.2476583	07.08.2019	2	70-71	300	250
Ulfsbakktjern	Vestfold	Larvik	59.0475611	9.9730361	04.08.2019	2	56-57	700	650
Bjørnrødvann	Østfold	Råde	59.4455223	10.8484528	01.08.2019	2	48-49	320	320
Flesjøvannet	Østfold	Våler	59.4409111	10.9530306	01.08.2019	2	44-45	150	150
Molbekktjern	Østfold	Moss	59.458525	10.6761722	31.07.2019	2	37-38	80	80
Rødenessjøen	Østfold	Marker	59.563632	11.6027825	01.08.2019	2	40-41	630	590

NIVA 7435-2019

Stomperudtjernet	Østfold	Rakkestad	59.3232	11.4050806	01.08.2019	2	42-43	120	110
Vansjø	Østfold	Råde	59.3872167	10.8559472	01.08.2019	2	46-47	260	260
Grense Jakobselv	Finmark	Sør-Varanger	69.7243344	30.8884262	15.10.2019	2	76-77	800	1000
Karpelva	Finmark	Sør-Varanger	69.6667157	30.3861317	15.10.2019	2	74-75	1200	200
Neiden	Finmark	Sør-Varanger	69.6983086	29.3988286	15.10.2019	2	72-73	950	850



Filtration Guide Pressure assisted filtration (Kit B)

Reduced version (5/12-2019)

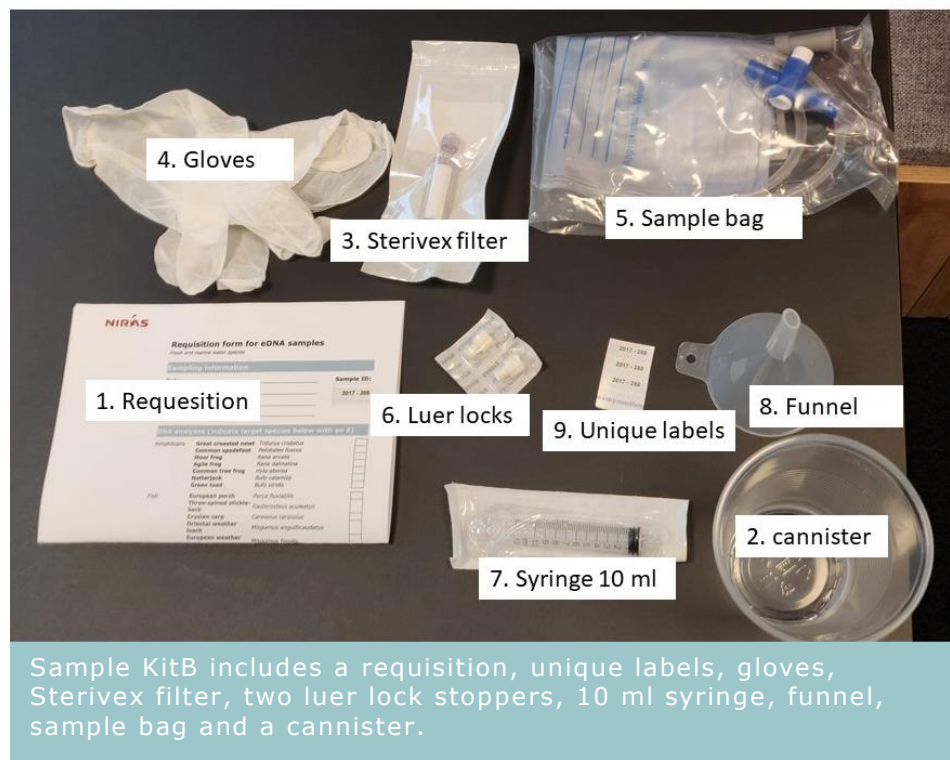
Introduction:

This guide briefly explains filtration of water samples for eDNA analysis using Pressure Assisted Filtration (PAF).

Filtration procedures are explained using Sterivex™ filter units. Same procedure can be applied with any syringe-attached filter units.

Please always consult extended version for all details in the step-by-step guide.

Pressure assisted filtration (Kit B)



Procedure

1 Step 1 - Filling the sample bag:

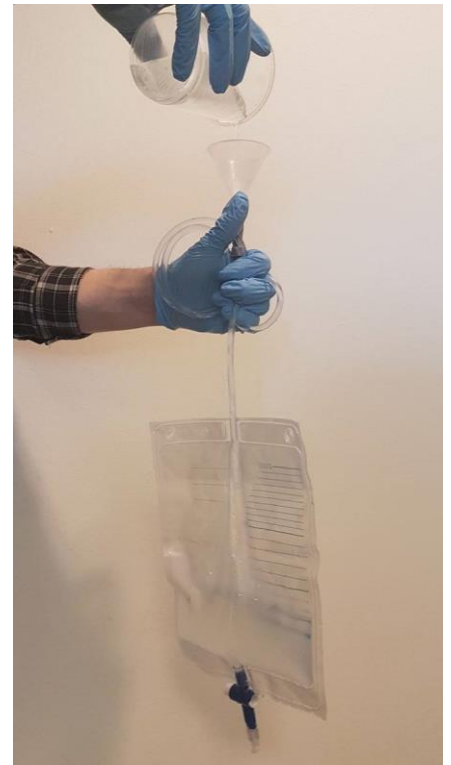
Fill the sample bag with water.

Automatic pumping-equipment for filling the bag are available as add-on (please contact NIRAS for further information).

2 Step 2 - Mounting the filter:

The Sterivex™ filter unit is mounted to the Pressure assisted filtration system (PAF) and thereafter to the bag.

Mount the Sterivex filter between the PAF and the bag. Hold the bottom part of the bag firmly and attach the luer locks by twisting.



Fill the sample bag with sample water through the funnel, using either a 0,5 L disp. Canister or likewise.



The Sterivex filter mounted between the sample bag and the hose from the PAF.

Guide

Pressure assisted filtration GUIDE (Sample Kit B)

- 3 Step 3 - Mounting the bag:**
Mount the bag in the PAF by hanging it on the hooks inside - see picture beneath. Put hose inside the PAF as well.
- 4 Step 4 - Closing the pressure chamber:**
Put the O-ring on the closing mechanism - see step 1. Attach and close the lid to the top of the pressure chamber.



1. Place O-ring



2. Attach the lid



3. Never touch the safety valve!!!

4. Attach lid and tighten the screw.



Guide

Pressure assisted filtration GUIDE (Sample Kit B)

- 5 Step 5 – Connecting the external canister:**
Connect the outlet tube for filtrated water through the lid of external canister.

Outlet tube should be pushed through the canister lid.

- 6 Step 6 - Adding pressure:**
Source of pressure may be a manual pump or portable compressor.

Ad pressurized air through black tire valve and filtration will start. Add pressure to 3 bar (see the manometer). 3 bar is recommended maximum pressure for the applied filters.

When filtration starts wait one minute before adding additional pressure, if needed to keep 3 bar during filtration.

The safety valve will open if more than 3 bars are added. If safety valve opens before 3 bar, adjustment is needed (se maintenance section).

- 7 Step 7 - Filtration:**
Normally filtration will slow down over time – recommended filtration time is maximum 30 minutes.



Connecting of the external canister



Add pressure to start filtration

8 **Step 8 – Releasing air pressure:**

When filtration is finished release the air pressure carefully through the pressure valve. Turn the valve until you can hear a continuous release of air. When all air is emptied you can open the pressure chamber.



9 **Step 9 – Removing water from the filter:**

Remove all water from Sterivex filter with an empty syringe. Fill the syringe with air and connect to the filter. Use the air to press out remaining water in the filter. Repeat until filter is completely empty. Make sure to do this properly to preserve DNA and avoid damage if filter is subjected to freezing subsequently.

10 **Step 10 - preparing the samples:**

Choose either Step 10A or 10B. Note: Samples are sensitive to heat.

- 10A when constant cooling is not possible. (Preservation liquid).
- 10B when constant cooling from sampling to laboratory is possible. (Dry ice)

11 **Step 11 - labeling the samples:**

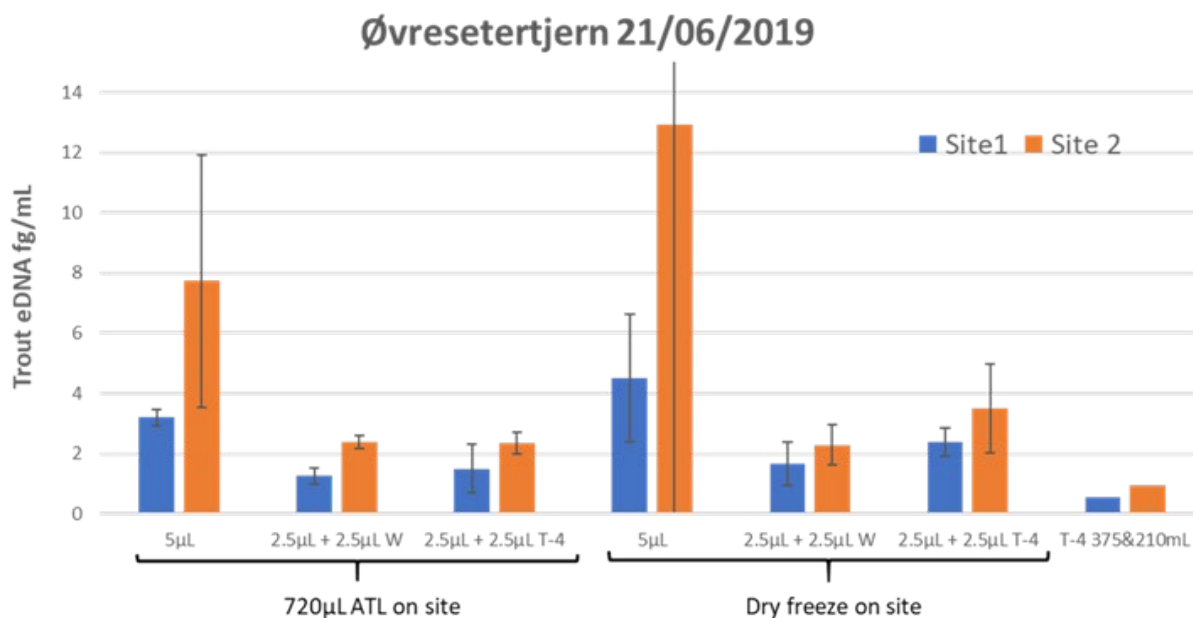
Label the filter clearly. Use identification mark or label on the requisition form.

Fill out the requisition form with information, and ship requisition form and filter unit to us for analysis. Remember to note volume of filtrated water in the external canister after each sampling.



Vedlegg C: Pilotforsøk

Som en del av oppstarten på prosjektet arrangerte NIVA et pilotforsøk 21-22.06.19. I løpet av dette forsøket ble filtreringsoppsettet demonstrert og testet, prøver ble samlet fra Øvresetertjern og analysert for ørret. Resultatene av denne pilotstudien var meget lovende og det ga oss muligheten til å teste hele oppsettet før miljø-prøvene ankom lab'en. Resultatene er i hovedsak ikke inkludert i rapporten, men **Figur V1** viser en sammenligning mellom prøver som ble behandlet forskjellig i felt, enten fiksert i ATL-buffer og oppbevart i romtemperatur eller fryst direkte på tørris. Det ble observert noe tap av DNA-mengden i prøvene som er fiksert med ATL og oppbevart i romtemperatur, men vi mener dette tapet er akseptabelt med tanke på at prøvetaker slipper og ha med tørris i felt. Alle feltprøver i dette prosjektet er derfor fiksert i felt med ATL-buffer og oppbevart i romtemperatur før transport til NIVAs laboratorium, der de ble lagret i kjøleskap frem til DNA ekstraksjon. Dette innebærer at enkelte prøver ble oppbevart i romtemperatur i underkant av 8 uker, før de ble sendt fra prøvetaker til NIVAs laboratorium.



Figur V1. Resultater fra pilotforsøk hvor det ble undersøkt hvilken effekt direkte fiksering av filter i fikseringsbuffer (ATL) og påfølgende oppbevaring i romtemperatur har på DNA konservering (venstre), sammenlignet med filter som ble fryst direkte på tørris og holdt fryst frem til DNA-isolering (høyre).

NIVA: Norges ledende kompetansesenter på vannmiljø

NIVA gir offentlig vannforvaltning, næringsliv og allmennheten grunnlag for god vannforvaltning gjennom oppdragsbasert forsknings-, utrednings- og utviklingsarbeid. NIVA kjennetegnes ved stor faglig bredde og godt kontaktnett til fagmiljøer i inn- og utland. Faglig tyngde, tverrfaglig arbeidsform og en helhetlig tilnæringsmåte er vårt grunnlag for å være en god rådgiver for forvaltning og samfunnsliv.



Norsk institutt for vannforskning

Gaustadalléen 21 • 0349 Oslo
Telefon: 02348 • Faks: 22 18 52 00
www.niva.no • post@niva.no