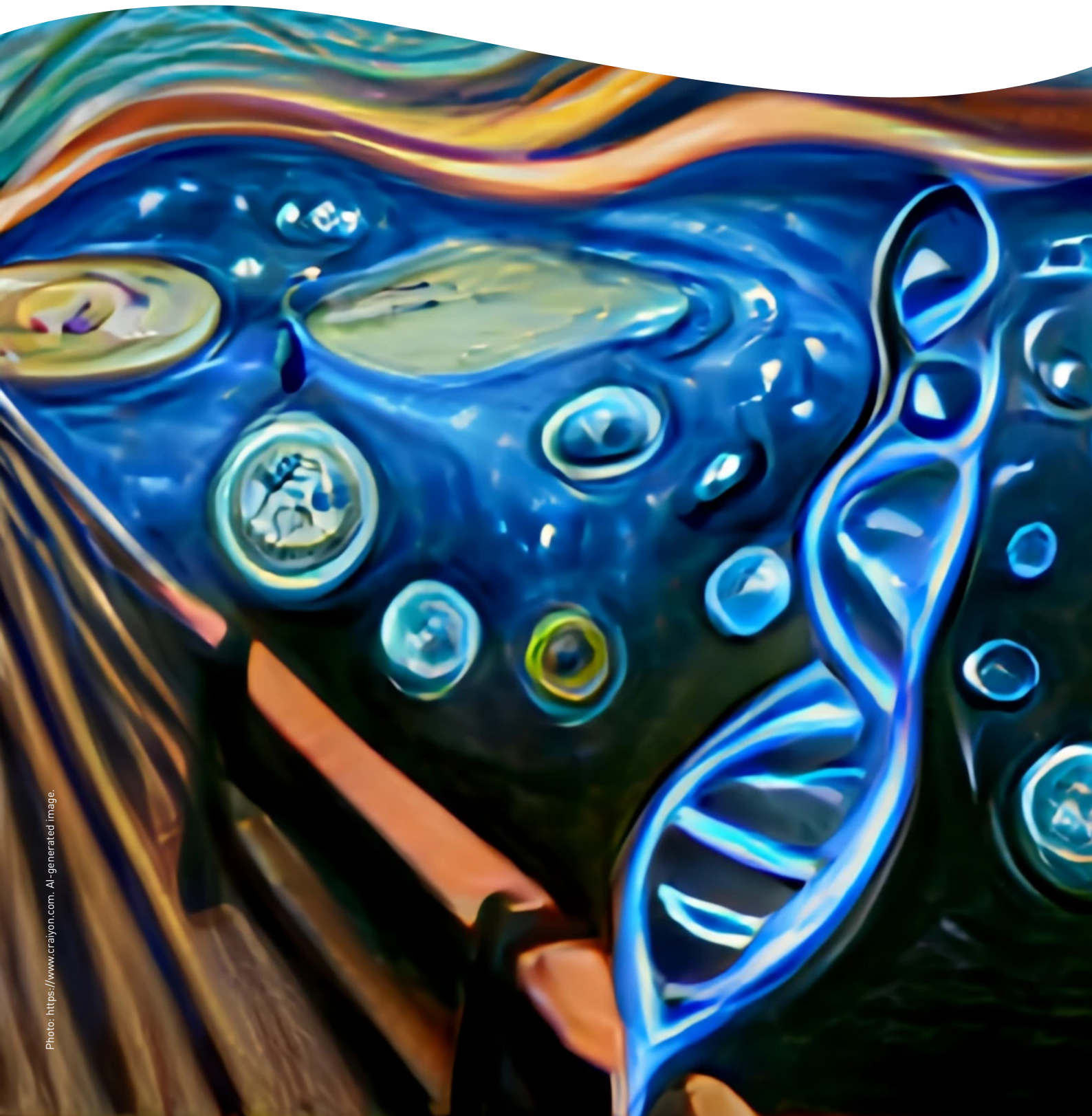


# Detektion af miljø-DNA med 'quantitative Polymerase Chain Reaction' (qPCR) sammenlignet med 'droplet digital Polymerase Chain Reaction' (ddPCR)



**Hovedkontor**

Økernveien 94  
0579 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-danmark.dk](http://www.niva-danmark.dk)

<b>Titel:</b> Detekting af miljø-DNA med 'quantitative Polymerase Chain Reaction' (qPCR) sammenlignet med 'droplet digital Polymerase Chain Reaction' (ddPCR)	<b>Løbenummer</b> 7872-2023	<b>Dato</b> 21.06.2023
<b>Forfattet af:</b> Steen W. Knudsen, NIVA Danmark	<b>Fagområde</b> Miljøteknologi	<b>Distribution</b> Åben
	<b>Geografisk område</b> Danmark, Nordeuropa	<b>Antal sider</b> 47 + bilag A og B

<b>Opdragsgiver(e)</b> Miljøstyrelsen	<b>Kontaktperson hos klient</b> Martin S. Jørgensen
	<b>Udgivet af</b> NIVA Projektnummer 220159

**Sammendrag**

Detekting af miljø-DNA (engelsk: 'environmental DNA', forkortet: 'eDNA') kan gøres med blandt andet qPCR og ddPCR, hvor ddPCR ved detekting af DNA fra virus eller bakterier i human patologiske studier er blevet demonstreret som værende mere præcis i forhold til qPCR-baseret detekting af eDNA. I denne undersøgelse er målet at belyse om en sådan øget præcision også er gældende for detekting af eDNA fra marine ikke-hjemmehørende arter. Her analyseres de samme 48 ekstraktioner af eDNA fra filtervandprøver, indsamlet i 2021, med både qPCR og ddPCR for tilstedeværelsen af 17 forskellige ikke-hjemmehørende marine arter. Det kan konkluderes, at for de sjældne marine NIS-arter er der med ddPCR-plattform en bedre chance for at detektere meget lave niveauer af eDNA. For 17 ud af 19 afprøvede artsspecifikke detektingssystemer på ddPCR-plattform var der lige så præcis detekting af eDNA som på qPCR platform, såfremt der er tilstrækkeligt høje niveauer af eDNA til stede i vandprøven. For lave niveauer af eDNA var ddPCR-plattform bedre til at vurdere usikkerhed i eDNA koncentration end qPCR. Med reduceret arbejdstid for opsætning af ddPCR i forhold til med qPCR anbefales det at bruge ddPCR for fremtidig monitorering af eDNA fra marine invasive arter, for at opnå bedre præcision og reducere arbejdstid.

<b>Emneord</b>	<b>Key words</b>
1. eDNA	1. eDNA
2. Overvågning	2. Monitoring
3. Polymerase Chain Reaction (PCR)	3. Polymerase Chain Reaction (PCR)
4. Digital droplet polymerase Chain Reaction (ddPCR)	4. Digital droplet polymerase Chain Reaction (ddPCR)

Denne rapport er kvalitetssikret iht. NIVAs kvalitetssystem og godkendt af:

*Steen W. Knudsen*  
Projektleder/Hovedforfatter

*Jes J. Rasmussen*  
Kvalitetssikrer

*Jesper Andersen*  
Forskningschef

ISBN 978-82-577-7608-4  
NIVA-rapport ISSN 1894-7948

MONIS 6

**Detektion af miljø-DNA med  
'quantitative Polymerase Chain Reaction' (qPCR)  
sammenlignet med  
'droplet digital Polymerase Chain Reaction' (ddPCR)**

Klient: Miljøstyrelsen

# Forord

For bedre at kunne kortlægge udbredelsen af ikke-hjemmehørende arter i de danske farvande, har Miljøstyrelsen i samarbejde med NIVA Danmark og Statens Naturhistoriske Museum, siden 2017, overvåget DNA-rester fra ikke-hjemmehørende arter i filtrerede vandprøver. Sådanne DNA-rester i vand, der stammer fra organismer i vandet, er også kendt som miljø-DNA, eller 'eDNA' - afledt af det engelske: 'environmental DNA'.

NIVA Danmark har detekteret miljø-DNA fra 25 forskellige ikke-hjemmehørende arter i danske farvande, for bedre at kunne kortlægge disse arters forekomst. Hidtil er disse analyser blevet udført ved brug af 'quantitative Polymerase Chain Reaction' (qPCR), men qPCR-plattformen er begrænset i antallet af tekniske replikater, som kan udføres og dermed også begrænset i følsomhed for lave niveauer af miljø-DNA.

En ny platform for analyse er 'digital droplet Polymerase Chain Reaction' (ddPCR), der er i stand til at lave tusindvis af tekniske replikater i et enkelt reaktionsrør, der hver tilsvare et teknisk replikat i et enkelt reaktionsrør i en qPCR-plattform. De tusindvis af enkelte tekniske replikater, som kan indeholdes i et reaktionsrør for ddPCR, kan potentielt give en mere følsom registrering af miljø-DNA fra ikke-hjemmehørende arter.

I samarbejde med Miljøstyrelsen har NIVA Danmark med den foreliggende rapport sammenlignet analyser med qPCR- og ddPCR-plattformen, specifikt for at afklare om det kan være fordelagtigt at flytte nuværende qPCR-analyser for miljø-DNA over på ddPCR-plattform. Rapportens formål er derfor at klargøre, om der med en ny platform for analyse kan opnås højere præcision og øget følsomhed over for lave niveauer af miljø-DNA i vandprøver, og om det også kan indebære en eventuel besparelse i arbejdstid, da der med ddPCR-plattformen kun skal laves et reaktionsrør per vandprøve, imod de tre reaktionsrør per vandprøve som qPCR kræver.

København, 21. juni 2023

*Steen W. Knudsen*  
projektleder

## Taksigelser

Tak til Peter Rask Møller og Henrik Carl ved Statens Naturhistoriske Museum for hjælp med indhentning af referenceprøver og tak til GLOBE instituttet ved Københavns Universitet for adgang til laboratoriefaciliteter. Også tak til Martin Søndergaard ved Miljøstyrelsen for kommentering af tidligere udgave af denne rapport. Endelig skal der også lyde en tak til Ciaran Murray ved NIVA Danmark for utallige gode råd om analyse af data og om grafisk præsentation af resultater.

## Forsidebillede

Rapportens forside er lavet ved at gøre brug af en hjemmeside (<https://www.crayon.com/>), der ud fra søgeord sammensætter et billede. For denne forside blev følgende søgeord brugt i kombination: "marine DNA molecules inside droplets, ocean, with fish and plankton, invertebrates, invasive, goby, DNA-string, fluorescence, edvard munch oil painting".

# Indholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Indroduktion</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Metodik</b> .....	<b>8</b>
2.1	Test med høj og lav koncentration af primer og probe .....	8
2.2	Test med forskellige volumen af ekstraktion .....	10
2.3	Test af fortyndingsrække .....	10
2.4	Analyse af vandprøver .....	11
2.5	Databehandling .....	13
<b>3</b>	<b>Resultater</b> .....	<b>14</b>
3.1	Koncentration af primer og probe i ddPCR-opsætningen.....	14
3.2	Volumen af ekstraktion fra vandprøve i ddPCR-opsætning.....	14
3.3	Fortyndingsrække i ddPCR-opsætning .....	14
3.4	Analyse af vandprøver i ddPCR-opsætning .....	22
3.4.1	Detektion af eDNA fra rødtotalge - <i>Bonnemasonia hamifera</i> .....	23
3.4.2	Detektion af eDNA fra blå svømmekrabbe - <i>Calinectes sapidus</i> .....	23
3.4.3	Detektion af eDNA fra sølvkarusse – <i>Carassius auratus</i> .....	24
3.4.4	Detektion af eDNA fra stillehavsøsters – <i>Crassostrea gigas</i> .....	25
3.4.5	Detektion af eDNA fra østerstyv – <i>Colpomenia peregrine</i> .....	25
3.4.6	Detektion af eDNA fra Brakvandskølle polyp – <i>Cordylophora caspia</i> .....	26
3.4.7	Detektion af eDNA fra kinesisk uldhåndskrabbe – <i>Eriocheir sinensis</i> .....	27
3.4.8	Detektion af eDNA fra asiatisk klippekrebbe – <i>Hemigrapsus sanguineis</i> .....	27
3.4.9	Detektion af eDNA fra pensel klippekrebbe – <i>Hemigrapsus takanoi</i> .....	28
3.4.10	Detektion af eDNA fra amerikansk hummer – <i>Homarus americanus</i> .....	29
3.4.11	Detektion af eDNA fra dinoflagellat – <i>Karenia mikimotoi</i> .....	29
3.4.12	Detektion af eDNA fra amerikansk ribbegøple - <i>Mnemiopsis leidyi</i> .....	30
3.4.13	Detektion af eDNA fra sandmusling - <i>Mya arenaria</i> .....	31
3.4.14	Detektion af eDNA fra regnbueørred - <i>Oncorhynchus mykiss</i> .....	32
3.4.15	Detektion af eDNA fra dinoflagellat - <i>Prorocentrum minimum</i> .....	33
3.4.16	Detektion af eDNA fra heterokont flagellat - <i>Pseudochattonella farcimen</i> .....	33
3.4.17	Detektion af eDNA fra heterokont flagellat - <i>Pseudochattonella verruculosa</i> .....	34
3.5	Lineære modeller for sammenligning mellem qPCR og ddPCR .....	35
3.6	Kortlægning af sammenligning mellem qPCR og ddPCR.....	39
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>42</b>
4.1	Koncentration af primer og probe og mulighed for optimering i ddPCR-opsætning .....	42
4.2	Volumen af ekstraktion og positive kontroller i ddPCR-opsætning .....	43
4.3	Fortyndingsrække og eDNA-kategorier i ddPCR-opsætning .....	43
4.4	MST-vandprøver i ddPCR og sammenligning med qPCR.....	44
<b>5</b>	<b>Konklusion og anbefalinger</b> .....	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Referencer</b> .....	<b>46</b>

## Sammendrag

Detektion af miljø-DNA (engelsk: 'environmental DNA', forkortet: 'eDNA') kan gøres med blandt andet 'quantitative Polymerase Chain Reaction' (qPCR) og med 'digital droplet Polymerase Chain Reaction' (ddPCR). Ved detektion af DNA fra virus eller bakterier i humanpatologiske studier er ddPCR blevet demonstreret som værende mere præcis i forhold til qPCR-baseret detektion, og som værende i stand til at registrere meget lave niveauer af DNA fra sådanne humanpatogener.

Siden 2017 er marine filtervandsprøver blevet indsamlet to gange årligt, med henblik på overvågning af eDNA fra ikke-hjemmehørende arter (engelsk: 'Non-indigenous Species', forkortet: 'NIS') i danske farvande. Disse filtervandsprøver er hvert år, fra 2017-2021, blevet analyseret med qPCR i MONIS-programmet (Monitoring of Non-indigenous Species). Her i projektet analyseres de samme 48 ekstraktioner af eDNA fra filtervandsprøver, indsamlet i 2021, med både qPCR og ddPCR. De dobbelte analyser blev udført for 19 forskellige marine NIS-arter, med 19 forskellige artsspecifikke detektionssystemer imod eDNA.

Målet er at se hvorledes de to platforme er i stand til at detektere eDNA med de artsspecifikke systemer, og hvilket niveau af præcision de kan detektere eDNA. Hensigten er at belyse om en øget præcision kan opnås med ddPCR i forhold til qPCR for detektion af eDNA fra marine NIS-arter.

Resultatet af de parallelle analyser udført med qPCR og ddPCR viser, at for analyse af den positive kontrol er der en én-til-én lineær sammenhæng i de detekterede eDNA-niveauer. For de filtrerede marine vandprøver er der ligeledes, dog især for filterprøver med høje eDNA-niveauer, en én-til-én sammenhæng mellem niveauerne detekteret på de to platforme. Der er færre detektioner af lave eDNA-niveauer i de filtrerede vandprøver med qPCR-platform, mens der med ddPCR er flere detektioner af lave eDNA-niveauer. De flere detektioner af lave eDNA-niveauer med ddPCR peger på, at ddPCR-platformen er mere sensitiv for at registrere meget lave eDNA-niveauer. Dette betyder samtidigt, at flere indsamlingslokaliteter, der tidligere er blevet kategoriseret som uden eDNA fra en marin NIS, nu i visse tilfælde med ddPCR kan kategoriseres som indikative for meget små bestande eller enkelte individer.

For de sjældne marine NIS-arter er der med ddPCR-platform en bedre chance for at detektere meget lave niveauer af eDNA sammenlignet med qPCR-platform. Dette skyldes, at der med ddPCR reelt udføres mange flere tekniske replikater, end det er muligt at udføre på qPCR, hvilket så bevirker at muligheden for at detektere meget lave niveauer bliver forøget.

På baggrund af resultaterne anbefales det, at fremtidig artsspecifik detektion af eDNA fra marine NIS-arter udføres med ddPCR. Først og fremmest fordi flere tekniske replikater gør det muligt at detektere meget lave niveauer af eDNA, men også fordi opsætning af analyse på ddPCR-platform kræver mindre arbejdstid i laboratoriet. Hvor et tilsvarende præcisionsniveau i eDNA-detektion på qPCR-platform, vil kræve tre eller fire analyser, kan samme præcisionsniveau indhentes med en enkelt analyse på ddPCR-platform. På den måde vil brugen af ddPCR-platform reducere arbejdstiden for analyser i laboratoriet med op imod en tredjedel sammenlignet med qPCR-platform. Der er således mulighed for at sænke analyseprisen i forbindelse med fremtidige udbud af lignende analyseopgaver.

# 1 Introduktion

Siden 2017 er filtervandprøver blevet indsamlet af Miljøstyrelsen (MST) i NOVANA-overvågningen, og efterfølgende blevet analyseret med 'quantitative Polymerase Chain Reaction' (qPCR) for indholdet af miljø-DNA (engelsk: 'environmental DNA', forkortet: 'eDNA') fra marine ikke-hjemmehørende arter (herefter forkortet 'NIS', fra engelsk: 'non-indigenous species') (Andersen et al., 2022; Knudsen et al., 2022).

Med qPCR har det været muligt at analysere op til tre tekniske replikater per NIS per vandprøve (Knudsen et al., 2020a). Opsætning af flere tekniske replikater i laboratoriet nødvendiggør dog, at der skal klargøres flere individuelle plastikrør i qPCR-opsætningen. Ved i stedet at benytte 'digital droplet Polymerase Chain Reaction' (dPCR), er det muligt at danne tusindvis af tekniske replikater i det samme - enkelte - reaktionsrør, i stedet for at have mange individuelle reaktionsrør. Betegnelsen 'digital' skyldes, at enten er replikatet positivt eller også er det negativt, og det kan oversættes til en digital vurdering. De tusindvis af replikater kan indeslutes i dråber i det samme enkelte reaktionsrør, og fordi metoden benytter mange enkelte dråber, betegnes den så som 'digital droplet Polymerase Chain Reaction' (ddPCR) (Hindson et al., 2011). Med ddPCR-teknologi blandes og rystes et enkelt PCR-rør med enzym, buffer, primer, probe og ekstrakt fra en vandprøve, og tilføres derefter en olie, hvorved der dannes en emulsion med mellem 10.000 og 20.000 dråber af en diameter på under 1 nm. Fordi der i PCR-blandingen er tilsat enzym, primer og probe vil de dråber, som indeholder det eftersøgte eDNA kunne afgive fluorescens fra proben, når det eftersøgte DNA-fragment amplificeres.

Med en 'digital droplet reader' kan antallet af positive og negative dråber efterfølgende kvantificeres. De dråber, hvori der er et fluorescens-signal, som følge af en amplifikation af det eftersøgte DNA, vil blive regnet som positive detektioner, mens dråber uden fluorescens vil regnes som negative detektioner.

Det er forventningen, at de tusindvis af replikater, der laves med ddPCR, vil øge præcisionen i målingen af eDNA i forhold til hvad en qPCR med kun tre replikater kan opnå. Endvidere er der med qPCR-plattform og kun tre tekniske replikater stor risiko for, at lave eDNA-niveauer ikke bliver detekteret. Denne potentielt oversete del af lave eDNA-niveauer kan afhjælpes med ddPCR, hvor flere replikater kan sikre, at selv meget lave eDNA-niveauer bliver detekteret. Derudover kan ddPCR potentielt spare arbejdstid, da metoden ikke kræver opsætning af tre gange så mange enkelte plastikrør, som hvis der skulle laves tre replikater med en qPCR-plattform.

Sammenligning af detektion af eDNA med qPCR og ddPCR er tidligere blevet forsøgt af Doi et al. (2015) for et detektionssystem imod karpe *Cyprinus carpio*, hvor konklusionen var, at ddPCR er meget mere præcis end qPCR hvad angår vurdering af koncentration af eDNA og for detektion af lave niveauer af eDNA. Detektion af eDNA er forsøgt for sjældne og truede organismer med qPCR – for eksempel har Sigsgaard et al. (2015) detekteret eDNA fra den sjældne fisk dyndsmerling *Misgurnus fossilis* i Sønderjylland, og der er detekteret eDNA fra ferskvandskrebs i Danmark (Agersnap et al., 2016) og eDNA fra ikke-hjemmehørende arter (Knudsen et al., 2022). Efterhånden er flere studier begyndt at tage detektion af eDNA med ddPCR i brug, og metoden er blevet afprøvet i eftersøgning af ferskvandsinsekter (Mauvisseau et al., 2019), hvaler (Baker et al., 2018), børsteorme (Wood et al., 2019), hundestejler (Capo et al., 2021), sortmundet kutling, knude og skalle (Mauvisseau et al., 2021). Sammenligning af resultater fra ddPCR og qPCR for mange artsspecifikke detektionssystemer på én gang er ikke tidligere udført. Med studiet her gøres forsøget med sammenligning af 17 detektionssystemer for ikke-hjemmehørende arter.

Inden de tidligere benyttede eDNA-detektionssystemer eventuelt kan migreres over på en ddPCR-plattform er det dog nødvendigt først at vurdere, om det med ddPCR er muligt at registrere de samme niveauer af eDNA i positive kontroller, som tidligere har været analyseret med qPCR. Derudover er det nødvendigt at vurdere, om detektion med ddPCR er mere eller mindre sensitiv over for lave volumener af tilsat ekstraheret eDNA ved at undersøge, hvordan detektion af DNA fra en absolut fortyndingsrække ser ud analyseret på ddPCR sammenlignet med qPCR. For at undersøge disse forhold for tidligere udviklede og publicerede eDNA-detektionssystemer (Andersen et al., 2022; Knudsen et al., 2020b; 2022) er formålet med dette studie på ddPCR at:

1. Udføre test af høje og lave koncentrationer af tilsat primer og probe, for at vurdere om det har indflydelse på chancen for at detektere DNA i ddPCR. Denne del udføres kun for fire assays ('Promin', 'Myaare', 'Bonham' og 'Oncgor'), der tidligere har vist sig at virke godt på qPCR-plattform. Fordi budgettet i dette projekt ikke gjorde det muligt at udføre så mange detaljerede forsøg for at efterprøve optimale slutkoncentrationer for alle assays.
2. Teste om det tilsatte volumen af eDNA ekstraheret fra filterprøven har en indflydelse på chancen for at detektere eDNA med ddPCR. Denne del udføres kun for fire assays ('Promin', 'Myaare', 'Bonham' og 'Oncgor'), der tidligere har vist sig at virke godt med qPCR. Kun fire detektionssystemer efterprøves her, da detaljerede forsøg med optimale volumener af tilsat ekstraktion for alle detektionssystemer vil kræve tre til fire gange så mange opsætninger af forsøg.
3. Teste absolutte fortyndingsrækker i ddPCR som tidligere er udført i qPCR for at kunne sammenholde hvorledes DNA-niveauerne i samme fortyndingsrække tidligere udført på qPCR bliver målt på ddPCR. Samme fortyndingsrække udført på begge platforme, vil gøre det muligt at finde en omregningsfaktor for hvert assay for eDNA-niveauerne målt på de to platforme.
4. Måle niveauet af eDNA i alle vandprøver fra 2021 med ddPCR for 17 NIS-arter og sammenligne med tidligere niveauer af eDNA målt per qPCR.

Det overordnede mål med nærværende projekt er således at vurdere detektionssystemer benyttet imod marine NIS-arter på qPCR kan migreres over til ddPCR-plattform, og om tidligere detektioner af eDNA fra marine NIS, i filtrerede vandprøver, udført med qPCR, kan sammenholdes med tilsvarende målinger udført med ddPCR, og at se hvor stor forskel der er i mellem disse to tilgange til at detektere eDNA i vandprøver.



## 2 Metodik

Alle reaktioner for ddPCR blev gjort klar i et totalt reaktionsvolumen på 25  $\mu\text{L}$ , som bestod af 6  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O; 0,8  $\mu\text{L}$  probe; 1,6  $\mu\text{L}$  F-primer; 1,6  $\mu\text{L}$  R-primer; 10  $\mu\text{L}$  BioRad supermix (uden dUTP for prober) og 5  $\mu\text{L}$  af det syntetiserede DNA fra fortyndingsrækken. De NIS-arter der skulle detekteres, blev udvalgt fra listen er tidligere afprøvede eDNA-detektionssystemer (Tabel 1).

Primer og probe blev tilsat i koncentrationer, der i tidligere studier (Andersen et al. 2022; Knudsen et al. 2020b; 2022) (Tabel 2) er fundet frem til at være optimale slutkoncentrationer på qPCR-plattform. De blandede reaktioner blev overført til BioRad 'droplet generator cartridges' for at lave dråber i en 'droplet generator', ved at følge BioRad-protokollen (QX200 Droplet Reader Instruction Manual, Item #10031906) for QX200 'droplet generator' og for QX200 'Droplet Reader', der følger med de to maskiner.

De resulterende 40  $\mu\text{L}$  dråber blev derefter overført til en PCR-plade med 96 brønde og anbragt i en 'thermocycler' med følgende temperaturindstillinger: Enzym aktivering ved 95 °C i 10 minutter, efterfulgt af 50 omgange med denaturering ved 95 °C i 30 sekunder og annealing og forlængelse ved 60 °C i 1 minut, efterfulgt af en omgang med enzym deaktivering ved 98 °C i 10 minutter, derpå et trin med 4 °C i 10 minutter, og et trin med 10 °C indtil prøverne blev fjernet fra maskinen.

Pladen med reaktioner blev sat i køleskab ved 4 °C, indtil den kunne analyseres den efterfølgende dag med BioRad QX200 ddPCR 'droplet reader'.

Positive og negative dråber blev kvantificeret med BioRad QX200 ddPCR 'droplet reader' med 'direct quantification' og detektion af FAM-fluorescens fra proben.

Data fra ddPCR-maskinen blev eksporteret som .csv-filer ('comma separated value') og læst ind i R v4.2.2 (R Core Team, 2022) sammen med data indhentet fra tidligere qPCR-analyser, og derefter analyseret for at lave tabeller og grafiske fortolkninger af resultaterne.

### 2.1 Test med høj og lav koncentration af primer og probe

Høj og lav koncentration af primer blev afprøvet for kun fire detektionsassay (Promin, Myaare, Bonham og Oncgor). For disse fire detektionsassays var en lav koncentration lig med slutkoncentrationer for primerne på 900 nM og 250 nM for proben (som anbefalet i protokollen af producenten af BioRad QX200 ddPCR), og høje koncentrationer var lig med de optimale slutkoncentrationer afledt i tidligere MONIS-projekter (Tabel 1) (Knudsen et al., 2020b; 2022). Dette giver kun en test af yderpunkterne for fire detektionsassay, og fordi ikke alle detektionsassays blev afprøvet for optimale slutkoncentrationer, kan der forventes at være detektionsassays, der ikke kan migreres over på dPCR-plattform uden justering af optimale koncentrationer.

**Tabel 1.** Liste over forkortelser for artsspecifikke detektionssystemer. Alle systemer er adopteret fra Andersen et al. (2022) og Knudsen et al. (2020b og 2022). 'Org GT' er organisme gruppe type. 'Fork navn' er det forkortede navn på det artsspecifikke detektionssystem. Primer og probe navne fremgår af Tabel 2. Nukleotid sekvenser på primer og probe kan findes i tidligere publikationer (Andersen et al., 2022; Knudsen et al., 2020b; 2022). (a) Efter MONIS2-6 projektet blev indledt har taxonomisk revision ført til at stillehavsøsters er flyttet fra slægten *Crassostrea* til *Magallana*, her i denne rapport bruges kun artsnavnet *Crassostrea gigas* for at kunne sammenholde resultater og analyser med tidligere MONIS-rapporter.

Række	Klasse	Latinsk navn	Org GT	Dansk navn	Fork navn
Arthropoda	Malacostraca	<i>Homarus americanus</i>	Krebsdyr	Amerikansk hummer	Homame
Arthropoda	Malacostraca	<i>Paralithodes camschaticus</i>	Krebsdyr	Kamchatka krabbe	Parcam
Arthropoda	Malacostraca	<i>Rhithropanopeus harrisi</i>	Krebsdyr	Østamerikansk brakvandskrabbe	Rhihar
Arthropoda	Malacostraca	<i>Hemigrapsus sanguineus</i>	Krebsdyr	Stribet klippekrabbe	Hemsan
Arthropoda	Malacostraca	<i>Callinectes sapidus</i>	Krebsdyr	Blå svømmekrabbe	Calsap
Arthropoda	Malacostraca	<i>Eriocheir sinensis</i>	Krebsdyr	Kinesisk uldhåndskrabbe	Erisin
Arthropoda	Malacostraca	<i>Hemigrapsus takanoi</i>	Krebsdyr	Pensel klippekrabbe	Hemtak
Chordata	Actinopterygii	<i>Carassius auratus</i>	Fisk	Sølvkarusse	Caraur
Chordata	Actinopterygii	<i>Acipenser baerii</i>	Fisk	Sibirsk stør	Acibae
Chordata	Actinopterygii	<i>Cyprinus carpio</i>	Fisk	Karpe	Cypcar
Chordata	Actinopterygii	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	Fisk	Pukkellaks	Oncgor
Chordata	Actinopterygii	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	Fisk	Diamant stør	Acigue
Chordata	Actinopterygii	<i>Neogobius melanostomus</i>	Fisk	Sortmundet kutling	Neomel
Chordata	Actinopterygii	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fisk	Regnbueørred	Oncmyk
Cnidaria	Hydrozoa	<i>Cordylophora caspia</i>	Polyp	Brakvandskølle polyp	Corcas
Ctenophora	Tentaculata	<i>Mnemiopsis leidyi</i>	Gople	Amerikansk ribbegople	Mnelei
Mollusca	Bivalvia	<i>Mya arenaria</i>	Skaldyr	Sandmusling	Myaare
Mollusca	Bivalvia	<i>Crassostrea gigas</i> (a)	Skaldyr	Stillehavsøsters	Cragig
Myzozoa	Dinophyceae	<i>Karenia mikimotoi</i>	Planktonisk organisme	Dinoflagellat	Karmik
Myzozoa	Dinophyceae	<i>Prorocentrum minimum</i>	Planktonisk organisme	Dinoflagellat	Promin
Ochrophyta	Dictyochophyceae	<i>Pseudochattonella farcimen</i>	Planktonisk organisme	Heterokont flagellat	Psefar
Ochrophyta	Dictyochophyceae	<i>Pseudochattonella verruculosa</i>	Planktonisk organisme	Heterokont flagellat	Psever
Ochrophyta	Phaeophyceae	<i>Colpomenia peregrine</i>	Makroalge	Østerstyv	Colper
Rhodophyta	Florideophyceae	<i>Bonnemaisonia hamifera</i>	Makroalge	Rødtot alge	Bonham

**Table 2.** Artsspecifikke detektionssystemer imod eDNA fra marine NIS. Primer- og probe-navngivning følger tidligere publicerede artssystemer (Andersen et al., 2022; Knudsen et al., 2020b; 2022). 'F primer', 'R primer' og 'Probe', angiver navnet på de primere og prober, der er benyttet. Proberne er modificeret med FAM-fluorescens i 5'-enden og med 'Black Hole Quencher' i 3'-enden. Alle nukleotid sekvenser på primere og probe kan findes i tidligere publikationer (Knudsen et al., 2020b; 2022). 'FK', 'RK' og 'PK' er optimal slutkoncentration i qPCR-reaktionen for hhv. F-primer, R-primer og proben. (a) er et ekstra detektionssystem imod sortmundet kutling.

Fork Navn	F primer navn	R primer navn	Probe navn	FK (nM)	RK (nM)	PK (nM)
Acibae	Acibae_CR_F02	Acibae_CR_R03	Acibae_CR_P01	800	1200	250
Acigue	Acigue_CR_F03	Acigue_CR_R03	Acigue_CR_P03			
Bonham	Bonham_rbcL_F02	Bonham_rbcL_R02	Bonham_rbcL_P01	1200	200	300
Calsap	Calsap_co1_F01	Calsap_co1_R01	Calsap_co1_P01	1200	1000	100
Caraur	Caraur_COI_F01	Caraur_COI_R01	Caraur_COI_P02	200	600	100
Colper	Colper_COX_3_F01	Colper_COX_3_R01	Colper_COX_3_P01	400	600	100
Corcas	Corcas_COI_F01	Corcas_COI_R01	Corcas_COI_P01	200	200	100
Cypcar	CpCyB_496_F	CpCyB_573_R	CpCyB_550_P	200	400	200
Cypcar	CCcytbF	CCcytbR	CCcytbP			
Erisin	Erisin_cytb_F02	Erisin_cytb_R02	Erisin_cytb_P02	200	1200	200
Hemsan	Hemsan_COI_F01	Hemsan_COI_R01	Hemsan_COI_P01	200	1000	200
Hemtak	Hemtak_COI_F05	Hemtak_COI_R05	Hemtak_COI_P05	200	1200	100
Homame	Homame_cytb_F02	Homame_cytb_R14	Homame_cytb_P12	500	3000	400
Karmik	KarmikF3	KarmikR3	KarmikP3	200	200	300
Cragig	Cragig_CO1_F07	Cragig_CO1_R09	Cragig_CO1_P06	200	1200	200
Mnelei	Mnelei_its2_F04	Mnelei_its2_R06	Mnelei_its2_P06	400	1000	300
Myaare	Mya_are_CO1_F01	Mya_are_CO1_R02	Mya_are_CO1_P06	200	1200	200
Neomel-co1	Neomel_co1_F03	Neomel_co1_R03	Neomel_co1_P03	200	1000	500
Neomel-cytb (a)	Neomel_cytb_F03	Neomel_cytb_R03	Neomel_cytb_P03			
Oncgor	Oncgor_CO1_F09	Oncgor_CO1_R06	Oncgor_CO1_P06	400	1000	300
Oncmyk	Oncmyk_Co1_F01	Oncmyk_Co1_R01	Oncmyk_Co1_P01	400	600	100
Parcam	Parcam_co1_F12	Parcam_co1_R12	Parcam_co1_P12	500	3000	300
Promin	Promin_28S_F03	Promin_28S_R03	Promin_28S_P03	1200	1200	300
Psefar	PsFa28SF	PsFa28SR	PsVeFa28SP1	200	800	300
Psever	PsVe28SF	PsVe28SR	PsVeFa28SP1	200	600	300
Rhihar	Rhihar_co1_F03	Rhihar_co1_R03	Rhihar_co1_P03	200	1200	150

## 2.2 Test med forskellige volumen af ekstraktion

For fire assays ('Promin', 'Myaare', 'Bonham' og 'Oncgor') blev fortyndingsserien af den positive kontrol tilsat i tre forskellige volumener (2 µL, 5 µL og 10 µL) til ddPCR-opsætningen for at se om chancen for detektion af lave niveauer af DNA-molekyler influeres af det volumen, der benyttes i reaktionen. Alle reagenser for ddPCR benyttes som beskrevet ovenfor med tilsættelse af 2 µL, 5 µL eller 10 µL volumen positiv kontrol, og med henholdsvis 14 µL, 11 µL og 6 µL ddH<sub>2</sub>O, således at total volumen per ddPCR-brønd bibeholdes som 25 µL.

## 2.3 Test af fortyndingsrække

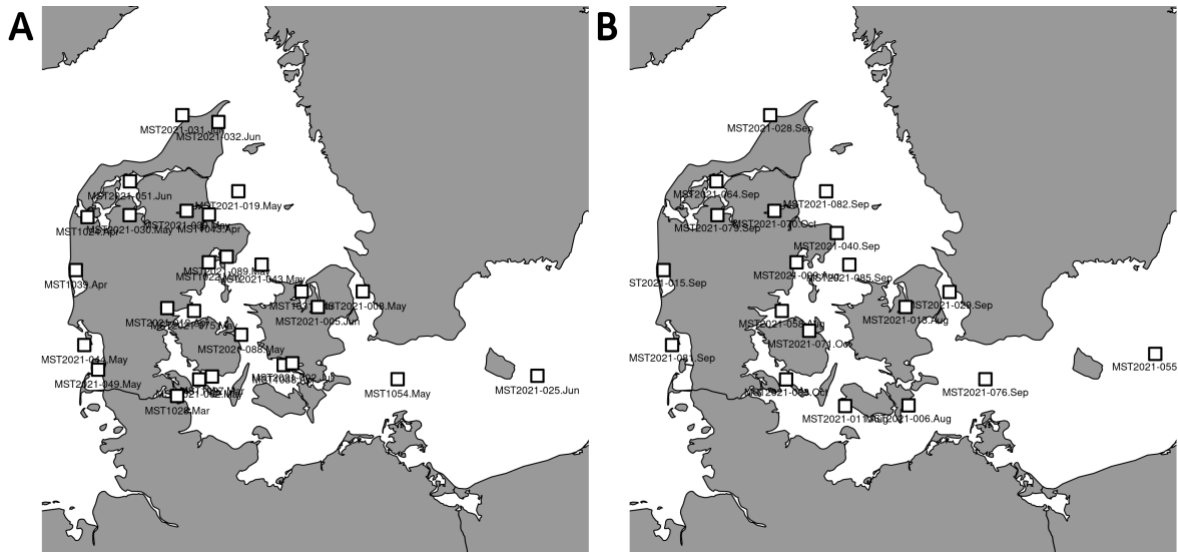
For at vurdere om de enkelte artsspecifikke detektionssystemer kan flyttes fra qPCR-plattform direkte over til ddPCR-plattform, blev et indledende forsøg sat op med syntetiserede DNA-fragmenter i en

fortyndingsrække for hvert detektionssystem. Disse syntetiserede fragmenter tjener så som positiv kontrol. Dette er præcis den samme fremgangsmåde, som der benyttes for qPCR. Måling af antallet af syntetiserede DNA-molekyler, der forinden var brugt for qPCR-opsætningen, blev så brugt igen i ddPCR. Fortyndingsserien er frembragt ved forinden at oprense et syntetiseret fragment. Ved at inkludere den samme fortyndingsserie på begge platforme, er det muligt at sammenholde hvordan ddPCR-platformen tæller antallet af molekyler i både fortyndingsserierne og i vandprøverne. På qPCR-platformen kan antallet af DNA-molekyler i vandprøverne kun vurderes ud fra den reference man, som bruger af computerprogrammet for qPCR-maskinen, har indtastet for fortyndingsserien. Disse referenceværdier indtastes hver gang qPCR-maskinen sættes op til analyse. Dette er modsat i ddPCR-opsætningen hvor ddPCR-maskinen tæller antallet af DNA-molekyler i fortyndingsserien. I det indledende forsøg på ddPCR-platform med syntetiserede fragmenter, blev reaktionerne udført med en fortyndingsrække i niveauer på seks dekader (dsv. 1E5, 1E4, 1E3, 1E2, 1E1, 1E0 og 1E-1 kopier per  $\mu\text{L}$ ).

## 2.4 Analyse af vandprøver

De 28 plus 19 vandprøver fra hhv. forår (januar-juli) og efterår (august-november) 2021, er indsamlet fra relativt kystnære lokaliteter rundt langs den danske kyst (Figur 1). Filtrede vandprøver indsamlet af Miljøstyrelsen i 2021 var forinden blevet ekstraheret for eDNA ved at følge ekstraktionsprotokoller af Agersnap et al. (2017; 2022), Knudsen et al. (2019; 2020a) og Spens et al. (2017). Vandprøverne fra 2021 omfattede 28 filterprøver indsamlet i foråret 2021 og 19 filterprøver fra efteråret 2021 (bilag A), altså i alt 47 vandprøver.

De 47 vandprøver blev analyseret individuelt i qPCR-opsætning for at detektere eDNA fra de 17 marine NIS. Denne detektion blev udført med detektionssystemer udviklet igennem tidligere MONIS-projekter (Andersen et al., 2018; 2022; Knudsen et al., 2020b), altså de samme detektionssystemer som er valideret og benyttet til overvågning af eDNA fra marine NIS-arter siden 2017 (Knudsen et al., 2022). Antallet af eDNA-molekyler fra 17 udvalgte NIS (Tabel 1) var forinden vurderet med qPCR, i enkeltvise analyser per art, med tre replikater per vandprøve. Hensigten er derpå at benytte de samme 17 detektionssystemer igen på de samme 47 vandprøver, men på en ddPCR-platform, for at kunne sammenholde de niveauer af eDNA, der blev fundet i de enkelte vandprøver for de forskellige NIS. For analyse af vandprøverne på qPCR blev en MX-Pro3006 qPCR-maskine (Agilent Technologies) benyttet, og for analyse på ddPCR-platform blev en QX200 'droplet generator' (BioRad) og en QX200 ddPCR 'droplet reader' (BioRad) benyttet.



**Figur 1.** Prøverne indsamlet for forår (A) (januar-juli) og efterår (B) (august-november) i 2021. Et unikt prøvenummer under hver indsamlingslokalitet refererer til en unik filtervandprøve. Tilsvarende kort er i bilag B. Det er de samme vandprøver, der optræder igennem alle analyser med både qPCR og ddPCR.

Forsøgsopsætningen for qPCR fulgte metoden, der er beskrevet af Andersen et al. (2022) og af Knudsen et al. (2022). I opsætningen af qPCR benyttedes en absolut kvantificering med en standard fortyndingsrække, hvor fragmentets længde og nukleotidsammensætning forinden er omregnet ved først at finde fragmentets molekylvægt ved at benytte 'OligoCalc' (Kibbe, 2007). Beregningen fulgte tidligere beskrivelser af Agersnap et al. (2017) og Knudsen et al. (2019; 2022). Antallet af DNA-molekyler i den tilsatte fortyndingsserie i qPCR er beregnet ud fra en koncentrationsmåling (Qubit HS Assay, Thermofisher Scientific, Invitrogen, Catalog number: Q32851) og en molekylvægt på det genetiske fragment. En koncentrationsmåling med Qubit HS Assay måler alt DNA indeholdt i en opløsning, hvorfor denne målemetode kun kan bruges på det oprensede og syntetiserede DNA-fragment, der skal tjene som positiv kontrol i både qPCR og ddPCR. Qubit HS Assay kan ikke benyttes direkte på en ekstraheret vandprøve, da det vil give et mål for alt DNA i prøven. Med en molekylvægt og en koncentrationsmåling kan antallet af DNA-molekyler per volumen beregnes ved hjælp af Avogadros konstant. Denne beregning kan udføres på det syntetiserede og oprensede fragment, for hvert enkelt detektionssystem. Svarende til hvad der er gjort i studierne af Agersnap et al. (2017) og Knudsen et al., (2019, 2022). Det er også den samme metode, der er benyttet for alle tidligere MONIS-projekter med qPCR detektion af eDNA. Med en sådan beregning på et syntetiseret fragment, kan en fortyndingsserie, der kun består af den positive kontrol udfærdiges. Det vurderede antal af DNA-molekyler i den tilsatte fortyndingsserie på qPCR, der tjener som positiv kontrol, er altså kun så korrekt som den indledende koncentrationsmåling med Qubit HS Assay er. I modsætning til qPCR er antallet af DNA-molekyler per reaktion på en ddPCR-plattform vurderet ud fra antallet af positive dråber. Ud fra antallet af DNA-molekyler baseret på den fluorescensbaserede koncentrationsmåling, kan det oprensede fragment så fortyndes en koncentration på  $1E6$  DNA-molekyler per  $\mu L$  - altså 1 million DNA-molekyler per  $\mu L$ . Når denne reference fortyndes i dekader (dvs. med en faktor 1:10 for hvert fortyndingstrin) og benyttes i qPCR som reference, indtastes koncentrationsniveauet som et antal af DNA-molekyler, og qPCR-maskinen benytter disse indtastede værdier som reference for at vurdere antallet af DNA-molekyler i vandprøverne. På en ddPCR-plattform er dette anderledes, da en ddPCR-maskine med antallet af positive og negative dråber istedet samtidigt vurderer antallet af DNA-molekyler for både vandprøver og for fortyndingsserien.

Efter det indledende forsøg på kun syntetiserede fragmenter, som positive kontroller, blev samme forsøgsopsætning gentaget for igen at lave analyse i BioRad QX200 ddPCR 'droplet reader', men denne gang med inklusion af 5 µL eDNA ekstraheret fra filtervandsprøverne og med 11 µL ddH<sub>2</sub>O per ddPCR-brønd, således at total volumen i alle reaktioner er 25 µL per brønd, og med alle andre reagenser som specificeret for ddPCR-opsætning i ovenstående.

I tilfælde af at de operationelle artsspecifikke detektionssystemer ikke gav resultat på ddPCR-plattformen, blev tidligere *in silico* designede artsspecifikke detektionssystemer (Andersen et al., 2018) afprøvet på ddPCR-plattformen, for at se om de kunne erstatte de artsspecifikke detektionssystemer, der umiddelbart ikke kunne flyttes direkte over på ddPCR. For sortmundet kutling blev det ekstra artsspecifikke system (Neomel-cytb: Neomel\_cytb\_R03, 5'-ATTGTGAGAGTGGGCGGAAG-3'; Neomel\_cytb\_F03: 5'-CCAAACTTCCTCGGAGACCC-3'; Neomel\_cytb\_P03, FAM-5'-TACGCCATCCTCCGCTCTATCCCTAAC-3'-BHQ1) afprøvet. Dette detektionssystem er ikke tidligere præsenteret, men er også artsspecifikt, ligesom det førhen benyttede artsspecifikke system (Neomel-co1). Begge detektionssystemer imod sortmundet kutling er artsspecifikke, fordi de ikke reagerer på DNA fra andre arter af kutlinger. Dog kræver begge disse detektionssystemer relativt høje niveauer af eDNA fra sortmundet kutling, før de kan detektere eDNA. Begge detektionssystemer har, under udarbejdelse af tidligere MONIS-rapporter, vist sig at have vanskeligheder ved at detektere meget lave niveauer af eDNA. Her i denne rapport afprøves kun 'Neomel\_cytb' systemet, da et indledende forsøg med 'Neomel-co1' på ddPCR ikke lykkedes at skelne probens fluorescensniveau fra 'baggrunds'-fluorescensen i reaktionen.

## 2.5 Databehandling

For at kunne sammenholde ddPCR- og qPCR-resultaterne blev resultaterne fra qPCR-opsætningen efterjusteret med en faktor, der beskriver forholdet mellem fortyndingsrækken i ddPCR og i qPCR. Denne omregningsfaktor blev beregnet individuelt for hvert enkelt detektionssystem. Omregningsfaktoren gør det muligt at tage højde for, at antallet af DNA-molekyler i fortyndingsrækken i qPCR opsætningen er forventet ud fra en beregning. Antallet af DNA-molekyler er med ddPCR afledt fra en normalfordelt mængde af positive reaktioner. Dette betyder, at når man sætter en fortyndingsserie op for qPCR, så defineres fortyndingsniveauerne godt nok som 1E-1, 1E0, 1E2, 1E3, 1E4 og 1E5 DNA-molekyler per µL, men det er kun baseret på den indledende koncentrationsmåling gjort med Qubit HS assay. Antallet af DNA-molekyler kan forventes at være en anelse lavere, da en sådan indledende koncentrationsmåling med Qubit HS assay er behæftet med en del variation i målingen. Derfor kan niveauerne af eDNA, der er detekteret i vandprøvefiltraterne, omregnes ved først at sammenholde fortyndingsserien udført på qPCR med fortyndingsserien udført på ddPCR. Omregningsfaktoren for hvert enkelt detektionssystem, der beskriver forholdet mellem de to fortyndingsserier, kan så bruges til at omregne eDNA-niveauerne detekteret i ekstraktionerne fra filtervandprøverne. En sådan omregningsfaktor beregnes ved at bestemme en lineær model for det logaritmetransformerede antal af DNA-molekyler målt med ddPCR, og for en lineær model for de logaritmetransformerede forventede antal DNA-molekyler i qPCR. Fra denne lineære model kan skæringen så benyttes til at beregne en omregningsfaktor. Alle målinger fra qPCR blev derfor, for sammenlignelighedens skyld, efterjusteret med en faktor afledt af den inverse funktion af 10 opløftet i skæringspunktet for den lineære model.

Lineære modeller blev afprøvet for log<sub>10</sub> transformerede koncentrationer målt med qPCR og ddPCR. De lineære modeller blev frembragt ved at ekskludere niveauer over ( $2 \times 10^5$  DNA molekyler/µL) og under (0,2 DNA molekyler/µL) rammerne for hvor BioRad QX200 ddPCR 'droplet reader' er præcis i kvantificering. Niveauer og kategorier af eDNA blev til sidst kortlagt i forhold til indsamlingslokaliteterne, så sammenligningen også kan gøres geografisk. Alle diagrammer blev lavet

med 'R' v4.2 (R Core Team, 2022), 'QX200 reader' (BioRad) og 'Inkscape' v1.2 (Inkscape Project, 2020).

## 3 Resultater

Af de 19 detektionssystemer der blev afprøvet her på ddPCR-platform, var det umiddelbart muligt at få 17 systemer til at fungere direkte på ddPCR-platform. Det omfatter de 17 detektionssystemer: 'Bonham', 'Caraur', 'Calsap', 'Corcas', 'Cragig', 'Cypcar', 'Erisin', 'Karmik', 'Hemsan', 'Hemtak', 'Homame', 'Mnelei', 'Myaare', 'Oncgor', 'Promin', 'Psefar', og 'Psever' (se Tabel 1 for forkortelser). De to detektionssystemer, der blev afprøvet på ddPCR platform uden held omfatter 'Rhihar' og 'Neomel-co1'. Fordi det ikke lykkedes at få disse to detektionssystemer til at virke på ddPCR platform udgår de af resultatafsnittets enkeltvise gennemgang med sammenligning af ddPCR med qPCR. Dog indgår disse to detektionssystemer i diskussionsafsnittet.

### 3.1 Koncentration af primer og probe i ddPCR-opsætningen

Høje og lave koncentrationer af primer og probe for de fire detektionssystemer ('Bonham', 'Myaare', 'Oncgor' og 'Promin') resulterede i ensartede overensstemmelse mellem forventede antal DNA-molekyler og antallet af DNA-molekyler vurderet ud fra ddPCR (Figur 2 og 3). For både lav og høj koncentration af primer og probe var aftog fortyndingsrækken med en lineær sammenhæng, der fulgte en til en sammenhæng mellem et forventet og et målt antal DNA-molekyler (Figur 2 og 3). Med både høj og lav koncentration af primer og probe var det muligt med ddPCR at detektere ned til to DNA-molekyler per tilsat  $\mu\text{L}$ .

### 3.2 Volumen af ekstraktion fra vandprøve i ddPCR-opsætning

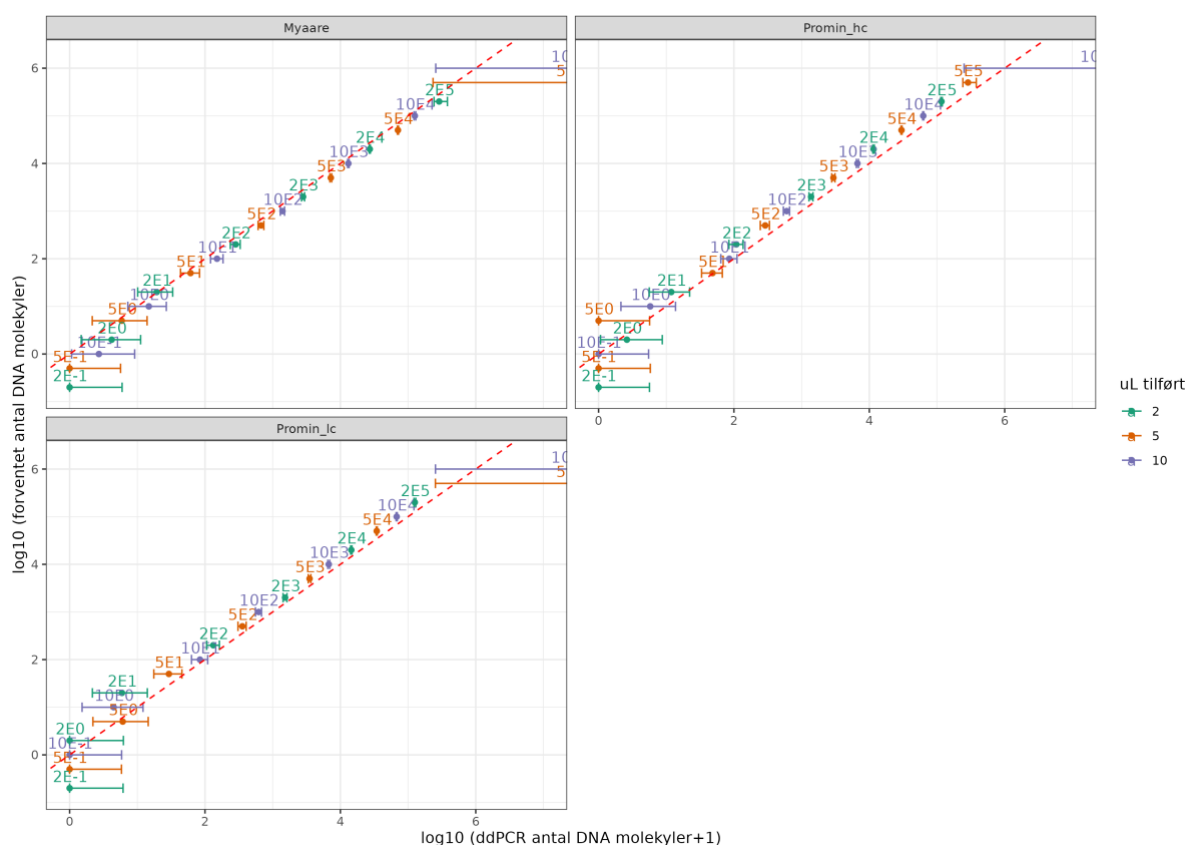
Analyser med ddPCR på syntetiserede og oprensede fragmenter, for de to systemer der kan detektere eDNA fra sandmusling ('Myaare') og dinoflagellatten *Prorocentrum minimum* ('Promin'), viste at begge detektionssystemer er i stand til at fungere ved koncentrationer ned til to DNA-molekyler per  $\mu\text{L}$ , men at lavere koncentrationer af DNA ikke kan skelnes fra negative kontrolprøver (Figur 2). Test med ddPCR af fortyndinger af syntetiseret oprenset fragment for rødtotalgen *Bonnemaisonia hamifera* ('Bonham') og for pukkellaks ('Oncgor'), i høje og lave tilsætninger af primer og probe, viste ligeledes, at disse to systemer kan fungere på ddPCR-platform og detektere ned til to DNA-molekyler per tilsat  $\mu\text{L}$  (Figur 3).

### 3.3 Fortyndingsrække i ddPCR-opsætning

Fortyndingsrækken af den positive kontrol blev afprøvet på de fire udvalgte detektionssystemer ('Promin', 'Myaare', 'Bonham' og 'Oncgor') (Figur 2 - 4). For alle fire systemer var den øvre grænse for detektion af det eftersøgte DNA-fragment er omkring 200 k positive dråber. Denne øvre grænse er uafhængig af det anvendte detektionssystem (Figur 3), da dette er QX200-maskinens øvre ramme for præcist at læse DNA-niveauer – som også står angivet i manualen (BioRad QX200 User Manual). Det er muligt at tilsætte koncentrationer af DNA til ddPCR-maskinen, der resulterer i mere end 200 k positive dråber. QX200-computerprogrammet tilknyttet ddPCR-maskinen vil så stadig kunne bruges til at forsøge at vurdere koncentrationen af DNA i den oprindelige tilsatte prøve, men det bliver så gjort på baggrund af et minimum af dråber, eller ingen negative dråber, hvilket gør vurderingen af så høj en koncentration upræcis. Et mål med ddPCR på så høj en koncentration vil være upræcis, da det er nødvendigt at have en mindre andel af negative dråber som kan skelnes fra positive dråber.

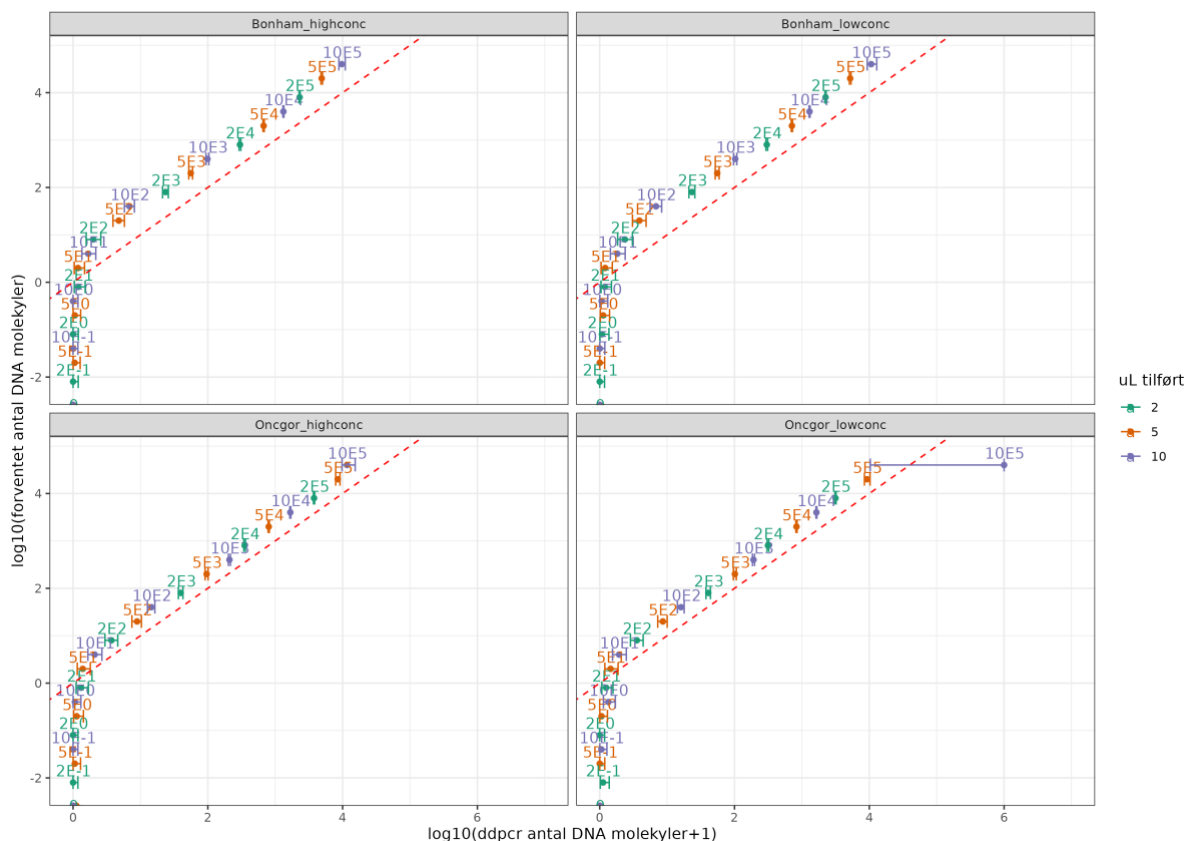
Den nedre grænse for kvantificering med ddPCR varierede fra detektionssystem til detektionssystem. For de fire detektionssystemer ('Bonham', 'Myaare', 'Oncgor' og 'Promin') var den nedre grænse på mellem to og fem DNA molekyler per reaktionsbrønd (Figur 2 - 4).

Det artsspecifikke detektionssystem imod sortmundet kutling, der fanger et fragment af det mitokondrielle *cytochrome oxidase 1* gen (Neomel-mtDNA-co1), gav ikke tilstrækkeligt med fluorescenssignal fra proben, til at positive dråber kan skelnes fra negative dråber (Figur 6). Samme 'Neomel-mtDNA-co1'-system har tidligere resulteret i lave fluorescensniveauer på qPCR-platform, hvor fluorescens fra positive amplifikationer vanskeligt kan skelnes fra baggrundsfluorescens, når DNA-niveauerne var lave. Fordi dette tidligere 'Neomel-mtDNA-co1'-system voldte problemer her på ddPCR blev et ekstra detektionssystem imod sortmundet kutling også afprøvet. Dette ekstra system fanger et fragment af det mitokondrielle *cytochrome b* gen (Neomel-mtDNA-cytb), i sortmundet kutling. Dette system er altså også artsspecifikt, og reagerer ikke på DNA fra andre arter af kutlinger, men dette detektionssystem imod et fragment af det mitokondrielle *cytochrome b* gen har ligeledes også haft vanskeligt ved at skelne fluorescenssignalet fra proben i qPCR-maskinen fra baggrundsfluorescensen i reaktionen.

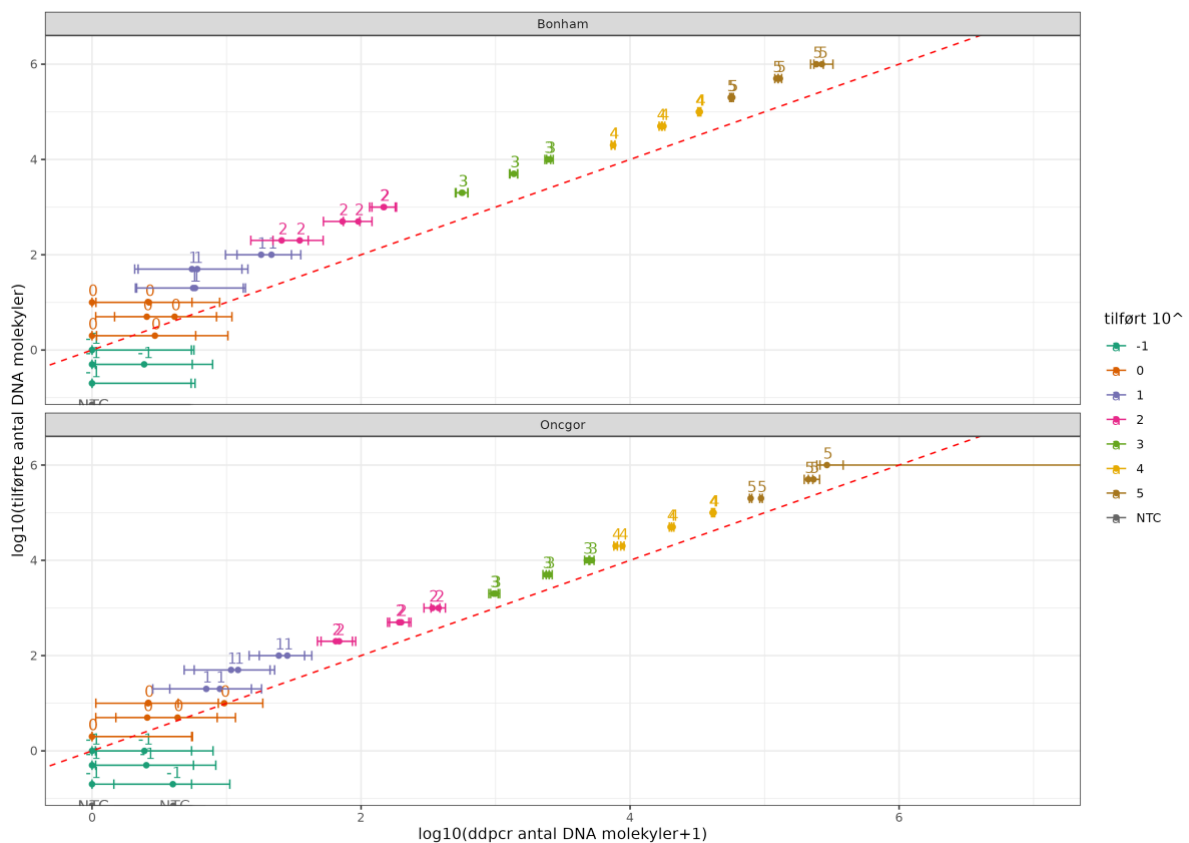


**Figur 2.** Sammenligning af antal af DNA-molekyler målt med ddPCR med forventet antal DNA-molekyler udregnet ud fra koncentration og molekylvægt. Udført for to artsspecifikke detektionssystemer imod sandmusling ('Myaare') og mod en dinoflagellat - *Prorocentrum minimum* ('Promin'). For opsætning med det artsspecifikke eDNA-detektionssystem 'Promin', blev primer og probe tilsat i lav (lc) og i høj (hc) koncentration. Lav koncentration indbefatter primer tilsat til at resultere i en slutkoncentration på 900 nM og probe tilsat til at give en slutkoncentration på 250 nM, hvilket følger de generelle anbefalinger fra BioRad om brug af QX200. Høj koncentration er de slutkoncentrationer, der for qPCR opsætning er fundet værende optimale (Knudsen et al., 2022), hvilket i dette tilfælde er 1200 nM for primerne og 300 nM for proben.

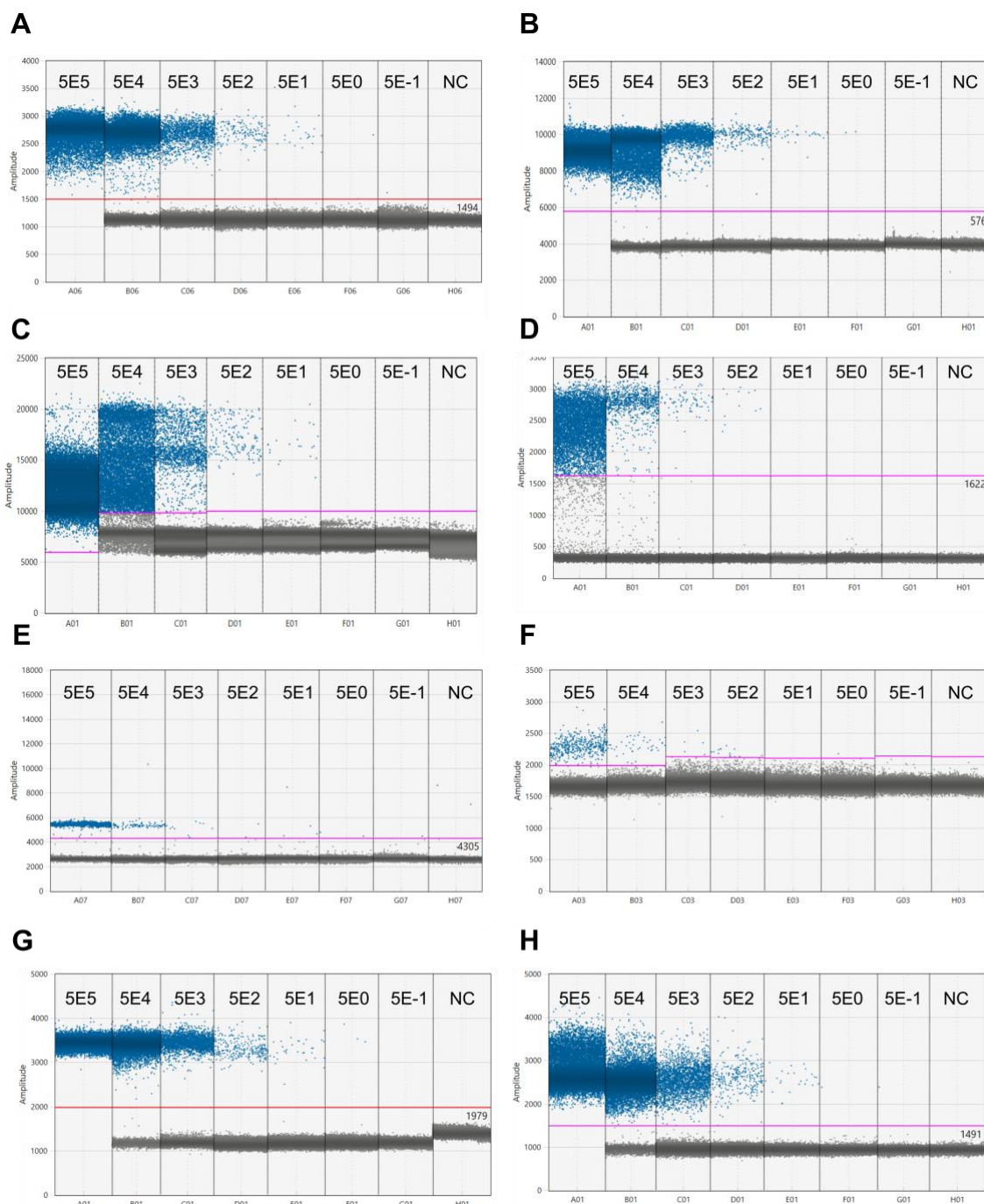




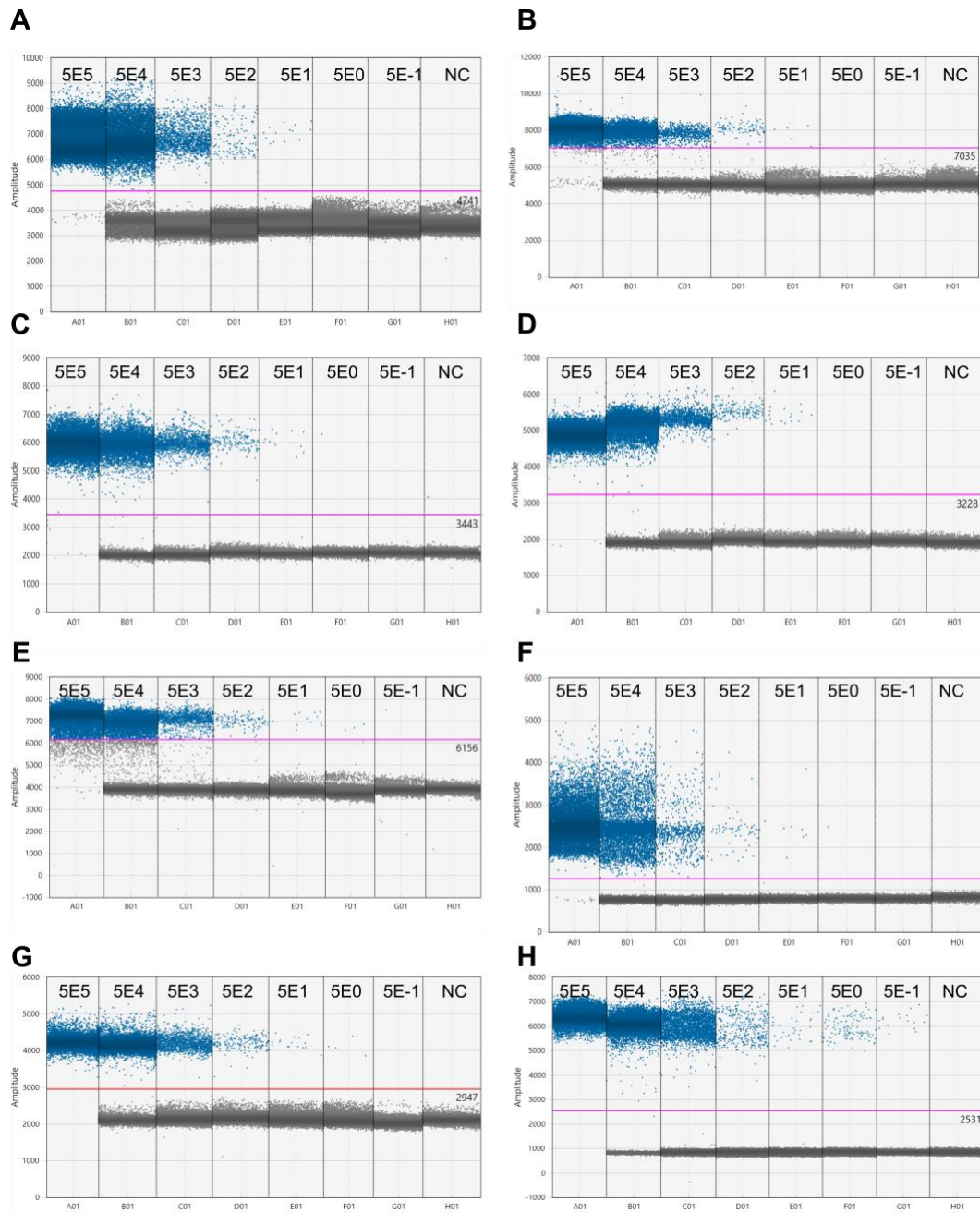
**Figur 3.** Forventet antal af DNA-molekyler i absolut fortyndingsrække. Her er positiv kontrol DNA tilsat i tre forskellige volumener (2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L og 10  $\mu$ L), for to forskellige detektionssystemer ('Bonham' og 'Oncgor'), der kan registrere eDNA fra henholdsvis rødtotalge og pukcellaks. Koncentrationerne af den positive kontrol blev tilsat som 1E5, 1E4, 1E3, 1E2, 1E1, 1E0 og 1E-1 DNA-molekyler per  $\mu$ L. Disse koncentrationer kan så multipliceres med det tilsatte volumen, for at få det forventede tilsatte antal DNA-molekyler. Dette forventede antal DNA-molekyler er også angivet med over hvert målepunkt. Den røde stiplede linje angiver hvor et forhold på 1:1 vil være gældende. Begge detektionssystemer blev afprøvet i ddPCR med tilsætning af primere i lav koncentration (diagrammer til højre) og i høj koncentration (diagrammer til venstre). Bemærk at akserne er logaritmiske på alle plots.



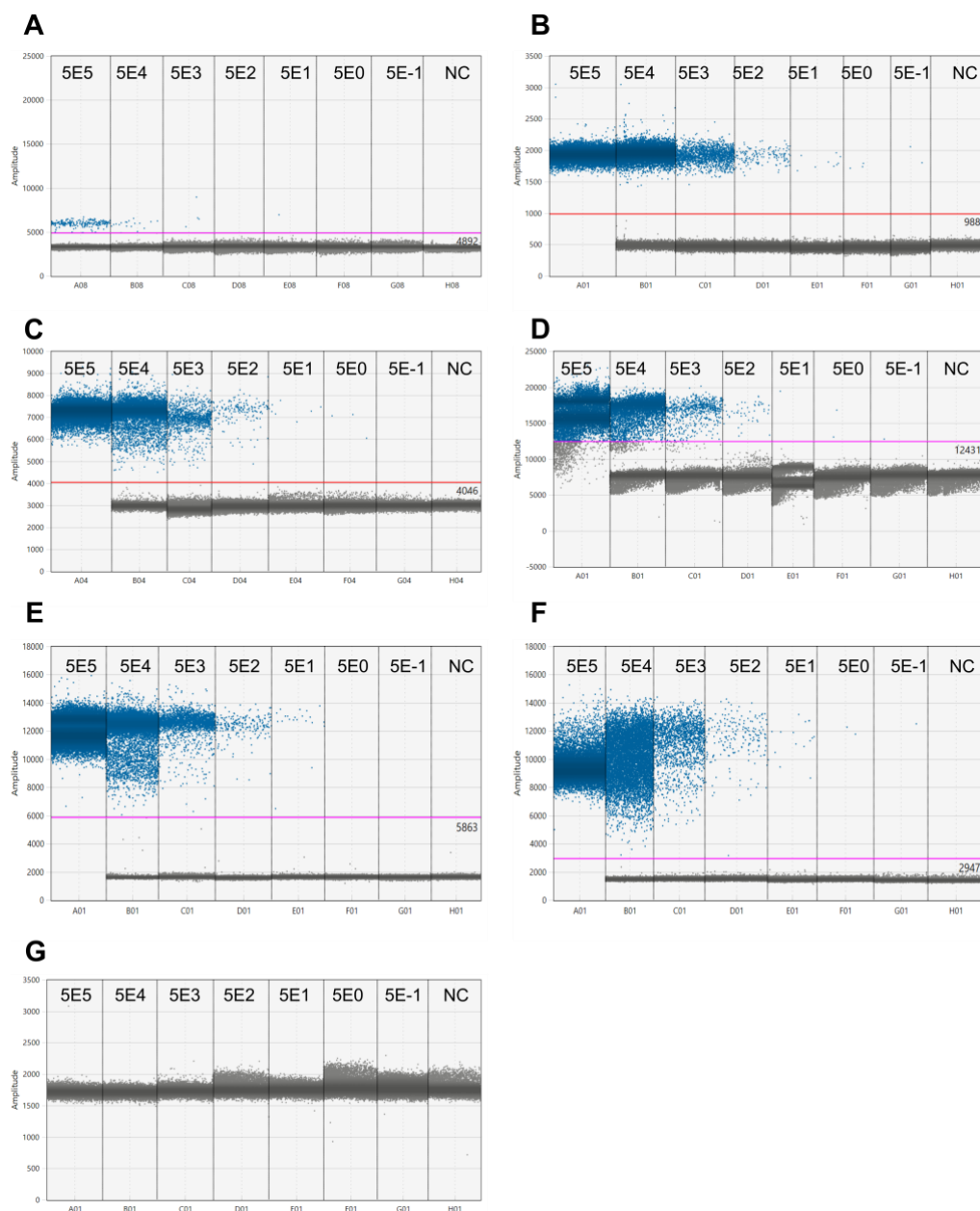
**Figur 4.** Sammenligning af absolut standard fortyndingsrække for 'Bonham'-systemet imod eDNA fra rødtotalge og for 'Oncgor'-systemet imod eDNA fra pukkellaks. Det beregnede tilførte antal DNA-molekyler er for begge systemer beregnet som højere end hvad det er målt til med ddPCR, og det beregnede antal DNA-molekyler er derfor at betragte som et potentielt maksimum. Den stiplede røde linje angiver hvor forholdet er identisk. Det beregnede tilførte antal DNA-molekyler er en anelse over den røde linje, og indikerer dermed at det forventede antal DNA-molekyler ikke stemmer helt overens med det ddPCR-målte antal DNA molekyler. De horisontale afvigelser kommer af ddPCR-metodens normalfordelte optælling af positive dråber. Med få positive dråber mindskes præcisionen, med udelukkende positive dråber (>200 k dråber) er der ikke nogen negative dråber at sammenholde med. Bemærk at akserne er logaritmiske på begge diagrammer.



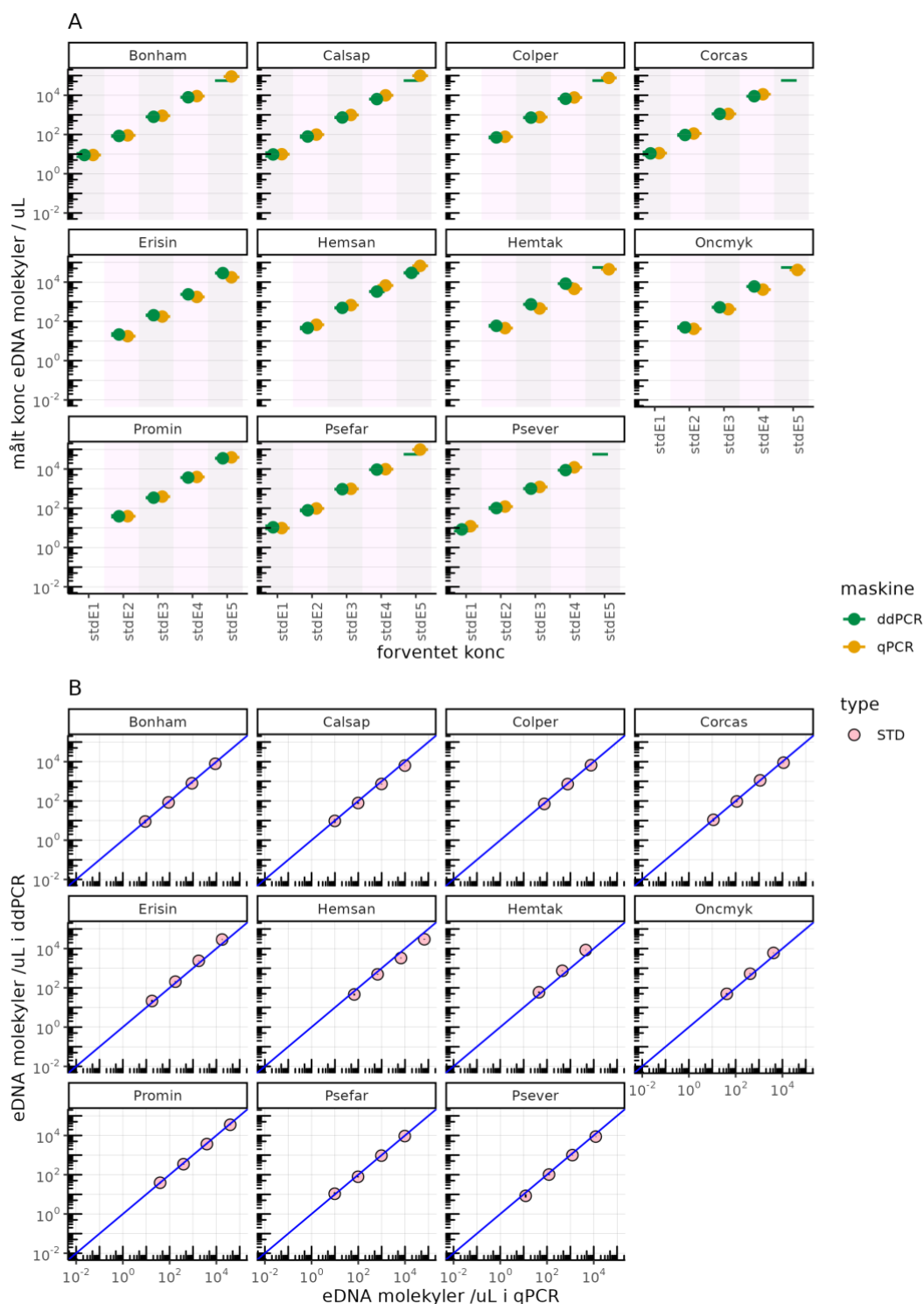
**Figur 5.** Fortyndingsserie udført på ddPCR resulterer i negative dråber (grå) og positive dråber (blå), der adskilles med den røde linje, som fastsættes af computerprogrammet, der er tilknyttet 'QX220 droplet reader'-maskinen. Talværdien til højre under den røde linje angiver fluorescensniveauet, der benyttes for adskillelse af positive og negative dråber. Både negative og positive dråber har et niveau af fluorescens – hvis 'amplitude' er langs y-aksen – og de positive dråber har et højere niveau af fluorescens end de negative. Her er fordelingen af positive og negative dråber vist for de artsspecifikke detektionssystemer: (A) Acibae, (B) Bonham, (C) Calsap, (D) Caraur, (E) CCcytb, (F) CpCYB, (G) Colper og (H) Corcas. Bogstavkoderne er forklaret i tabel 1 og 2. Udført på positive kontroller tilført i koncentrationer ender på hhv. 5E5, 5E4, 5E3, 5E2, 5E1, 5E0 og 5E-1 DNA-molekyler, og med en negativ kontrol (NC).



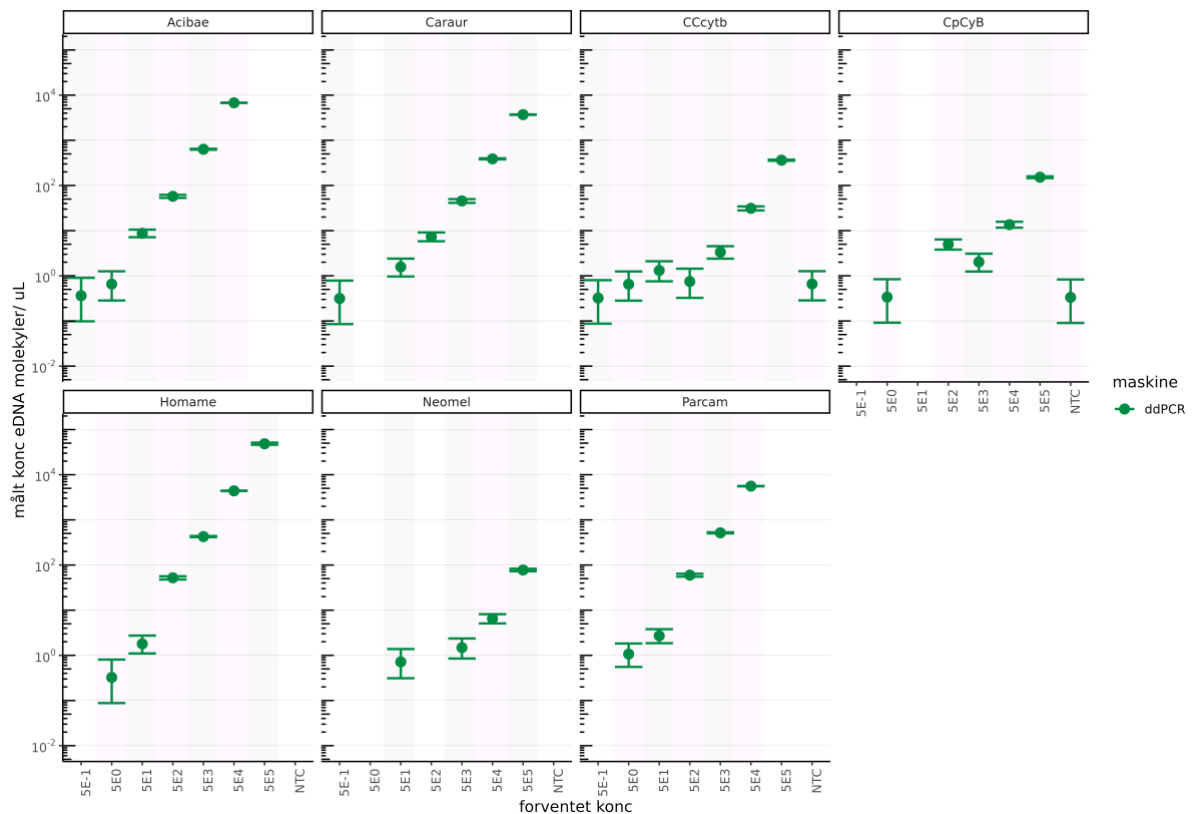
**Figur 6.** Fortyndingsserie udført på ddPCR resulterer i negative dråber (grå) og positive dråber (blå), der adskilles med den røde linje, som fastsættes af computerprogrammet, der er tilknyttet 'QX220 droplet reader'-maskinen. Talværdien til højre under den røde linje angiver fluorescensniveauet, der benyttes for adskillelse af positive og negative dråber. Både negative og positive dråber har et niveau af fluorescens – hvis 'amplitude' er langs y-aksen – og de positive dråber har et højere niveau af fluorescens end de negative. Her er fordelingen af positive og negative dråber vist for de artsspecifikke detektionssystemer: (A) Cragig, (B) Erisin, (C) Hemsan, (D) Hemtak, (E) Homame, (F) Karmik, (G) Mnelei og (H) Myaare. Bogstavkoder er forklaret i tabel 1 og 2. Udført på positive kontroller tilført i koncentrationer ender på hhv. 5E5, 5E4, 5E3, 5E2, 5E1, 5E0 og 5E-1 DNA-molekyler, og med en negativ kontrol (NC).



**Figur 7.** Fortyndingsserie udført på ddPCR resulterer i negative dråber (grå) og positive dråber (blå), der adskilles med den røde linje, som fastsættes af computerprogrammet, der er tilknyttet 'QX220 droplet reader'-maskinen. Talværdien til højre under den røde linje angiver fluorescensniveauet, der benyttes for adskillelse af positive og negative dråber. Både negative og positive dråber har et niveau af fluorescens – hvis 'amplitude' er langs y-aksen – og de positive dråber har et højere niveau af fluorescens end de negative. Her er fordelingen af positive og negative dråber vist for de artsspecifikke detektionssystemer: (A) Neomel-cytb, (B) Oncmyk, (C) Parcam, (D) Promin, (E) Psefar, (F) Psever og (G) Rhihar. Bogstavkoder er forklaret i tabel 1 og 2. Udført på positive kontroller tilført i koncentrationer så reaktionerne ender på hhv. 5E5, 5E4, 5E3, 5E2, 5E1, 5E0 og 5E-1 DNA-molekyler, og med en negativ kontrol (NC). For test med 'Rhihar'-systemet (G) var det ikke muligt at identificere nogen positive dråber.



**Figur 8.** Sammenligning mellem antal DNA-molekyler målt med ddPCR og qPCR for fortyndingsserier for 11 specifikke detektionssystemer. A) Målte koncentrationer i antal molekylar per  $\mu\text{L}$  for de enkelte standardfortyndingstrin for ddPCR (grøn) og for qPCR (okkergul). B) Sammenligning af koncentrationer i standardfortyndingsserier (STD) for ddPCR og qPCR for de samme 11 detektionssystemer.



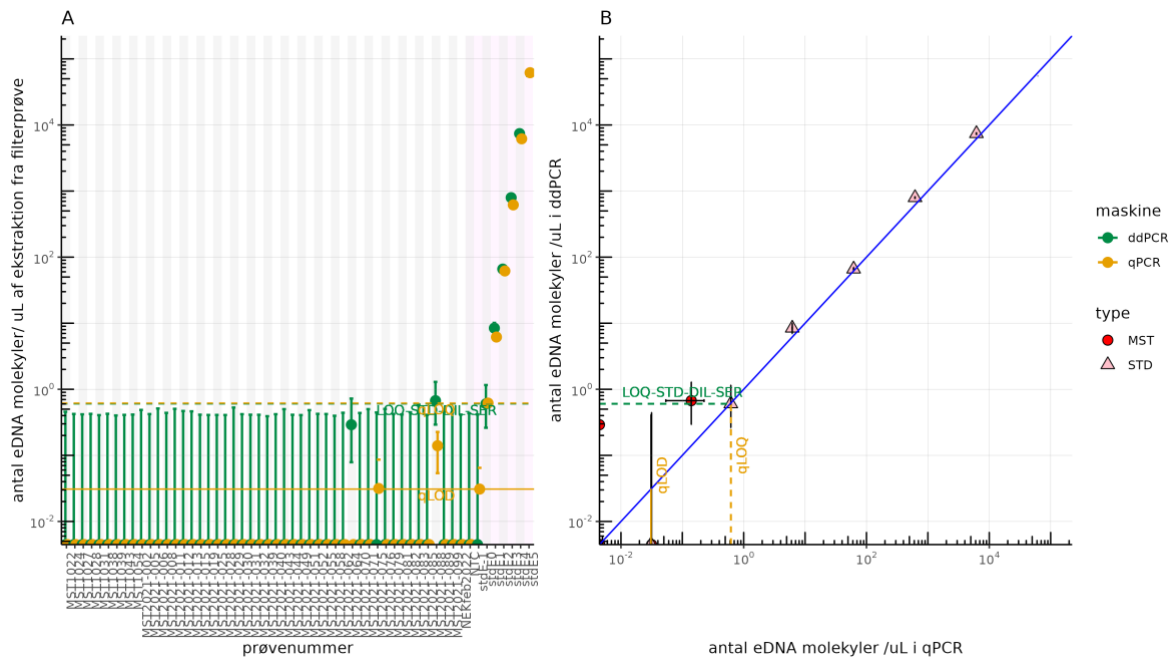
**Figur 9.** Sammenligning af antallet af DNA-molekyler målt med ddPCR for fortyndingsserier for syv specifikke detektionssystemer. Koncentrationer i antal af DNA-molekyler per  $\mu\text{L}$  (på y-aksen) for de enkelte standardfortyndingstrin målt på ddPCR-plattform (grøn), sammenholdt med den forventede koncentration (x-aksen). Målinger af niveauer over  $2\text{E}5$  molekyler/ $\mu\text{L}$  og under  $2\text{E}-1$  molekyler/ $\mu\text{L}$  er ekskluderet, da disse målinger er uden for området hvor ddPCR-plattformen er i stand til at give præcise mål for antallet af DNA-molekyler i prøven. Der er ikke qPCR-data at sammenholde med for disse fortyndingsserier, da disse detektionssystemer ikke blev afprøvet på vandprøver fra 2021. For sortmundet kutling er 'Neomel-cytb' systemet benyttet her i denne sammenligning.

### 3.4 Analyse af vandprøver i ddPCR-opsætning

I det følgende tekstafsnit gennemgås hvert enkelt af de 17 artsspecifikke detektionssystemer, der fungerede direkte på ddPCR, og resultaterne sammenlignes mellem qPCR og ddPCR. For hvert detektionssystem præsenteres resultaterne i to paneler (A og B i Figur 10-26), hvor (A) sammenholder de enkelte MST prøver indsamlet i 2021 og antallet af det eftersøgte eDNA-molekyle i ddPCR (grøn) og qPCR (okkergul). De lodrette violette inddelinger er til for at hjælpe med at skelne mellem standarder i den absolutte fortyndingsrække. Den grønne og gule stiplede vandrette linje angiver den nedre grænse for mulig kvantificering af antallet af molekyler. Under dette niveau kan eDNA godt detekteres, men ikke kvantificeres. Den gule fuldt optrukne vandrette linje angiver den nedre grænse for detektion med qPCR, og (B) sammenholder antallet af DNA-molekyler mellem qPCR og ddPCR. Den blå linje angiver hvor forholdet er én til én. Horisontale standardafvigelser er for qPCR og vertikale standardafvigelser er for ddPCR. Prøverne er inddelt efter om de er absolutte standarder (STD, pink) eller ekstrakter fra marine vandprøver (MST, rød). For alle resultater med detektionssystemer er akserne logaritmiske på begge plots (Figur 10 - 26).

### 3.4.1 Detektion af eDNA fra rødtotalge - *Bonnemaisonia hamifera*

For prøve MST2021-088 (fra Kerteminde Bugt, 20. maj 2021) kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra rødtotalge (Figur 10). Mens der med qPCR alene blev fundet eDNA i vandprøve MST2021-075 (fra VEJ0006870\_94300001, 11. maj 2021), og med ddPCR alene blev der fundet eDNA i vandprøve MST2021-064 (93730002\_VIB3708\_1, 2. september 2021). Dermed kunne begge platforme finde et positivt eDNA-signal i en af alle tre positive vandprøver.

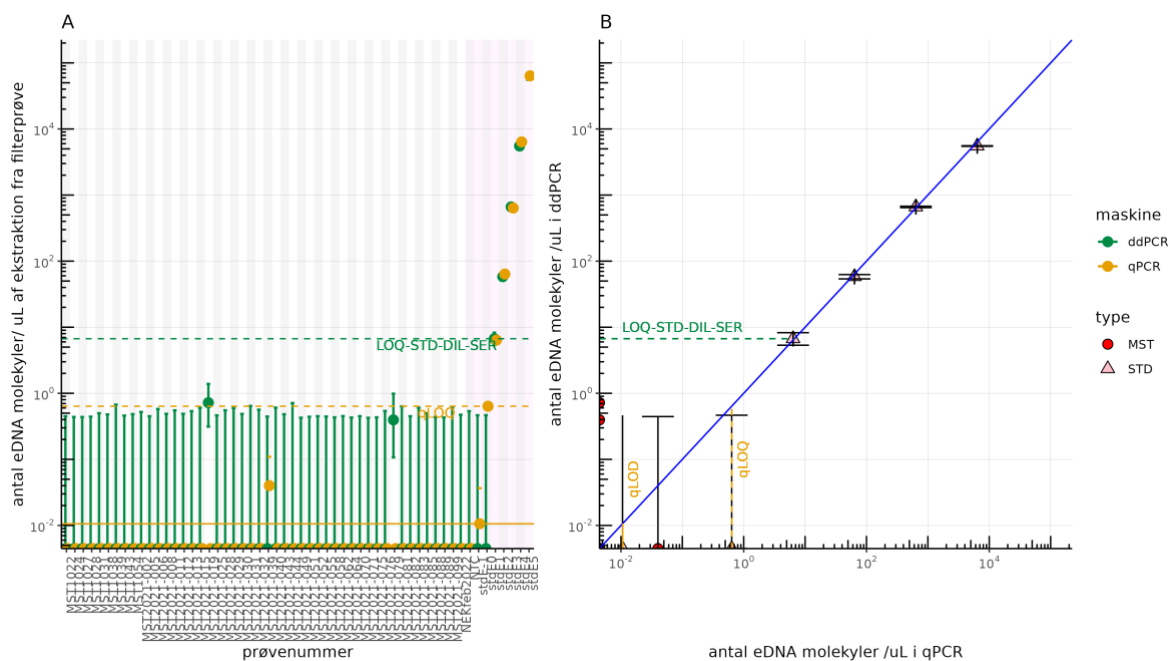


**Figur 10.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR og ddPCR fra rødtotalgen *Bonnemaisonia hamifera*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.2 Detektion af eDNA fra blå svømmekrabbe - *Calinectes sapidus*

Det var ikke muligt med både qPCR og ddPCR at detektere eDNA fra blå svømmekrabbe (Figur 11) i de samme vandprøver. Med qPCR blev der fundet eDNA i vandprøve MST2021-039 og med ddPCR blev der fundet eDNA i to vandprøver (MST2021-019, MST2021-079). De lave niveauer detekteret med begge platforme kunne ikke kvantificeres.

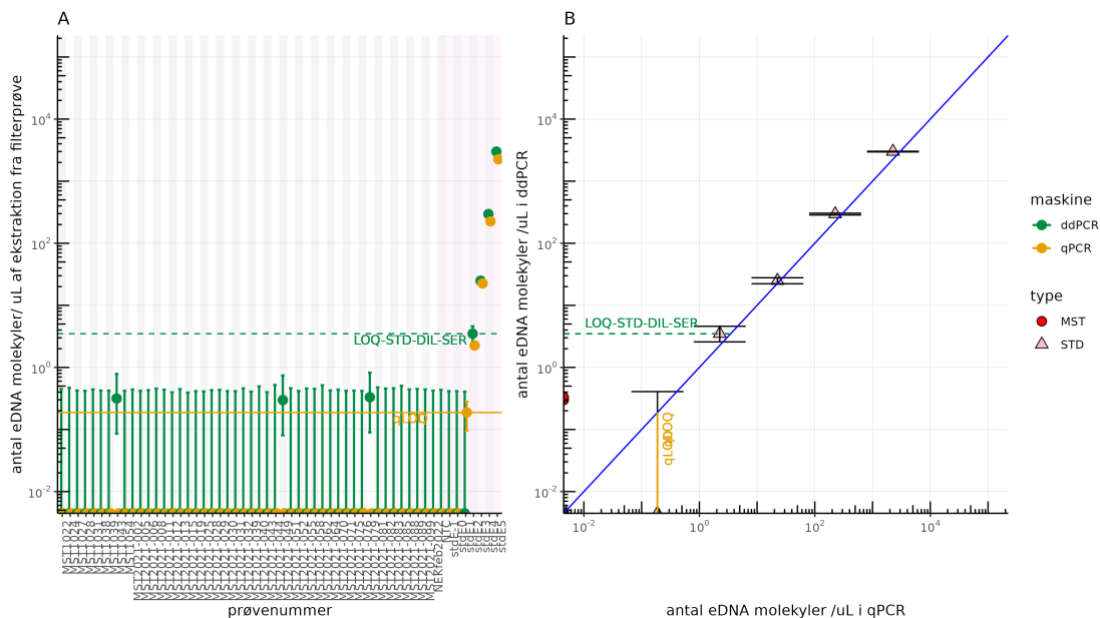




**Figur 11.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR og ddPCR fra blå svømmekrabbe - *Callinectes sapidus*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.3 Detektion af eDNA fra sølvkarusse – *Carassius auratus*

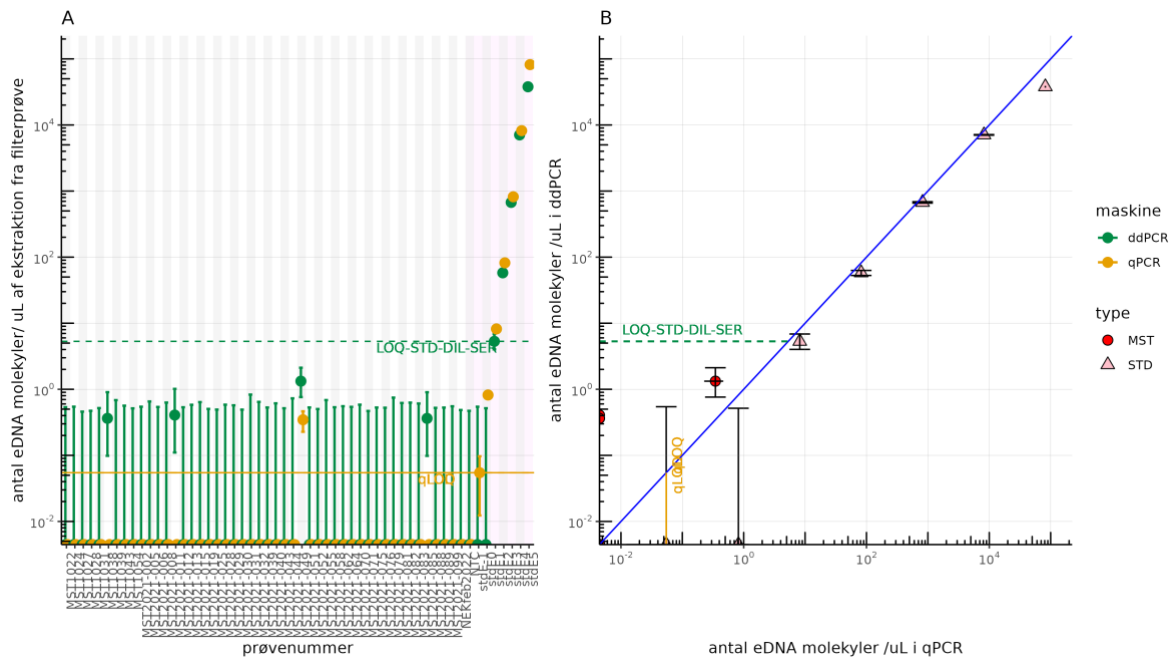
For ingen vandprøver kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra sølvkarusse (Figur 12). Med qPCR blev der ikke fundet eDNA i nogle af vandprøverne. Med ddPCR blev der fundet eDNA i tre vandprøver (MST1043, MST2021-049, MST2021-079).



**Figur 12.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR og ddPCR for sølvkarusse *Carassius auratus*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.4 Detektion af eDNA fra stillehavsøsters – *Crassostrea gigas*

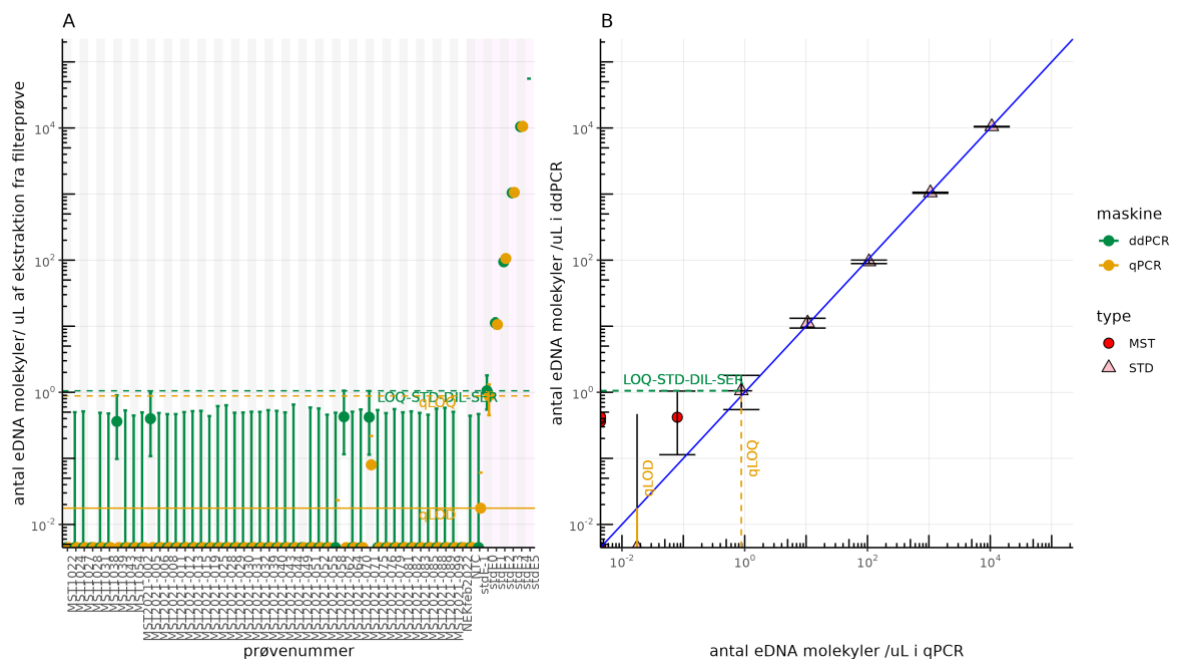
For vandprøve MST2021-049 kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra stillehavsøsters, men i lave niveauer (Figur 13). Med ddPCR alene blev der fundet eDNA i tre vandprøver (MST1038, MST2021-011, MST2021-085). Dermed kunne begge platforme finde et positivt eDNA-signal i de samme 25% af alle positive detektioner.



**Figur 13.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR og ddPCR for stillehavsøsters *Crassostrea gigas*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.5 Detektion af eDNA fra østerstyv – *Colpomenia peregrine*

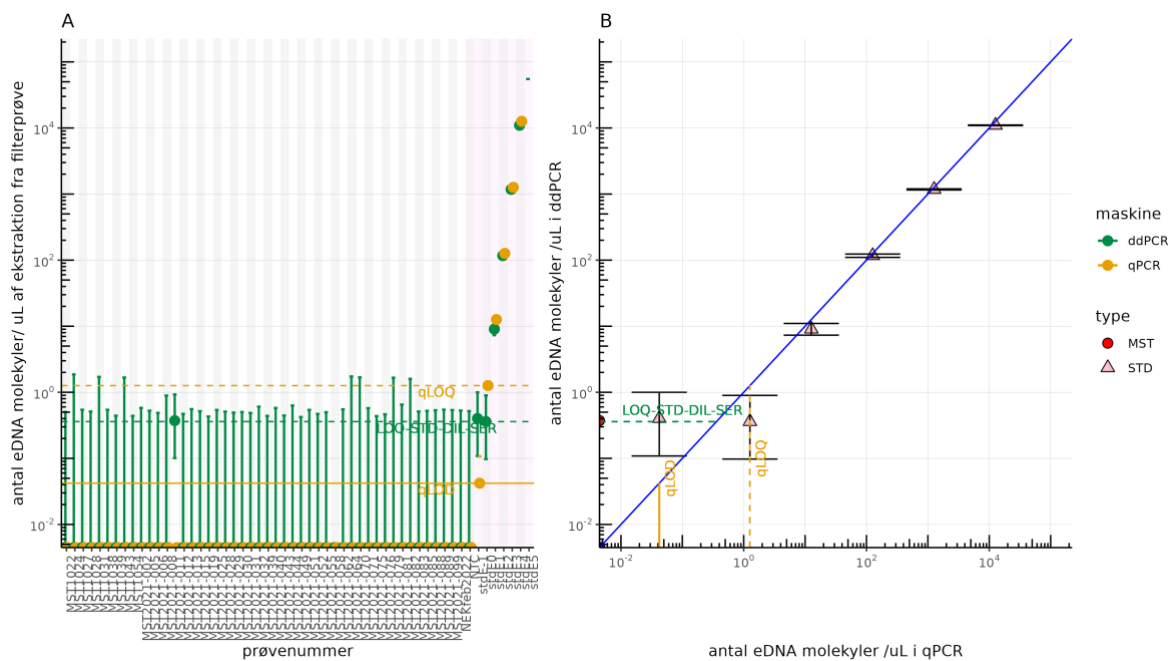
For vandprøven MST2021-071 kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra østerstyv (Figur 14). Med qPCR alene blev der fundet eDNA i vandprøven MST2021-058 og med ddPCR alene blev der fundet eDNA i tre vandprøver (MST1039, MST2021-005, MST2021-062). Dermed kunne begge platforme finde et positivt eDNA signal i de samme 20% af alle positive detektioner.



**Figur 14.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR og ddPCR fra østerstyv - *Colpomenia peregrine*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.6 Detektion af eDNA fra Brakvandskølle polyp – *Cordylophora caspia*

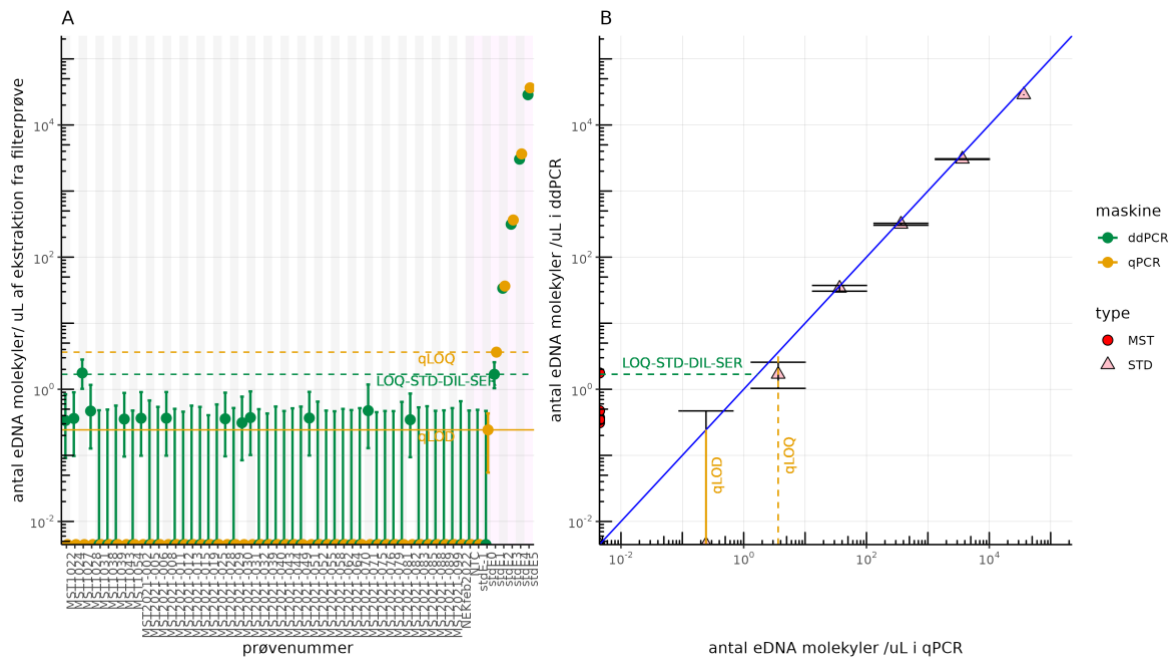
For ingen vandprøver kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra brakvandskrøllepolyp (Figur 15). Med qPCR blev der ikke fundet eDNA i nogle vandprøver. Med ddPCR alene blev der fundet eDNA i vandprøve MST2021-011.



**Figur 15.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR og ddPCR for brakvandskrøllepolyp *Cordylophora caspia*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.7 Detektion af eDNA fra kinesisk uldhåndskrabbe – *Eriocheir sinensis*

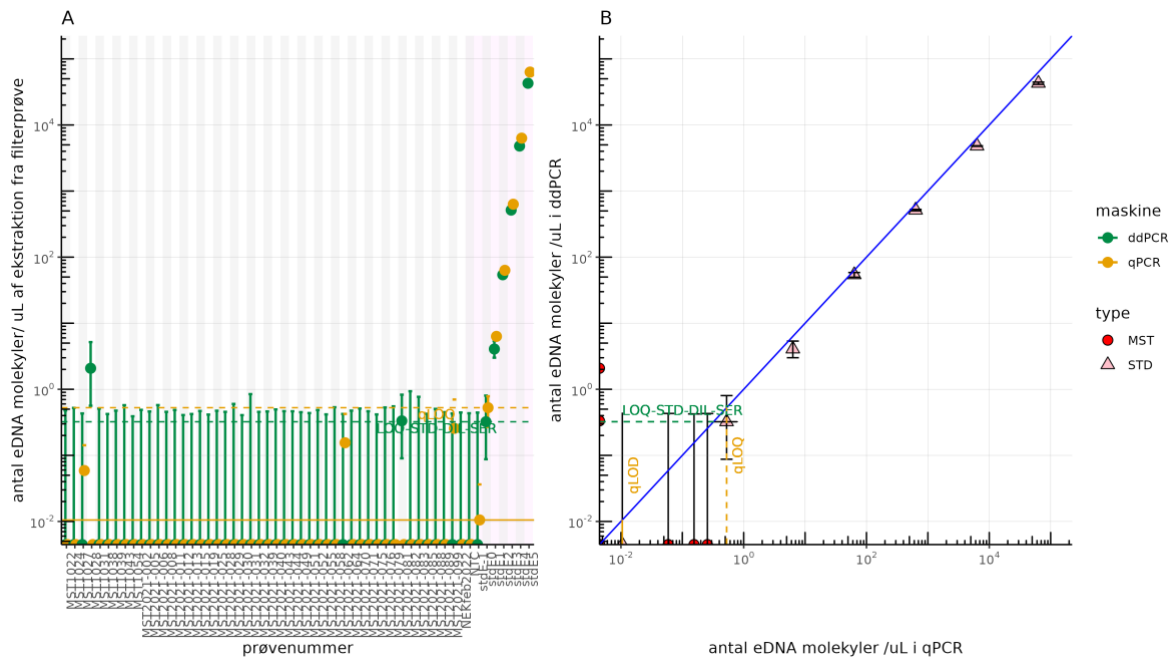
For ingen vandprøver kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra kinesisk uldhåndskrabbe (Figur 16). Med qPCR blev der ikke fundet eDNA i nogle vandprøver, mens der med ddPCR alene blev fundet lave niveauer af eDNA i 13 vandprøver (MST1022, MST1024, MST1027, MST1028, MST1043, MST2021-002, MST2021-008, MST2021-028, MST2021-030, MST2021-031, MST2021-051, MST2021-071, MST2021-082).



**Figur 16.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR og ddPCR fra Kinesisk uldhåndskrabbe - *Eriocheir sinensis*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.8 Detektion af eDNA fra asiatisk klippekrabbe – *Hemigrapsus sanguineis*

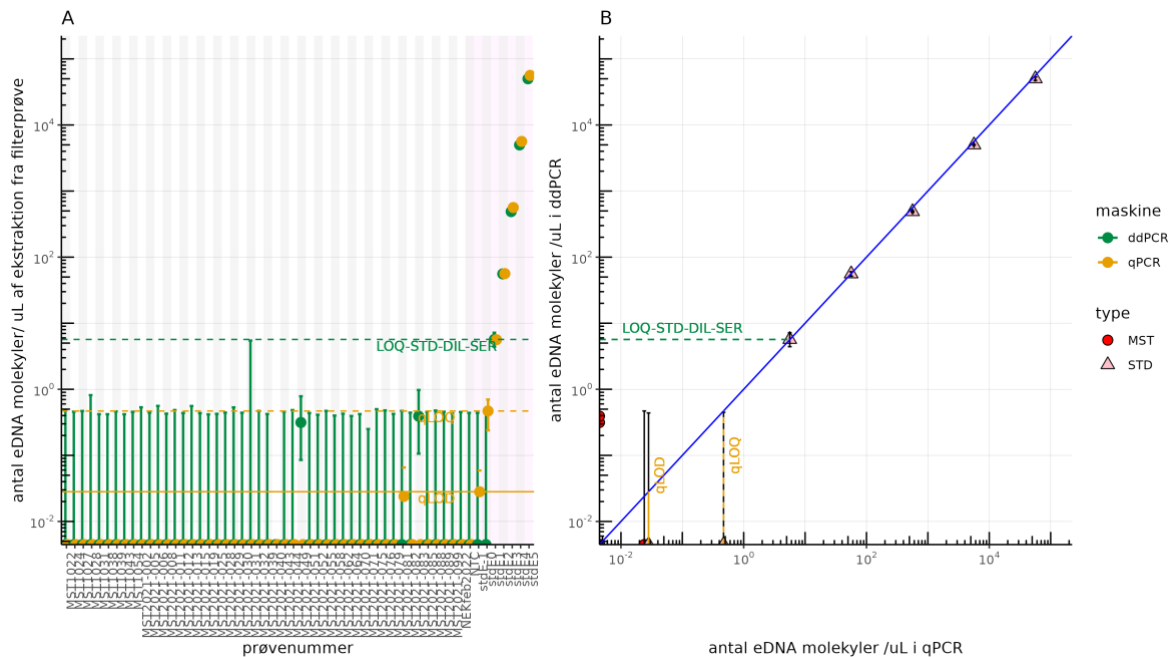
For ingen vandprøver kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra asiatisk klippekrabbe (Figur 17). Med qPCR alene blev der fundet eDNA i vandprøve MST1027 og MST2021-062, og med ddPCR alene blev der fundet eDNA i to vandprøver (MST1028 og MST2021-081).



**Figur 17.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR og ddPCR detektion for asiatisk klippekrabbe - *Hemigrapsus sanguineis*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.9 Detektion af eDNA fra pensel klippekrabbe – *Hemigrapsus takanoi*

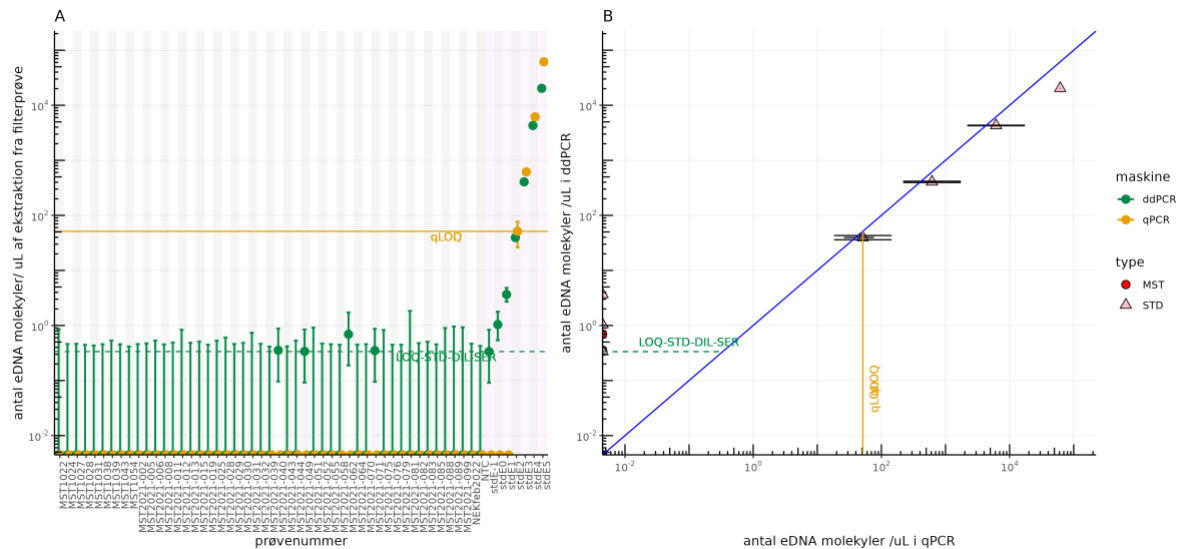
For ingen vandprøver kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra pensel klippekrabbe (Figur 18). Med qPCR alene blev der fundet eDNA i vandprøve MST2021-081, og med ddPCR alene blev der fundet eDNA i to vandprøver (MST2021-049, MST2021-083).



**Figur 18.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR og ddPCR detektion for pensel klippekrabbe - *Hemigrapsus takanoi*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.10 Detektion af eDNA fra amerikansk hummer – *Homarus americanus*

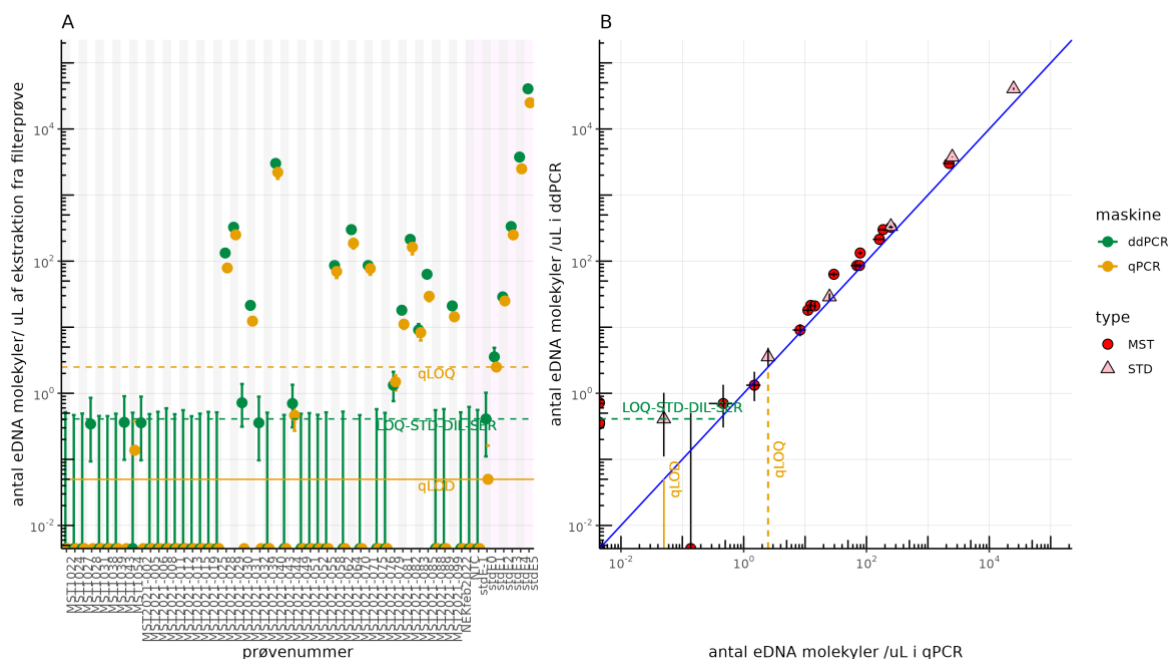
For ingen vandprøver kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra amerikansk hummer (Figur 19). Med qPCR blev der ikke fundet eDNA, og med ddPCR alene blev der fundet eDNA i fire vandprøver (MST2021-040, MST2021-049, MST2021-062, MST2021-071).



**Figur 19.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR og ddPCR detektion for amerikansk hummer – *Homarus americanus*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.11 Detektion af eDNA fra dinoflagellat – *Karenia mikimotoi*

For 14 prøver (MST2021-028, MST2021-029, MST2021-031, MST2021-040, MST2021-044, MST2021-058, MST2021-064, MST2021-071, MST2021-079, MST2021-081, MST2021-082, MST2021-083, MST2021-085, MST2021-099) kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra dinoflagellatten *Karenia mikimotoi* (Figur 20). Mens der med qPCR alene blev fundet eDNA i vandprøven MST1054 blev der med ddPCR alene fundet eDNA i fem vandprøver (MST1028, MST1043, MST2021-002, MST2021-030, MST2021-032). Dermed kunne begge platforme finde et positivt eDNA signal i de samme 70% af alle positive detektioner. For dette detektionssystem har analysen på qPCR-platform undervurderet antallet af DNA-molekyler i forhold til hvad ddPCR-platformen har vurderet (Figur 20). Det kan skyldes at detektionssystemet imod dinoflagellatten *Karenia mikimotoi* fungerer mere optimalt på en ddPCR- platform end det gør på en qPCR-platform.

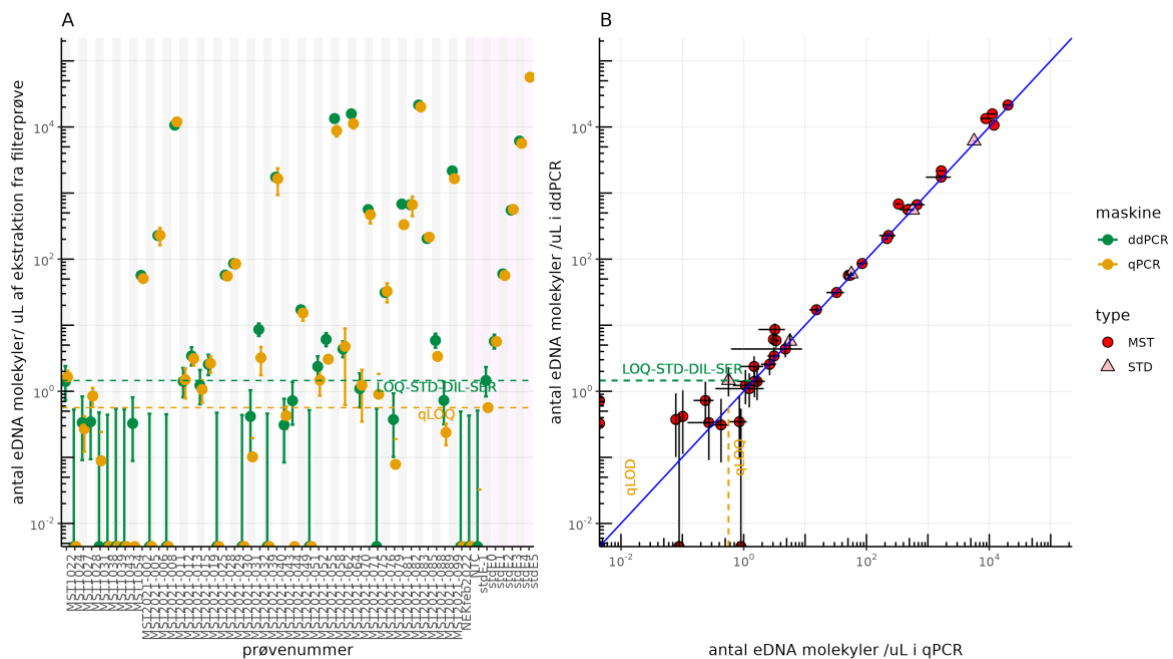


**Figur 20.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR og ddPCR for dinoflagellaten *Karenia mikimotoi*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.12 Detektion af eDNA fra amerikansk ribbegoble - *Mnemiopsis leidyi*

For 33 prøver (MST1022, MST1027, MST1028, MST2021-002, MST2021-006, MST2021-011, MST2021-012, MST2021-013, MST2021-015, MST2021-019, MST2021-028, MST2021-029, MST2021-031, MST2021-032, MST2021-040, MST2021-043, MST2021-049, MST2021-052, MST2021-055, MST2021-058, MST2021-062, MST2021-064, MST2021-070, MST2021-071, MST2021-076, MST2021-079, MST2021-081, MST2021-082, MST2021-083, MST2021-085, MST2021-088, MST2021-089, MST2021-099) kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra amerikansk ribbegoble (Figur 21).

Mens der med qPCR alene blev fundet eDNA i to vandprøver (MST1031, MST2021-075) blev der med ddPCR alene fundet eDNA i to vandprøver (MST1054, MST2021-044). Dermed kunne begge platforme finde et positivt eDNA-signal i de samme 89% af alle positive detektioner. Overensstemmelse mellem målingerne af DNA på de to platforme er bedre for detektionssystemet imod den amerikanske ribbegoble *Mnemiopsis leidyi* (Figur 21), end det var tilfældet for detektionssystemet imod dinoflagellaten *Karenia mikimotoi* (Figur 20). Hvilket muligvis kan skyldes at detektionssystemet imod den amerikanske ribbegoble fungerer lige godt på begge platforme.



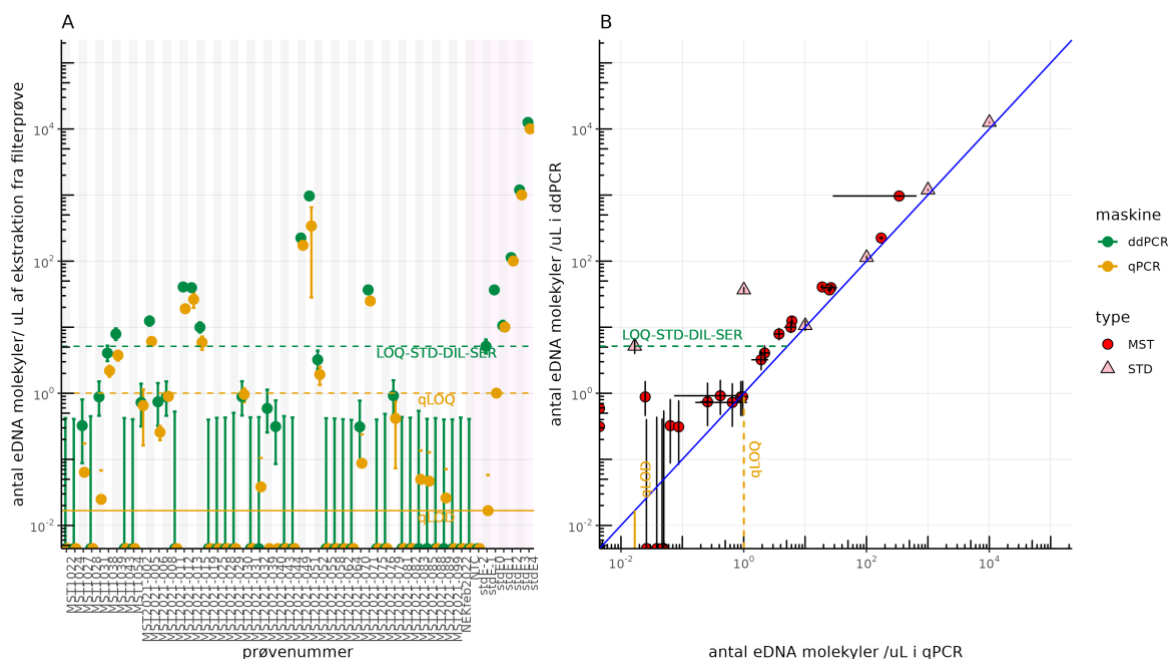
**Figur 21.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR og ddPCR for den amerikanske ribbegoble *Mnemiopsis leidyi*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.13 Detektion af eDNA fra sandmusling - *Mya arenaria*

For 18 vandprøver (MST1027, MST1031, MST1038, MST1039, MST2021-002, MST2021-005, MST2021-006, MST2021-008, MST2021-012, MST2021-013, MST2021-015, MST2021-030, MST2021-049, MST2021-051, MST2021-052, MST2021-070, MST2021-071, MST2021-079) kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra sandmusling (Figur 22).

Med qPCR alene blev der fundet eDNA i fire vandprøver (MST2021-032, MST2021-083, MST2021-085, MST2021-089), med ddPCR alene var der eDNA i to vandprøver (MST2021-039, MST2021-040). Dermed kunne begge platforme finde et positivt eDNA-signal i de samme 75% af alle positive detektioner. Ligesom for detektionssystemet imod dinoflagellaten *Karenia mikimotoi* (Figur 20) er der vurderet større niveauer af DNA i vandprøverne på ddPCR-platform, end hvad qPCR-platformen har vurderet. Det kan muligvis skyldes at detektionssystemet imod sandmusling fungerer mere optimalt på ddPCR-platformen, og at qPCR-platformen på grund af mindre effektivitet i detektionssystemet har undervurderet antallet af DNA-molekyler i vandprøverne.

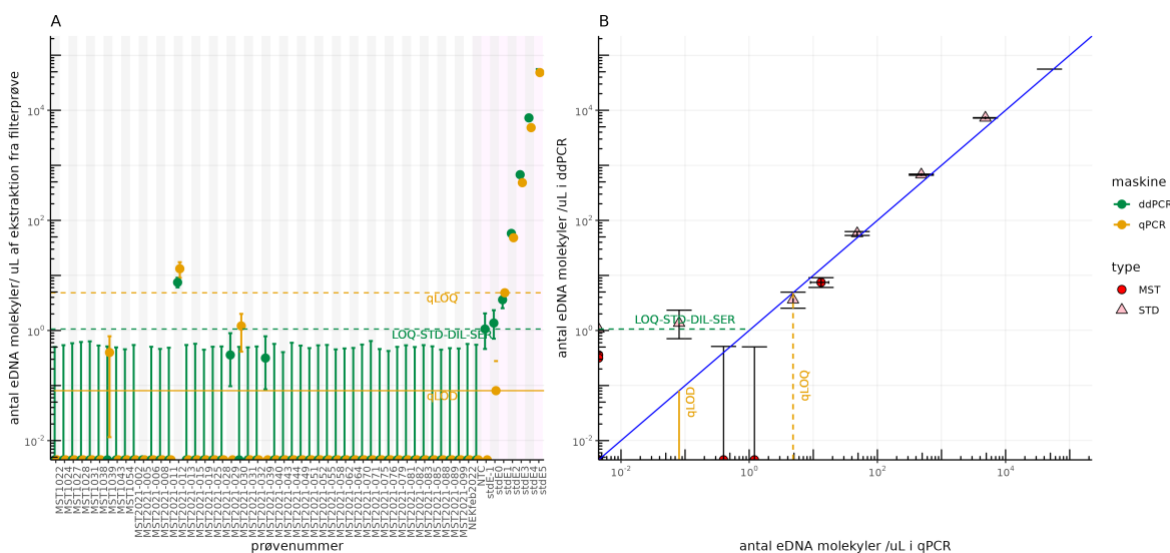




**Figur 22.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR og ddPCR for sandmusling – *Mya arenaria*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.14 Detektion af eDNA fra regnbueørred - *Oncorhynchus mykiss*

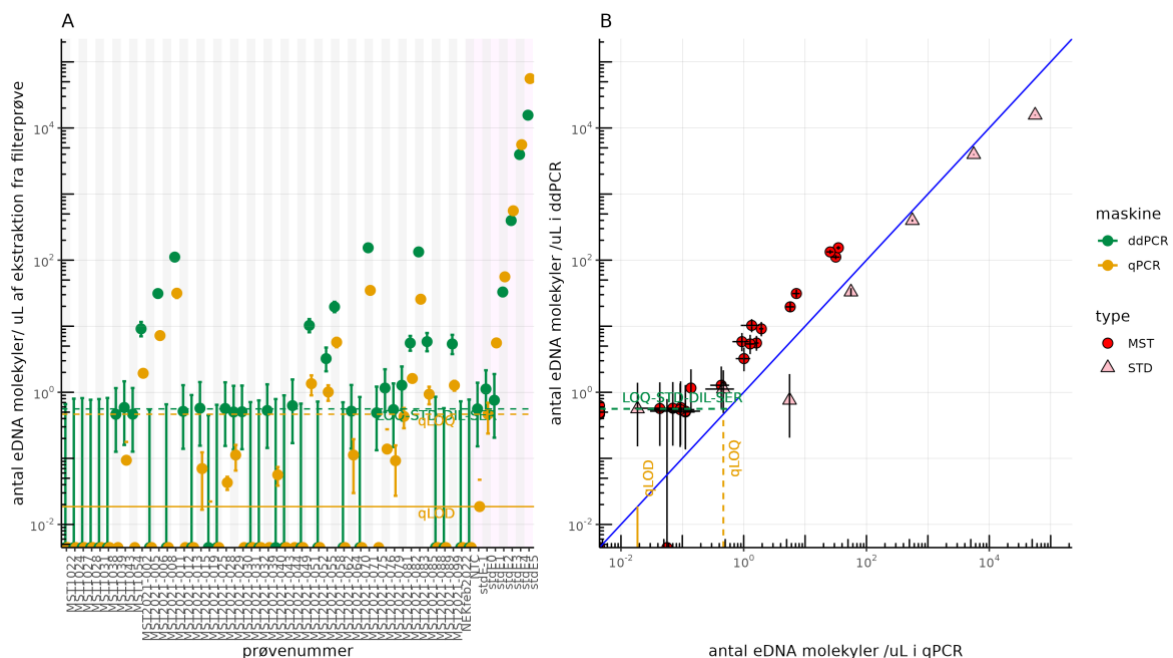
For en prøve (MST2021-012) kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra regnbueørred (Figur 23). Mens der med qPCR alene blev fundet eDNA i to vandprøver (MST1039, MST2021-030) blev der med ddPCR alene fundet eDNA i to vandprøver (MST2021-029, MST2021-039). Dermed kunne begge platforme finde et positivt eDNA-signal i de samme 20% af alle positive detektioner.



**Figur 23.** Sammenligning af eDNA-detektion med qPCR- og ddPCR-detektion for regnbueørred – *Oncorhynchus mykiss*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.15 Detektion af eDNA fra dinoflagellat - *Prorocentrum minimum*

For 19 prøver (MST1043, MST2021-002, MST2021-006, MST2021-011, MST2021-015, MST2021-028, MST2021-029, MST2021-051, MST2021-055, MST2021-058, MST2021-064, MST2021-071, MST2021-076, MST2021-079, MST2021-081, MST2021-082, MST2021-083, MST2021-085, MST2021-099) kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra dinoflagellaten *Prorocentrum minimum* (Figur 24). Mens der med qPCR alene blev fundet eDNA i to vandprøver (MST2021-019, MST2021-040) blev der med ddPCR alene fundet eDNA i syv vandprøver (MST1039, MST1054, MST2021-012, MST2021-030, MST2021-039, MST2021-044, MST2021-075). Dermed kunne begge platforme finde et positivt eDNA-signal i de samme 68% af alle positive detektioner. Ligesom for detektionssystemet imod dinoflagellaten *Karenia mikimotoi* (Figur 20) og for sandmusling *Mya arenaria* (Figur 22) er der vurderet større niveauer af DNA i vandprøverne på ddPCR-platform, end hvad qPCR-platformen har vurderet. Det kan muligvis skyldes at detektionssystemet imod sandmusling og dinoflagellaten *Prorocentrum minimum* fungerer mere optimalt på ddPCR-platformen, og at qPCR-platformen på grund af mindre effektivitet i detektionsassayet har undervurderet antallet af DNA-molekyler i vandprøverne.

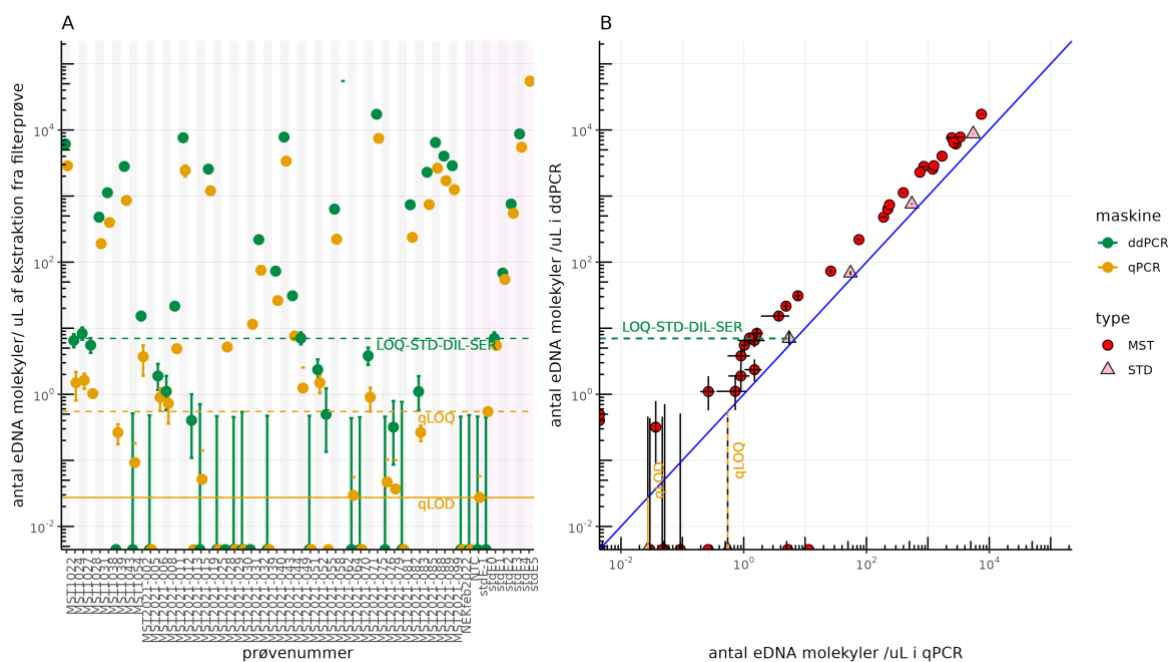


**Figur 24.** Sammenligning af qPCR-detektion af eDNA med ddPCR-detektion af eDNA for dinoflagellat – *Prorocentrum minimum*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.16 Detektion af eDNA fra heterokont flagellat - *Pseudochattonella farcimen*

For 30 prøver (MST1022, MST1024, MST1027, MST1028, MST1031, MST1038, MST1043, MST2021-002, MST2021-006, MST2021-008, MST2021-011, MST2021-012, MST2021-019, MST2021-032, MST2021-040, MST2021-043, MST2021-044, MST2021-049, MST2021-052, MST2021-058, MST2021-062, MST2021-071, MST2021-075, MST2021-079, MST2021-082, MST2021-083, MST2021-085, MST2021-088, MST2021-089, MST2021-099) kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra den heterokont flagellat *Pseudochattonella farcimen* (Figur 25). Mens der med qPCR alene blev fundet eDNA i syv vandprøver (MST1039, MST1054, MST2021-015, MST2021-028, MST2021-031, MST2021-064, MST2021-076) blev der med ddPCR alene fundet eDNA i to vandprøver (MST2021-013, MST2021-055). Dermed kunne begge platforme finde et positivt eDNA-signal i de samme 77% af alle

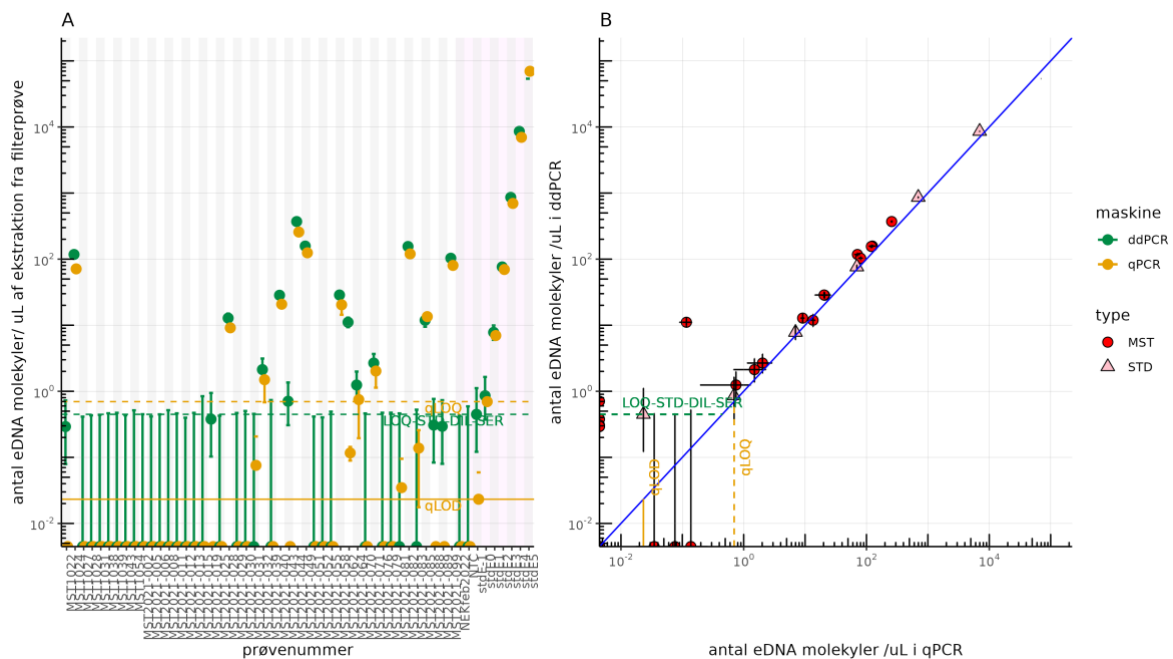
positive detektioner. Ligesom for detektionssystemet imod dinoflagellaten *Karenia mikimotoi* (Figur 20) og for sandmusling *Mya arenaria* (Figur 22) er der vurderet større niveauer af DNA i vandprøverne på ddPCR-plattform, end hvad qPCR-plattformen har vurderet. Det kan muligvis skyldes at detektionssystemet imod disse arter fungerer mere optimalt på ddPCR-plattformen, og at qPCR-plattformen på grund af mindre effektivitet i detektionsassayet har undervurderet antallet af DNA-molekyler i vandprøverne.



**Figur 25.** Sammenligning af qPCR-detektion af eDNA med ddPCR-detektion af eDNA for en heterokont flagellat *Pseudochattonella farcimen*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.4.17 Detektion af eDNA fra heterokont flagellat - *Pseudochattonella verruculosa*

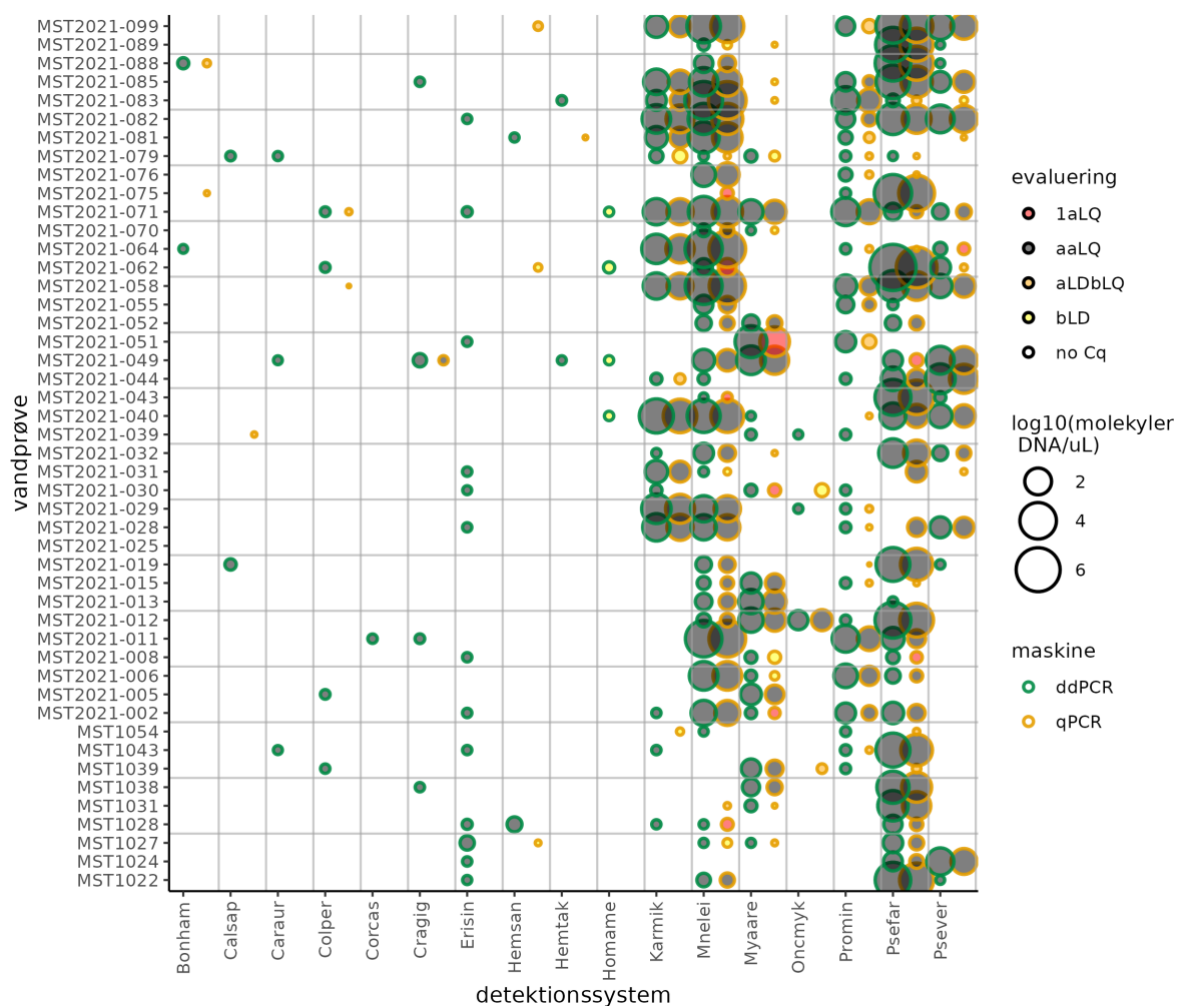
For 13 prøver (MST1024, MST2021-028, MST2021-032, MST2021-040, MST2021-044, MST2021-049, MST2021-058, MST2021-062, MST2021-064, MST2021-071, MST2021-082, MST2021-085, MST2021-099) kunne både qPCR og ddPCR detektere eDNA fra den heterokonte flagellat *Pseudochattonella verruculosa* (Figur 26). Mens der med qPCR alene blev fundet eDNA i tre vandprøver (MST2021-031, MST2021-081, MST2021-083) blev der med ddPCR alene fundet eDNA i seks vandprøver (MST1022, MST2021-019, MST2021-043, MST2021-075, MST2021-088, MST2021-089). Dermed kunne begge platforme finde positivt eDNA-signal i de samme 59% af alle positive detektioner. Ligesom for detektionssystemet imod dinoflagellaten *Karenia mikimotoi* (Figur 20) og for sandmusling *Mya arenaria* (Figur 22) er der vurderet større niveauer af DNA i vandprøverne på ddPCR-plattform, end hvad qPCR-plattformen har vurderet. Det kan muligvis skyldes at detektionssystemet imod for disse arter fungerer mere optimalt på ddPCR-plattformen, og at qPCR-plattformen på grund af mindre effektivitet i detektionsassayet har undervurderet antallet af DNA-molekyler i vandprøverne.



**Figur 26.** Sammenligning af eDNA detektion med qPCR- og ddPCR-detektion for en heterokont flagellat *Pseudochattonella verruculosa*. De to subfigurbogstaver A og B er forklaret i afsnit 3.4.

### 3.5 Lineære modeller for sammenligning mellem qPCR og ddPCR

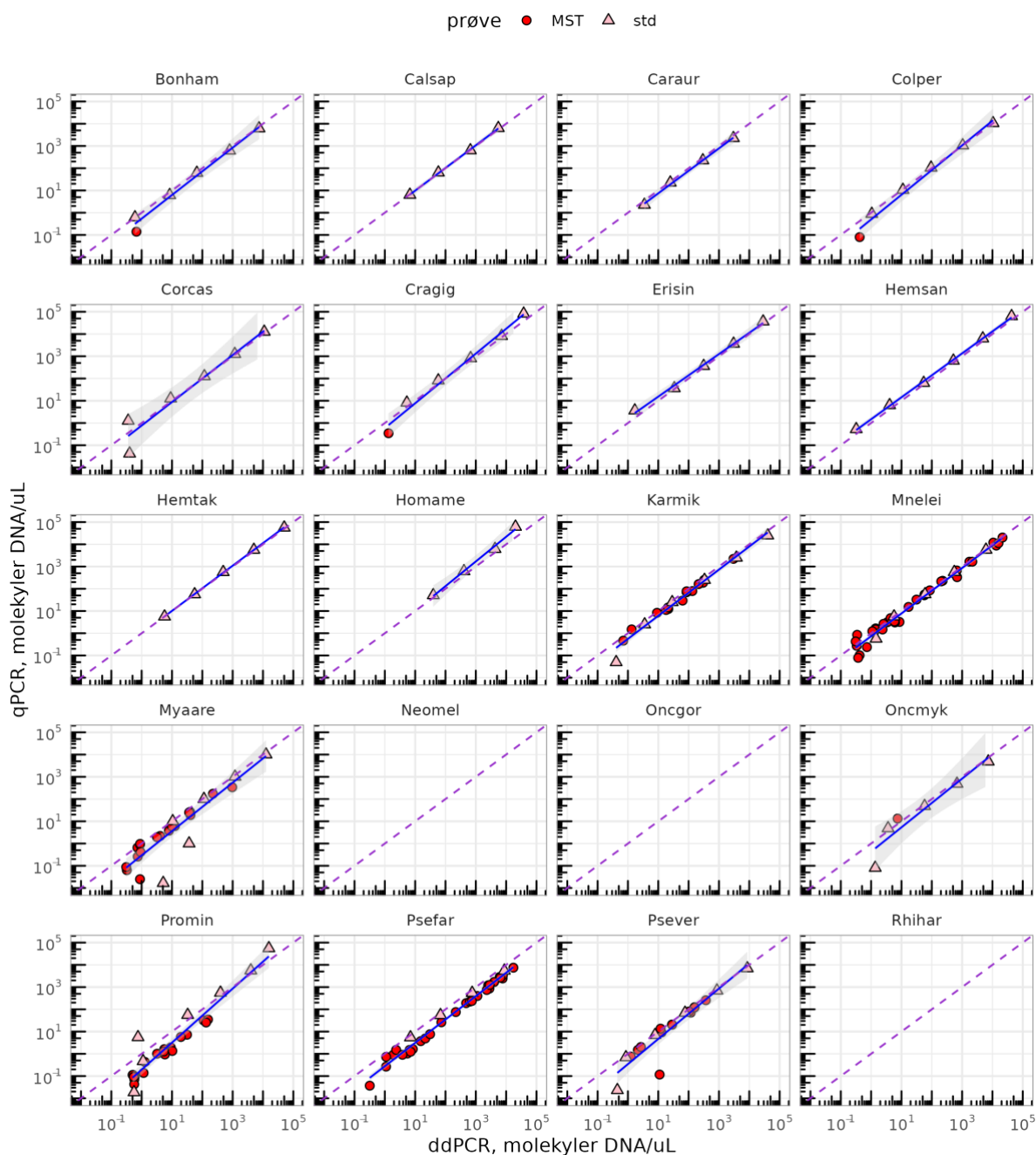
I de logaritmetransformerede lineære modeller for de målte eDNA-niveauer for de enkelte detektionssystemer, er der et lineært sammenhæng mellem qPCR og ddPCR (Tabel 3, Figur 28). For 11 af detektionssystemerne ('Bonham', 'Calsap', 'Caraur', 'Colper', 'Corcas', 'Cragig', 'Erisin', 'Hemsan', 'Hemtak', 'Homame' og 'Oncmyk') var niveauerne af eDNA i vandprøverne så lave at den lineære sammenhæng kun kunne eftervises med fortyndingsserien af den positive kontrol inkluderet i både qPCR og ddPCR.



**Figur 27.** Sammenligning af antal eDNA-molekyler målt med ddPCR (grøn) og qPCR (okkergul) for MST-vandprøverne indsamlet i 2021. De artsspecifikke detektionssystemer er forkortet bogstavkoder der fremgår af Tabel 1 og 2. Størrelsen på pletterne kan ikke tolkes som et udtryk for biomasse eller individantal for den pågældende NIS, da eDNA-niveauet ikke kan oversættes til hverken biomasse eller individer. Til gengæld er pletternes størrelser sammenlignelige for qPCR- og ddPCR-analyserne indenfor hvert enkelt detektionssystem. Farven i midten af pletterne repræsenterer en evaluering af eDNA-niveauet og er farvet i forhold til om det er over eller under 'limit of detection' (LOD) og 'limit of quantification' (LOQ), således at eDNA-niveauer under LOD (bLD) er gule, mellem LOD og LOQ (aLDblQ) er orange, én replikat over LOQ (1aLQ) er rød og flere end én replikat over LOQ (aaLQ) er sorte.

**Tabel 3.** Hældning, skæring og regressionsværdier for lineære modeller af log<sub>10</sub> transformerede eDNA-målinger med qPCR og ddPCR på Miljøstyrelsens (MST) prøver og positive standarder (STD). De forkortede bogstavkoder repræsenterer de enkelte artspecifikke eDNA-detektionssystemer og er forklaret i Tabel 1 og 2. For systemerne 'Hemtak' og 'Hemsan' er der kun lavet lineær regression imellem allerede efterjusterede antal DNA-molekyler fra STD, mens der for de andre detektionssystemer er udført lineær regression på både MST-prøver samt STD-serien.

Fork Navn	Skæring	Hældning log <sub>10</sub> (ddPCR)	R2	Justeret R2	P værdi
Bonham	0.002	0.814	0.937	0.924	0.000349499603168477
Calsap	0.668	0.674	0.924	0.899	0.00902259690331124
Caraur	-0.192	1.011	0.998	0.997	0.00101791475141428
Colper	-0.022	0.861	0.939	0.927	0.000317757065454947
Corcas	0.093	0.849	0.92	0.904	0.000635408069696213
Cragig	-0.231	1.117	0.984	0.981	9.11405943644211E-05
Erisin	0.23	0.956	0.996	0.995	0.000100324320565946
Hemsan	0.149	0.988	0.999	0.999	2.38204612849971E-07
Hemtak	0.016	1.016	1	1	6.00010141254023E-07
Homame	-0.323	1.11	0.994	0.99	0.00318983054136071
Karmik	-0.254	1.039	0.98	0.979	7.73450449428428E-17
Mnelei	-0.04	0.934	0.957	0.956	7.950328970463E-27
Myaara	-0.532	1.09	0.834	0.826	4.94189288457011E-10
Oncmyk	0.04	0.788	0.879	0.855	0.00180164124049316
Promin	-0.987	1.214	0.922	0.919	7.98165029248434E-15
Psefar	-0.342	0.923	0.957	0.956	4.23083389156362E-24
Psever	-0.177	0.897	0.861	0.853	3.92703575493656E-09



**Figur 28.** Sammenligning af antallet af DNA-molekyler målt med ddPCR og qPCR for MST-vandprøverne (røde pletter) og fortyndinger af positive STD-kontroller (pink trekant). De artsspecifikke detektionssystemer er forkortet med de samme bogstavkoder, der benyttes i Tabel 1 og 2. De blå linjer repræsenterer lineære regressionsmodeller med hældning og skæring i Tabel 3. De violette stiplede linjer angiver hvor forholdet mellem antallet af DNA-molekyler målt med qPCR og ddPCR er én til én. De lineære modeller er frembragt ved at ekskludere niveauer over ( $2E5$  molekylar/μL) og under ( $2E-1$  molekylar/μL), som er grænserne for, hvor ddPCR-plattformen er præcis i kvantificering.

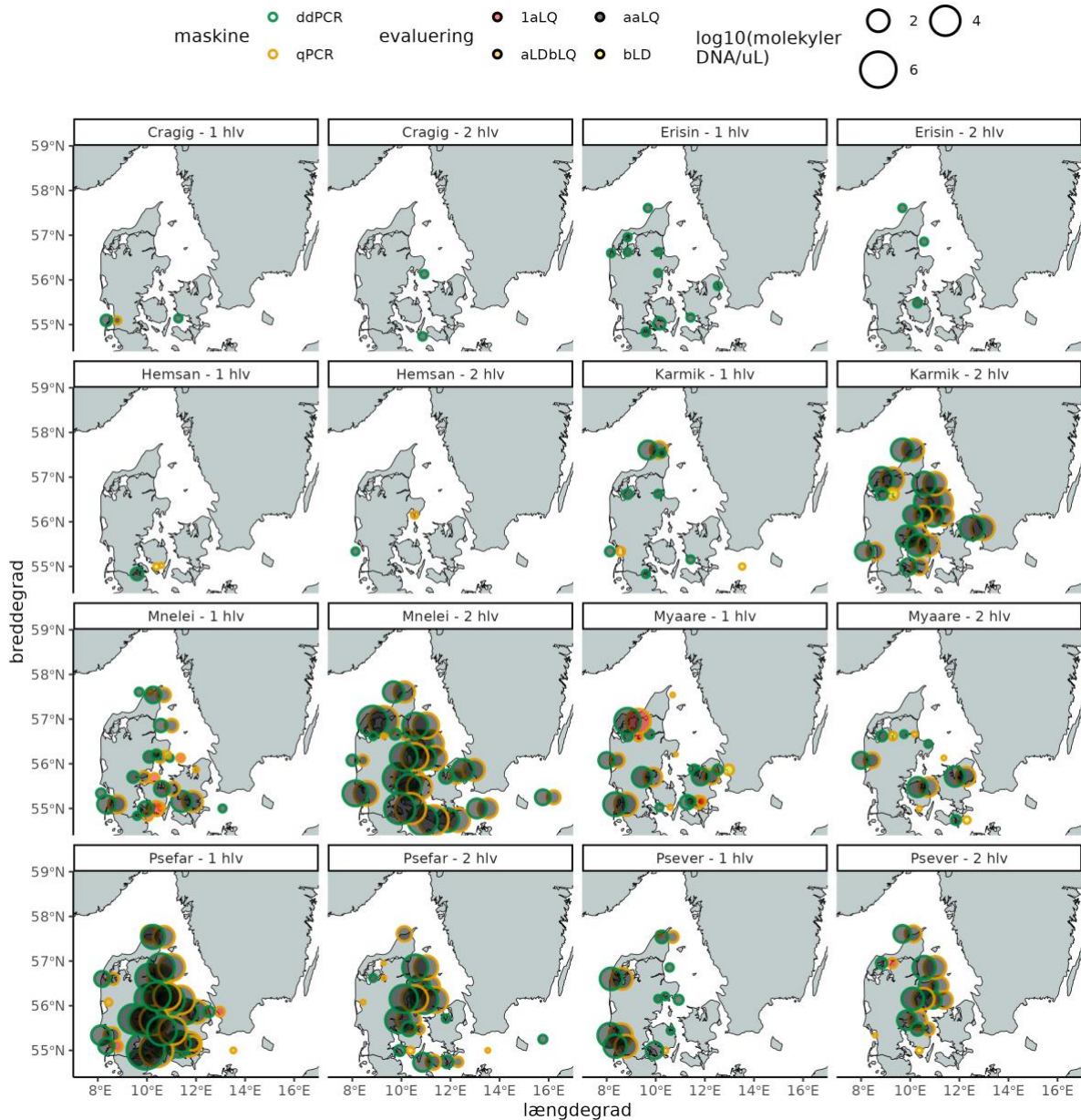
### 3.6 Kortlægning af sammenligning mellem qPCR og ddPCR

De målte niveauer af eDNA er kortlagt for forår (januar- juli) og efterår (august - november) hhv. i Figur 29 og 30. Der er overensstemmelse imellem ddPCR og qPCR for detektion af eDNA fra amerikansk ribbegøple *Mnemiopsis leidyi*, sandmusling *Mya arenaria*, og dinoflagellaten *Karenia mikimotoi*, dinoflagellaten *Prorocentrum minimum* og de heterokonte flagellater *Pseudochattonella* spp.

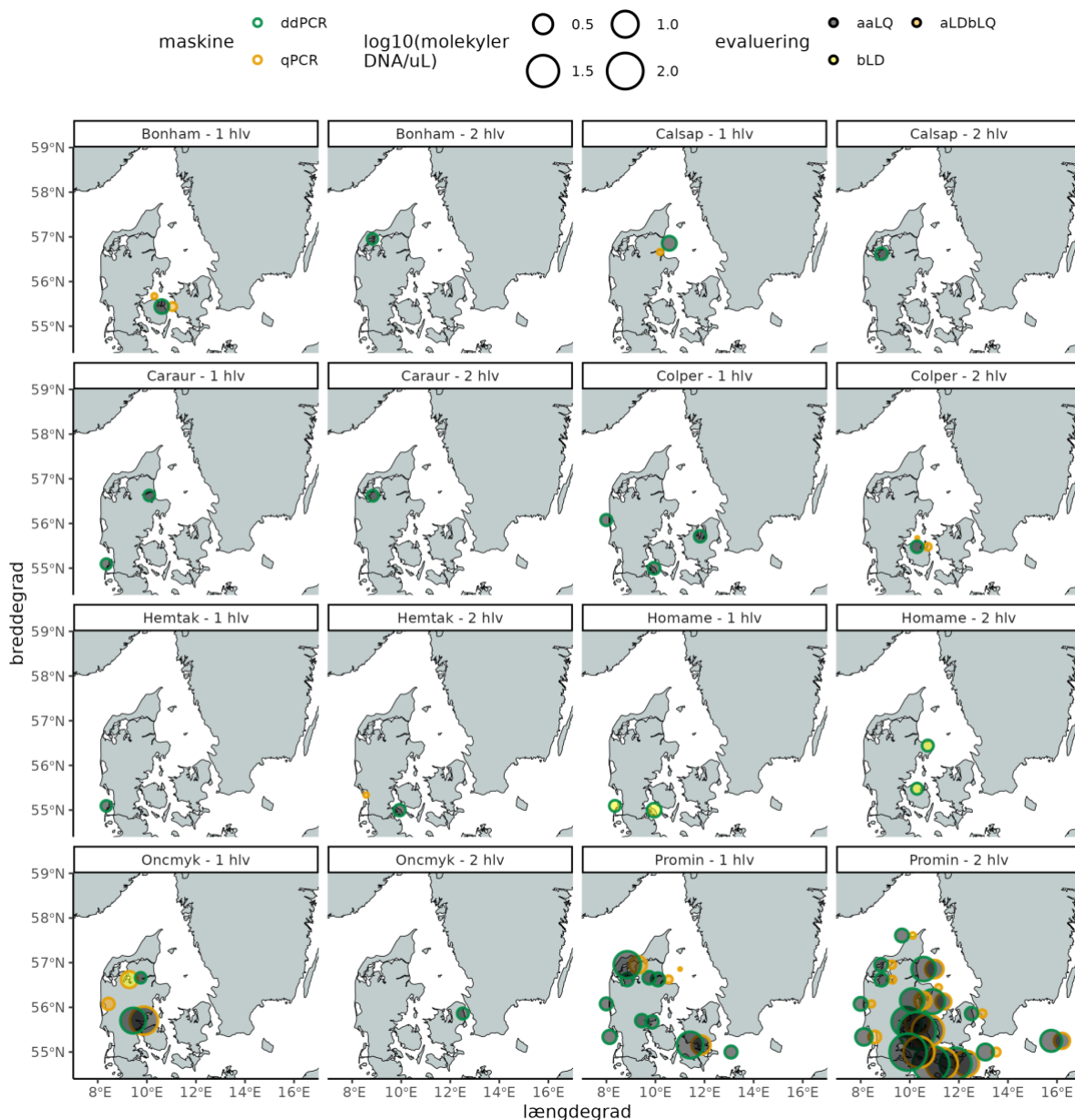
Alle sammen NIS-arter, der i forvejen er kendt for at være vidt udbredte i de danske farvande. For de NIS der sjældent blev detekteret eDNA fra, såsom rødtotalge *Bonnemasonia hamifera* og stillehavsøsters *Crassostrea gigas*, var der uoverensstemmelse for de detektioner, der blev gjort for de forskellige indsamlingslokaliteter, men det var kun var lave niveauer af eDNA (gule og orange kategorier) (Figur 29-30) at der var uoverensstemmelse.

For høje niveauer (røde og sorte kategorier) var detektioner matchende på begge platforme (Figur 29-30). At der uoverensstemmelse mellem detektion af meget lave niveauer, når qPCR og ddPCR sammenholdes, som det er tilfældet for rødtotalge *Bonnemasonia hamifera* og stillehavsøsters *Crassostrea gigas*, og alle de eftersøgte arter af krebsdyr (dvs. kinesisk uldhåndskrabbe *Eriochir sinensis*, amerikansk hummer *Homarus americanus*, blå svømmekrabbe, penselklippekrabbe og asiatisk klippekrabbe) viser at det med qPCR kan være mere op til tilfældigheder om der pipetteres ét molekyle med over i reaktionen, for hvad angår både qPCR og ddPCR. Om noget understreger dette kun nødvendigheden af at lave flere biologiske filterreplikater samt flere gentagne analyser i laboratoriet, når den eftersøgte organisme er sjælden eller langt væk fra indsamlingslokaliteten. Denne begrænsning svarer til hvad man vil forvente med konventionel overvågning, hvor sjældne organismer kan forventes at gå uopdagede hen, hvis antallet af prøver er få, og hvis der kun foretages enkelte indsamlinger. For de meget sjældne NIS – som kinesisk uldhåndskrabbe *Eriochir sinensis* og den amerikanske hummer *Homarus americanus*, der før er er gået uopdaget hen ved brug af qPCR, er der med ddPCR-detektion sporet flere detektioner af lave niveauer af eDNA (Figur 27).





**Figur 29.** Kortlægning af sammenligning af eDNA-molekyler målt med ddPCR (grøn) og qPCR (okkergul) for MST-vandprøverne indsamlet i første halvår (januar-juli) og i andet halvår (august-november) 2021, for detektionssystemerne: 'Caraur', 'Erisin', 'Homame', 'Myaare', 'Oncmyk', 'Promin', 'Psefar' og 'Psevar'. Forkortelser for de enkelte detektionssystemer er genbrugt fra Tabel 1 og 2. Størrelsen på pletterne kan ikke tolkes som et udtryk for biomasse eller individualantal for den pågældende NIS, da eDNA-niveaue ikke kan oversættes til hverken biomasse eller individer. Til gengæld er pletternes størrelser sammenlignelige for qPCR- og ddPCR-analyserne indenfor hvert enkelt kort. Centrum af pletterne er farvet i fht. 'limit of detection' (LOD) og 'limit of quantification' (LOQ), således at eDNA niveauer under LOD (bLD) er gule, mellem LOD og LOQ (aLDblQ) er orange, én replikat over LOQ (1aLQ) er rød og flere end én replikat over LOQ (aaLQ) er sorte.



**Figur 30.** Kortlægning af sammenligning af eDNA-molekyler målt med ddPCR (grøn) og qPCR (okkergul) for MST vandprøverne indsamlet i første (januar-juli) og andet halvår (august-november) 2021, for detektionssystemerne: 'Bonham', 'Calsap', 'Colper', 'Cragig', 'Hemsan', 'Hemtak', 'Karmik', 'Mnelei'. Forkortelser for detektionssystemer og fortolkning af punkter er tilsvarende som for Figur 29.

## 4 Diskussion

Ud af de 19 detektionssystemer, der her blev afprøvet i ddPCR-opsætningen og sammenholdt med qPCR-detektioner, vurderes det, at 17 artsspecifikke systemer ('Bonham', 'Calsap', 'Caraur', 'Colper', 'Corcas', 'Cragig', 'Erisin', 'Hemsan', 'Hemtak', 'Homame', 'Karmik', 'Mnelei', 'Myaare', 'Oncmyk', 'Promin', 'Psefar', og 'Psever') kan migreres direkte fra qPCR-plattform til ddPCR-plattform, med bedre chance for at detektere lave niveauer af de eftersøgte eDNA-fragmenter. Præcisionen i kvantificeringen af eDNA-molekyler er større ved brug af ddPCR, end hvad der umiddelbart kan måles med qPCR, hvilket kan ses i de mindre standardafvigelser for ddPCR ved høje DNA-koncentrationer (Figur 10-24). For lave koncentrationer af det eftersøgte eDNA-molekyle (< 1 kopi /  $\mu\text{L}$ ) er standardafvigelserne ved både qPCR og ddPCR relativt store, omend mindre for ddPCR i forhold til afvigelserne ved qPCR (Figur 10 - 24).

### 4.1 Koncentration af primer og probe og mulighed for optimering i ddPCR-opsætning

De to specifikke artssystemer, der ikke fungerer på ddPCR-plattform, er systemerne imod sortmundet kutling ('Neomel -co1') og nordamerikansk mudderkrabbe ('Rhihar'). Det artsspecifikke system imod sortmundet kutling (Neomel -co1) har allerede tidligere givet lave fluorescensniveauer på qPCR, men har på qPCR-plattform godt kunne detektere DNA fra sortmundet kutling så længe niveauerne af DNA fra sortmundet kutling er tilstrækkeligt høje – i koncentrationer på over 1000 DNA molekyler per  $\mu\text{L}$  tilsat ekstrakt. På ddPCR-plattform kan det artsspecifikke system imod sortmundet kutling ('Neomel-co1') ikke afgive tilstrækkelig kraftig fluorescens til at positive dråber kan skelnes fra negative dråber. Muligvis kan en mere detaljeret afprøvning af mange forskellige koncentrationsniveauer for primer og prober for 'Neomel -co1'-detektionssystemet hjælpe til at afklare om dette detektionssystem kan migreres over på ddPCR-plattform. For nærværende studie var det ikke muligt at udforske dette yderligere, da det ville kræve adskillige ekstra opsætninger af ddPCR med dette 'Neomel -co1'-assay, som der ikke var budgetteret med indledningsvis. Det artsspecifikke detektionssystem imod nordamerikansk mudderkrabbe ('Rhihar') har derimod ikke tidligere målt svage niveauer af fluorescens på qPCR-plattform. Optimering af slutkoncentrationerne af probe og primer på ddPCR-plattform for disse detektionssystemer kan muligvis føre til at de også kan migreres over til ddPCR-plattform. Den korte afprøvning af forskellige slutkoncentrationer, der her blev gjort for de fire detektionssystemer ('Bonham', 'Myaare', 'Oncgor' og 'Promin') (Figur 2 - 4), kan ikke bruges som detaljerede vurderinger for optimale primer- og probe koncentrationer for alle de andre detektionssystemer. Denne indledende afprøvning var begrænset til kun at omfatte fire velfungerende detektionssystemer, og var kun tiltænkt som en afprøvning af om dette eventuelt kunne resultere i voldsomme forandringer i målte eDNA-niveauer når der benyttes forskellige platforme. De umiddelbare resultater fra denne sammenligning (Figur 2 - 4) gav dog ikke indtryk af at dette var en væsentlig faktor. Men dette lader så ikke til at være gældende for detektionssystemerne 'Rhihar' og 'Neomel-co1'. Det er meget sandsynligt at hvert enkelt detektionssystem hver især har en unik slutkoncentration, der er mere optimal på ddPCR-plattform for både primer- og probe. Det er sandsynligt at disse optimale slutkoncentrationer ligger i nærheden af hvad der fungerer optimalt på qPCR-plattform, men det er ikke givet. Det vil umiddelbart kræve afprøvning af flere forskellige kombinationer af koncentrationer for hvert enkelt detektionssystem, hvilket er udover hvad der var mulighed for i dette projekt. Optimering af detektionssystemer for ddPCR-plattform kan også indbefatte justering af tærskelværdier (Gerdes et al., 2016), denatureringstid og ekstentionstid i PCR (Witte et al., 2016), eller justering af temperaturen for binding af primerne til det eftersøgte eDNA i 'annealing'-fasen (Lievens et al., 2016). Alternativt, kan

et andet detektionssystem imod sortmundet kutling tages i brug. I nærværende studie blev et ekstra artsspecifikt detektionssystem imod sortmundet kutling (Neomel -cytb) afprøvet, og eftervist som fungerende på en fortyndingsrække af positive kontroller, omend med lav fluorescens emission, der er vanskelige at skelne fra qPCR-maskinens baggrundsemmission fra referencefluorescensen. At udskifte et artsspecifikt detektionssystem, bør dog samkøres med tidligere eDNA-detektioner udført med qPCR, inden et sådant skifte gennemføres for et igangværende overvågningsprogram.

## 4.2 Volumen af ekstraktion og positive kontroller i ddPCR-opsætning

På trods af, at der er en stærk sammenhæng mellem positive kontroller benyttet i qPCR og ddPCR er nogle detektionssystemer ('Bonham', 'Calsap', 'Cragig', 'Hemsan', 'Hemtak') ikke i stand til at give positive detektioner af eDNA for de samme vandprøver på ddPCR, som ellers blev registreret på qPCR. Dette kan tilskrives at det eftersøgte eDNA-molekyle er til stede i så lav en koncentration i ekstraktionen fra vandprøven, at det vil være tilfældigt om et enkelt molekyle bringes med over ved tilsætning af ekstraktionen til enten qPCR eller ddPCR opsætningen. Hvis det eftersøgte eDNA-molekyle f.eks., kun er til stede i en koncentration på 0,1 kopi/  $\mu\text{L}$ , vil det være nødvendigt at pipettere 10  $\mu\text{L}$  over i qPCR eller ddPCR opsætningen, for at forbedre sandsynligheden for at kunne spore eDNA molekylet. Med tre tekniske replikater udført per qPCR, der hver især fik tilsæt 3  $\mu\text{L}$  ekstrakt, blev der altså testet på i alt 9  $\mu\text{L}$  fordelt over tre reaktioner. Med ddPCR blev der testet på 5  $\mu\text{L}$  ekstrakt per vandprøve. At der med qPCR ikke detekteres eDNA for nogle ekstraktioner, mens der for de samme ekstraktioner med ddPCR godt kan detekteres eDNA, må for de meget lave koncentration (under LOQ) tilskrives tilfældigheder ved pipettering af så lave koncentration. Med kun 1 kopi per 10  $\mu\text{L}$  eller tyndere koncentrationer er det tilfældigt om de første 9  $\mu\text{L}$ , der bruges i qPCR, indeholder det eftersøgte eDNA, og det er lige så tilfældigt om de næste 5  $\mu\text{L}$  brugt i ddPCR indeholder det eftersøgte eDNA. Dette understreger også at eftersøgning af eDNA er underlagt almindelig stokastisk variation, der nødvendiggør mange prøver og mange analyser, hvis niveauet af eDNA er lavt, og der ønskes en mere præcis vurdering af hvor lavt niveauet af eDNA er. Det svarer til at lave almindelig monitorering, hvor sjældne arter ikke kan forventes at blive indsamlet ved kun at udføre nogle enkelte indsamlinger. Gentagende indsamlinger over længere tid vil øge præcisionen i en traditionel overvågning. Eftersøgning af eDNA adskiller sig i princippet ikke fra en sådan konventionel overvågning, og for de sjældne arter må det derfor også forventes at der vil være variation i analyserne når koncentrationen af eDNA er lille i vandprøverne. For de lineære regressionsmodeller (Tabel 3) er der god overensstemmelse mellem eDNA-niveauerne målt med de to platforme, så længe eDNA-niveauet er over LOQ. For niveauer under LOQ er sammenhængen ikke så god, men det hænger sammen med tilfældigheden forbundet med pipettering af så tynde koncentrationer af eDNA som i eksemplet ovenover.

## 4.3 Fortyndingsrække og eDNA-kategorier i ddPCR-opsætning

Standardafvigelse omkring målte eDNA-koncentration er mindre på målinger udført med ddPCR end på qPCR (Figur 10-26), hvilket kan forklares ud fra de tusinde tekniske replikater, der udføres med ddPCR igennem analyse af de enkelte dråber. Med ddPCR var der også flere lave niveauer af eftersøgt eDNA, der bliver registreret, men som var blevet overset af qPCR. Det betyder, at der med ddPCR-plattform er en tendens til at kunne detektere flere potentielle 'gule og orange' kategorier – altså eDNA-niveauer, der henholdsvis er under 'limit of detection' (LOD) og eDNA-niveauer, og er under 'limit of quantification' (LOQ) (Knudsen et al., 2020a), i forhold til hvad der kan registreres på qPCR-plattform. Med flere 'gule' og 'orange' kategorier eftervist på ddPCR, er der altså bedre mulighed for at få indikeret svage niveauer af eftersøgt eDNA med ddPCR, end der er med qPCR.

For eDNA-niveauer over LOQ – som registreres som 'sorte' og 'røde' kategorier (Figur 28 - 29) (Knudsen et al., 2022) - er der god overensstemmelse mellem eDNA-niveauerne målt på qPCR- og på ddPCR platform (Figur 26). Det kan tolkes som at ddPCR er lige så god til at detektere eDNA som en qPCR platform er det.

For eDNA-niveauer, der på qPCR er høje og over LOQ er det med ddPCR muligt at detektere de samme niveauer, men med mindre standardafvigelser. Det betyder, at 'røde' og 'sorte' kategorier på qPCR – henholdsvis et af tre replikater over LOQ, og alle tre replikater over LOQ – med ddPCR bliver vurderet mere præcist.

#### **4.4 MST-vandprøver i ddPCR og sammenligning med qPCR**

For de tusindvis af tekniske replikater i ddPCR bliver lavet i samme reaktionsrør, mens hvert teknisk replikat i en qPCR-opsætning vil kræve deres eget reaktionsrør, vil tre tekniske replikater i qPCR-opsætning kræve tre gange så mange reaktionsrør, som det vil kræve at udføre tilsvarende analyse på ddPCR med tusindvis af tekniske replikater. Både ddPCR- og qPCR-opsætning involverer plader med 96 reaktionsrør. Skal op imod hundrede vandprøver analyseres med qPCR, vil det kræve op imod fire plader, hvis ikke flere, fordi der også skal inkluderes positive kontroller - for at lave tre replikater per analyse af en vandprøve. En tilsvarende analyse med ddPCR – med tusindvis af replikater per reaktionsrør – vil kunne sættes op på to plader. Selvom der er mere arbejdstid forbundet med at lave tusindvis af dråber med 'droplet generator', er det alligevel mindre arbejdstid der bruges på at lave dråber, end hvad det kræver at sætte fire plader op med analyser på qPCR-platform. For opsætning af tre eller flere plader på qPCR (hvilket vil være nødvendigt for tre eller flere replikater) kræver det op imod tre eller flere arbejdstimer. En enkelt ddPCR-plade (som kan svare til de tre tekniske replikater i qPCR) vil kræve omtrent to timers arbejdstid at sætte op. En enkelt plade kan analyseres på to timer i ddPCR og analyse af en enkelt plade på qPCR kræver også to timer. Begge platforme udfører selvstændigt analysen, men det kræver manuel håndtering at isætte nye plader i qPCR-maskinen. Med tre plader for analyse i qPCR vil det derfor kræve mere arbejdstid at isætte tre plader for analyse over seks timer, mens tilsvarende analyse af hundrede vandprøver i ddPCR kan klares på to plader, og mindre arbejdstid.

## 5 Konklusion og anbefalinger

Med ddPCR kan der detekteres meget lave niveauer af eDNA i vandprøver, hvor qPCR-platformen for de samme lave niveauer ikke kan detektere noget.

Hovedparten af de artsspecifikke detektionssystemer kan migreres direkte fra qPCR-platform over til ddPCR-platform, uden videre optimering eller justering. Dette er især gældende for de detektionssystemer, der kan detektere eDNA fra NIS-arter, der er vidt udbredte såsom den amerikanske ribbegoble, sandmusling, de heterokonte flagellater *Pseudochatonella* spp. og dinoflagellatten *Karenia mikimotoi*.

Fortyndingsserien af positive kontroller (STD) efterviser, at 17 ud af 19 afprøvede artsspecifikke detektionssystemer også kan fungere på ddPCR-platform, såfremt der er tilstrækkeligt høje niveauer af eDNA til stede fra den pågældende art som platformen kan detektere på.

For de artsspecifikke detektionssystemer, hvor den pågældende NIS i forvejen er yderst sjælden eller vanskelig at detektere, kan ddPCR øge muligheden for at detektere eDNA'et.

Nærværende forsøg indikerer dog, at der er mulighed for yderligere optimering på præcisionen i ddPCR-opsætningen for disse detektionssystemer. En anbefaling for videre forsøg med ddPCR må være, at de enkelte artsspecifikke detektionssystemer optimeres til ddPCR-platform, førend de implementeres, som erstatning for qPCR.

Yderligere justeringer må forventes at være nødvendig for disse detektionssystemer for at finde optimale slutkoncentrationer på ddPCR-platform. Især for hvad angår detektionssystemerne imod sortmundet kutling og nordamerikansk mudderkrabbe.

De lineære regressionsmodeller, for sammenhænge mellem ddPCR- og qPCR-målinger af eDNA-niveauerne, viser at ddPCR er i stand til at levere samme følsomhed for eDNA, og kan registrere de samme niveauer som qPCR. Fordi opsætning af ddPCR kræver mindre arbejdstid i forhold hvad det kræver at lave mange tekniske replikater i laboratoriet med qPCR, er ddPCR en fordel for hurtigere eftersøgning efter eDNA fra NIS-arter.

Med ddPCR kan der således spares arbejdstid, i forhold til hvis der skal detekteres eDNA i mange prøver med qPCR i mange tekniske replikater. Da arbejdstiden kan nedsættes, er ddPCR med en præcision og følsomhed der overgår qPCR, at foretrække som en mindre udgiftspost, hvad angår arbejdstid. For de 17 afprøvede detektionssystemer er ddPCR demonstreret som værende mere præcis end qPCR, og anbefalingen er derfor at der for fremtidig detektion af marine NIS skiftes til at gøre brug af ddPCR for analyse af eDNA i vandprøver.

## 6 Referencer

- Agersnap, S., Larsen, W.B., Knudsen, S.W., Strand, D., Thomsen, P.F., Hesselsøe, M., Mortensen, P.B., Vrålstad, T. & Møller, P.R. (2017): Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS One* 12: e0179261.
- Agersnap, S., Sigsgaard, E.E., Jensen, M.R., Avila, M.De P., Carl, H., Møller, P.R., Krøns, S.L., Knudsen, S.W., Wisz, M.S. & Thomsen, P.F. (2022): A national scale “BioBlitz” using citizen science and eDNA metabarcoding for monitoring coastal marine fish. *Frontiers in Marine Science* 9: <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.824100>
- Andersen, J.H., Kallenbach, E., Thaulow, J., Hesselsøe, M., Bekkevold, D., Hansen, B.K., Jacobsen, L.M.W., Olesen, C.Aa., Møller, P.R. & Knudsen, S.W. (2018): Development of species-specific eDNA-based test systems, for monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters, NIVA report 7204-2017. <https://niva.brage.unit.no/niva-xmlui/handle/11250/2573117>
- Andersen, J.H., Kallenbach, E., Kjeldgaard, M.B., Knudsen, S.W., Eikrem, W., Fagerli, C., Oug, E., Dahle, T., Thaulow, J., Gitmark, J., Hobæk, A., Green, N., Hesselsøe, M., Støttrup, J., Kuhn, J., Bekkevold, D., Jacobsen, L.M.W., Møller, P.R., Olesen, C.Aa. Carl, H. & Stuer-Lauridsen, F. (2022): A baseline study of the occurrence of non-indigenous species in Danish harbours. NIVA report 7769-2022. <https://niva.brage.unit.no/niva-xmlui/handle/11250/3024342>
- Baker, C.S., Steel, D., Nieu Kirk, S. & Klinck, H. (2018): Environmental DNA (eDNA) From the wake of the whales: droplet digital PCR for detection and species identification. *Frontiers in Marine Science* 5: 133. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00133>
- Capo, E., Spong, G., Koizumi, S., Puts, I., Olajos, F., Königsson, H., Karlsson, J. & Byström, P. (2021): Droplet digital PCR applied to environmental DNA, a promising method to estimate fish population abundance from humic-rich aquatic ecosystem. *Environmental DNA* 3: 343–352.
- Doi H., Uchii K., Takahara T., Matsuhashi S., Yamanaka H. & Minamoto T. (2015): Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys. *PLoS ONE* 10: e0122763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122763>
- Gerdes, L., Iwobi, A., Busch, U. & Pecoraro, S. (2016): Optimization of digital droplet polymerase chain reaction for quantification of genetically modified organisms. *Biomolecular detection and quantification* 7: 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.12.003>
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P. W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., & Colston, B.W. (2011): High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry* 83: 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
- Inkscape Project (2020): *Inkscape*. Retrieved from <https://inkscape.org>
- Kibbe, W.A. (2007): OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research* 35: 43–46. doi: 10.1093/nar/gkm234. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059520>
- Knudsen, S.W., Andersen, J.H., Bekkevold, D., Hesselsøe, M., Jensen, S.K.S. & Møller, P.R. (2020a): Tekniske anvisninger for eDNA-baseret overvågning af ikke-hjemmehørende marine arter. (NIVA-rapport 7455). Norsk institutt for vannforskning. <http://hdl.handle.net/11250/2644551>
- Knudsen, S.W., Andersen, J.H., & Møller, P.R. (2020b): Development of species-specific eDNA-based test systems for monitoring of non-indigenous Decapoda in Danish marine waters. (NIVA-rapport 7544). Norsk institutt for vannforskning. <https://hdl.handle.net/11250/2689446>

- Knudsen, S.W., Ebert, R.B., Mortensen, P.B., Kuntke, F., Hesselsøe, M., Hassingboe, J., Thomsen, P.F., Sigsgaard, E.E., Egg, E. & Møller, P.R. (2019): Species-specific detection of six commercially important marine fishes in the Baltic Sea using environmental DNA. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 510: 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.09.004>
- Knudsen, S.W., Hesselsøe, M., Thaulow, J., Agersnap, S., Hansen, B.K., Jacobsen, M.W., Bekkevold, D., Jensen, S.K.S., Møller, P.R. & Andersen, J.H. (2022): Monitoring of environmental DNA from nonindigenous species of algae, dinoflagellates and animals in the North East Atlantic. *Science of The Total Environment* 821: 153093, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153093>
- Lievens, A., Jacchia, S., Kagkli, D., Savini, C., & Querci, M. (2016): Measuring Digital PCR Quality: Performance Parameters and Their Optimization. *PloS ONE* 11: e0153317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153317>
- Mauvisseau, Q., Davy-Bowker, J., Bulling, M., Brys, R., Neyrinck, S., Troth, C., & Sweet, M. (2019): Combining ddPCR and environmental DNA to improve detection capabilities of a critically endangered freshwater invertebrate. *Scientific reports* 9: 14064. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50571-9>
- R Core Team (2022). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Sigsgaard, E.E., Carl, H., Møller, P.R. & Thomsen, P.F. (2015): Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation* 183: 46–52.
- Spens, J., Evans, A.R., Halfmaerten, D., Knudsen, S.W., Sengupta, M.E., Mak, S.S.T., Sigsgaard, E.E. & Hellström, M. (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: 635–645. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12683>
- Taylor, S.C., Laperriere, G. & Germain, H. (2017): Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Scientific reports* 7: 2409. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x>
- Witte, A.K., Mester, P., Fister, S., Witte, M., Schoder, D. & Rossmann, P. (2016): A systematic investigation of parameters influencing droplet rain in the *Listeria monocytogenes* prfA assay - reduction of ambiguous results in ddPCR. *PloS ONE* 11: e0168179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168179>
- Wood, S.A., Pochon, X., Laroche, O., von Ammon, U., Adamson, J. & Zaiko, A. (2019): A comparison of droplet digital polymerase chain reaction (PCR), quantitative PCR and metabarcoding for species-specific detection in environmental DNA. *Molecular Ecology Resources* 19: 1407–1419. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13055>



## Bilag A

**Tabel A1.** Vandprøver indsamlet af Miljøstyrelsen (MST) i 2021. Med indsamlingsdato (Inds dato), position for længde- og breddegrad, maksimum dybe til bunden hvor vandprøven blev indsamlet, og den rent faktiske dybe hvor vandprøven blev hentet fra (Vand hent dybde), og volumen af vand der blev filtreret (Vol vand filt.)

Vand prøve nummer	Inds dato	Position breddegrad	Position længdegrad	Max dybde (m)	Vand hent dybde (m)	Vol. Vand filt. (mL)
MST1020	2021-03-19	55.03	10.37	165	155	1500
MST1022	2021-05-17	56.15	10.32	162	1	1100
MST1024	2021-04-15	56.60	8.40	6	5	1500
MST1027	2021-03-19	55.03	10.37	165	155	1500
MST1028	2021-03-15	54.83	9.82	292	282	1600
MST1030	2021-04-15	56.60	8.40	6	5	1400
MST1031	2021-03-17	55.87	11.78	105	89	1500
MST1032	2021-03-15	54.83	9.82	292	282	1550
MST1033	2021-03-15	54.83	9.82	292	282	1550
MST1036	2021-05-17	56.13	11.15	48	1	1500
MST1037	2021-03-17	55.87	11.78	105	89	1500
MST1038	2021-04-14	55.14	11.50	121	111	1700
MST1039	2021-04-26	56.08	8.22	32	1	570
MST1041	2021-04-14	55.14	11.50	121	111	1700
MST1043	2021-04-06	56.63	10.32	12	11	1500
MST1045	2021-04-06	56.63	10.32	12	11	1600
MST1048	2021-04-26	56.08	8.22	32	1	580
MST1054	2021-05-18	55.00	13.30	48	1	1400
MST1055	2021-05-18	55.00	13.30	48	1	1600
MST1060	2021-05-19	55.87	12.75	55	1	1301
MST2021002	2021-07-07	55.16	11.64	67	57	1000
MST2021003	2021-08-25	55.71	12.04	48	1	1750
MST2021005	2021-06-01	55.71	12.04	48	1	1600
MST2021006	2021-08-24	54.74	12.09	106	96	1400
MST2021008	2021-05-19	55.87	12.75	55	1	1300
MST2021011	2021-08-31	54.73	11.08	51	-	1500
MST2021012	2021-04-27	55.70	9.66	69	59	1500
MST2021013	2021-08-25	55.71	12.04	48	1	1600
MST2021014	2021-05-19	55.34	8.35	55	1	1250
MST2021015	2021-09-02	56.08	8.22	32	1	925
MST2021017	2021-04-27	55.70	9.66	69	59	1500
MST2021018	2021-06-10	55.03	15.51	39	28	1600
MST2021019	2021-05-25	56.86	10.78	146	1	1650
MST2021020	2021-06-01	55.71	12.04	48	1	1600
MST2021021	2021-05-07	56.66	9.97	27	1	1800
MST2021023	2021-07-07	55.16	11.64	67	57	1000
MST2021025	2021-06-10	55.03	15.51	39	28	1750
MST2021026	2021-08-24	54.74	12.09	106	96	1400
MST2021027	2021-05-11	55.67	10.08	21	1	1150
MST2021028	2021-09-27	57.61	9.90	18	-	1200
MST2021029	2021-09-07	55.86	12.73	501	1	1800
MST2021030	2021-05-26	56.62	9.07	5	1	1600
MST2021031	2021-06-17	57.61	9.90	15	4	1200
MST2021032	2021-06-23	57.54	10.47	4	3	1400

---

MST2021033	2021-08-31	54.73	11.08	51		1500
MST2021034	2021-05-26	56.62	9.07	5	1	1800
MST2021035	2021-09-15	56.44	10.95	11	95	1270
MST2021036	2021-09-02	56.08	8.22	32	1	950
MST2021037	2021-06-17	57.61	9.90	15	4	1200
MST2021039	2021-05-07	56.66	9.97	27	1	1800
MST2021040	2021-09-15	56.44	10.95	11	95	1270
MST2021042	2021-09-27	57.61	9.90	18	-	1200
MST2021043	2021-05-17	56.13	11.15	48	1	1500
MST2021044	2021-05-19	55.34	8.35	55	1	1200
MST2021045	2021-06-23	57.54	10.47	4	3	1600
MST2021048	2021-05-21	55.09	8.57	11	10	500
MST2021049	2021-05-21	55.09	8.57	11	10	500
MST2021051	2021-06-04	56.95	9.07	7	1	1700
MST2021052	2021-06-14	0.00	0.00	84	1	610
MST2021053	2021-05-17	56.15	10.32	162	1	1000
MST2021054	2021-05-25	56.86	10.78	146	1	1700
MST2021055	2021-09-14	55.25	15.98	909	1	1500
MST2021056	2021-09-14	55.25	15.98	909	1	1650
MST2021058	2021-08-30	55.67	10.08	194	1	1500
MST2021061	2021-06-17	56.56	12.89	35	-	1500
MST2021062	2021-05-21	55.00	10.17	361	1	1400
MST2021063	2021-06-14	0.00	0.00	84	1	700
MST2021064	2021-09-02	56.95	9.05	76	1	700
MST2021065	2021-08-24	56.15	10.32	16	1	1500
MST2021066	2021-09-06	56.62	9.07	51	1	1100
MST2021067	2021-09-02	55.00	13.30	457	1	1800
MST2021069	2021-09-20	55.34	8.35	63	1	1400
MST2021070	2021-10-26	56.66	9.97	28	1	1200
MST2021071	2021-10-13	55.48	10.52	98	1	1500
MST2021072	2021-10-26	56.66	9.97	28	1	1250
MST2021073	2021-10-22	55.00	10.15	34	1	1600
MST2021074	2021-06-17	56.56	12.89	35	-	1500
MST2021075	2021-05-11	55.67	10.08	21	1	1100
MST2021076	2021-09-02	55.00	13.30	457	1	1800
MST2021077	2021-10-13	55.48	10.52	98	1	1600
MST2021078	2021-06-04	56.95	9.07	7	1	1550
MST2021079	2021-09-06	56.62	9.07	51	1	1100
MST2021081	2021-09-20	55.34	8.35	63	1	1300
MST2021082	2021-09-07	56.86	10.78	146	1	1500
MST2021083	2021-10-22	55.00	10.15	34	1	1500
MST2021085	2021-09-16	56.13	11.15	439	1	1700
MST2021086	2021-09-16	56.13	11.15	439	1	1700
MST2021087	2021-05-21	55.00	10.17	361	1	1500
MST2021088	2021-05-20	55.44	10.83	198	188	1600
MST2021089	2021-05-17	56.21	10.60	14	13	1400
MST2021092	2021-09-02	56.95	9.05	76	1	700
MST2021094	2021-05-20	55.44	10.83	198	188	1500
MST2021095	2021-09-07	56.86	10.78	146	1	1450
MST2021097	2021-08-30	55.67	10.08	194	1	1500
MST2021099	2021-08-24	56.15	10.32	16	1	1500
MST2021100	2021-05-17	56.21	10.60	14	13	1500

---

## Bilag B

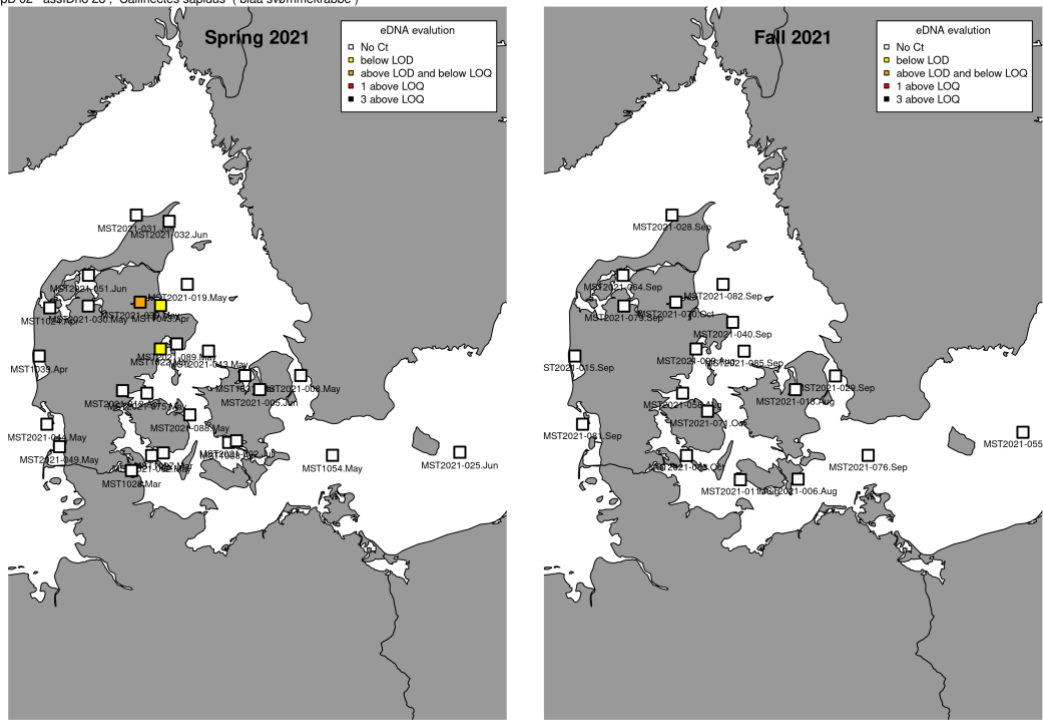
Kortlægning af eDNA-niveauer målt med qPCR for forår og efterår i 2021.

Farvekoder på indsamlingslokaliteterne efter hvor højt et niveau af eDNA, der blev registreret per qPCR. Farveskalaen går fra hvid til gul til orange til rød og til sort. Hvid og gul angiver ingen eller svage forekomster af eDNA, mens rød og sort er høje forekomster af eDNA.



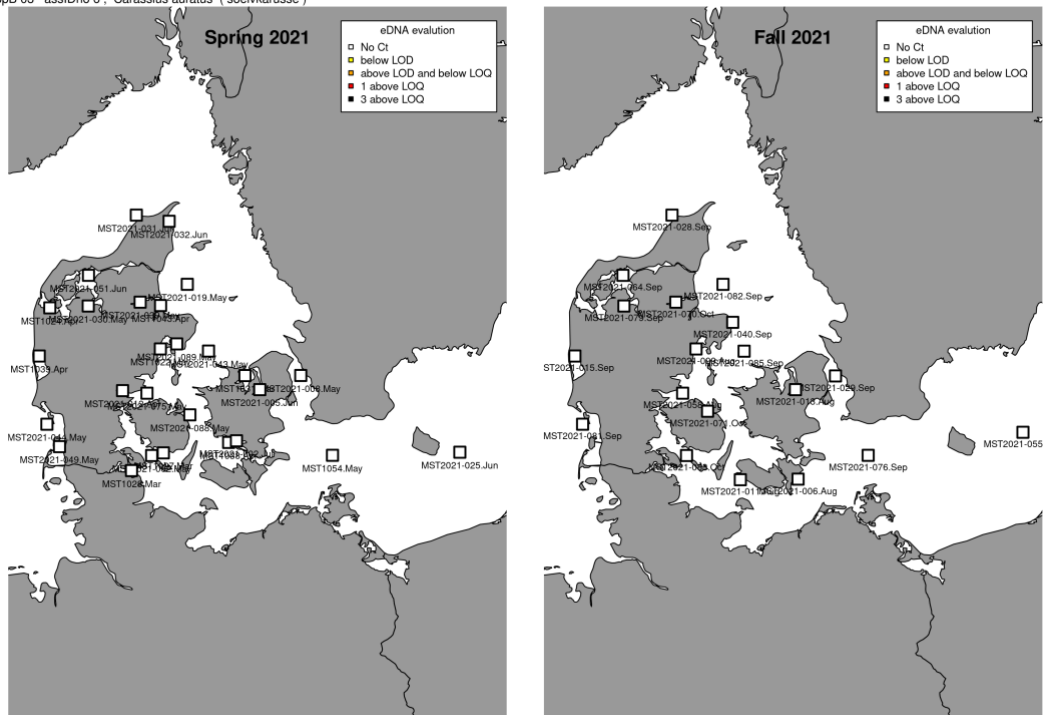
**Figur B1.** Kortlægning af eDNA-niveauer for rødtotalge – *Bonnemaisonia hamifera*.

AppB 02 assiDno 28 , *Callinectes sapidus* ( blå svømmekrabbe )



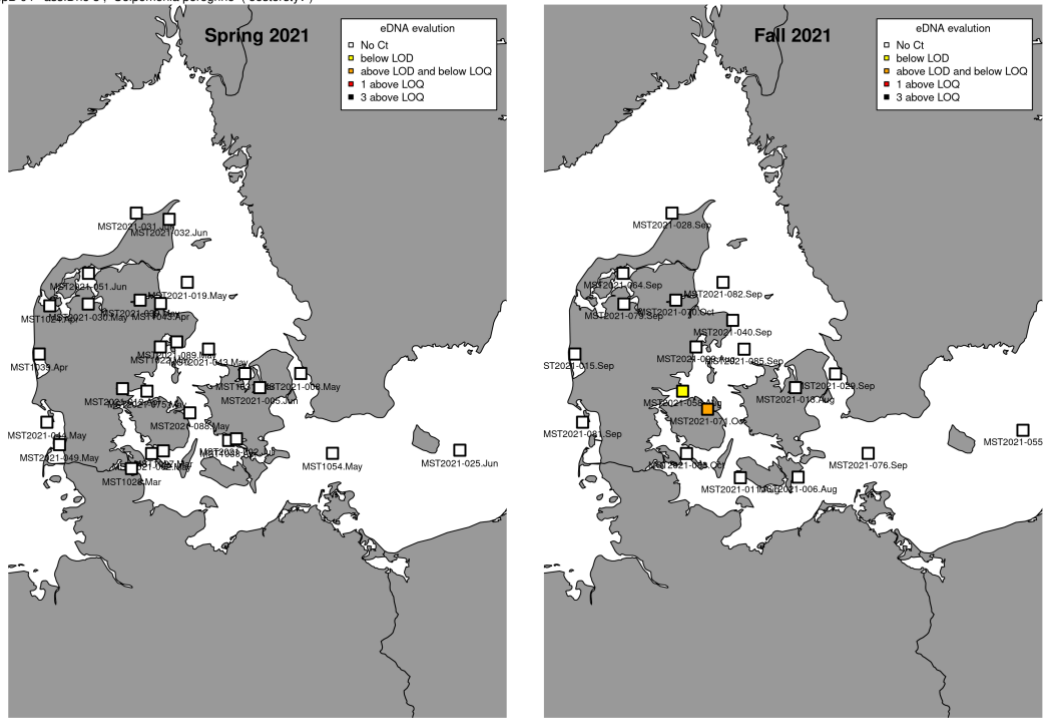
**Figur B2.** Kortlægning af eDNA-niveauer for blå svømmekrabbe – *Callinectes sapidus*.

AppB 03 assiDno 6 , *Carassius auratus* ( sølvkarusse )



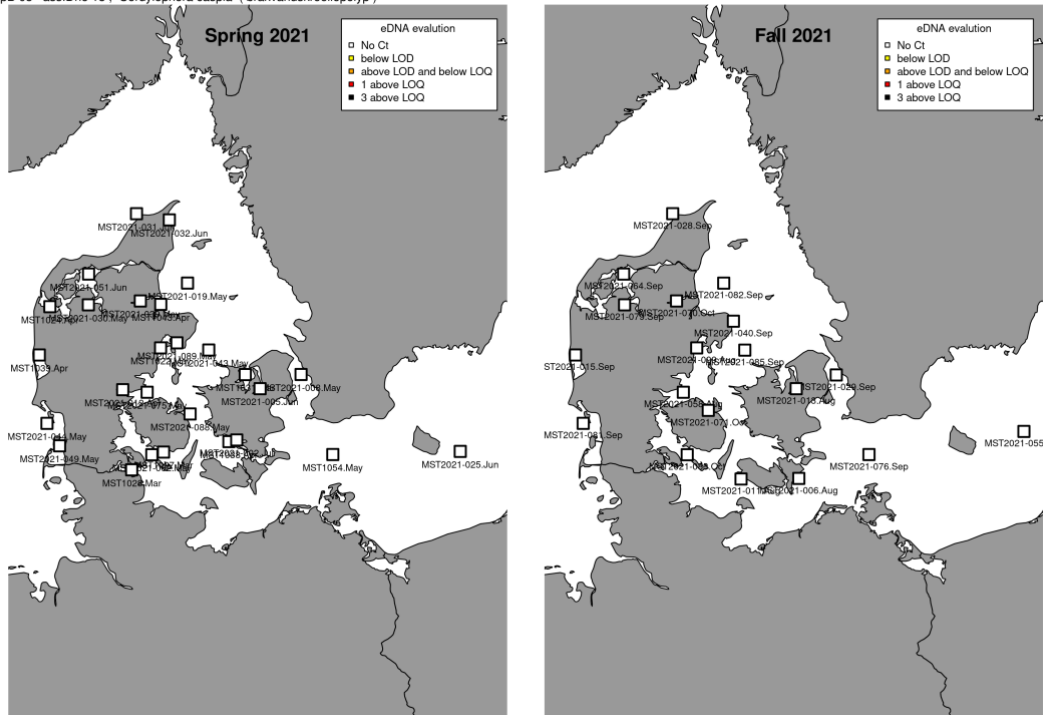
**Figur B3.** Kortlægning af eDNA-niveauer for sølvkarusse – *Carassius auratus*.

AppB 04 assiDno 8 , *Colpomenia peregrine* ( østerstytv )



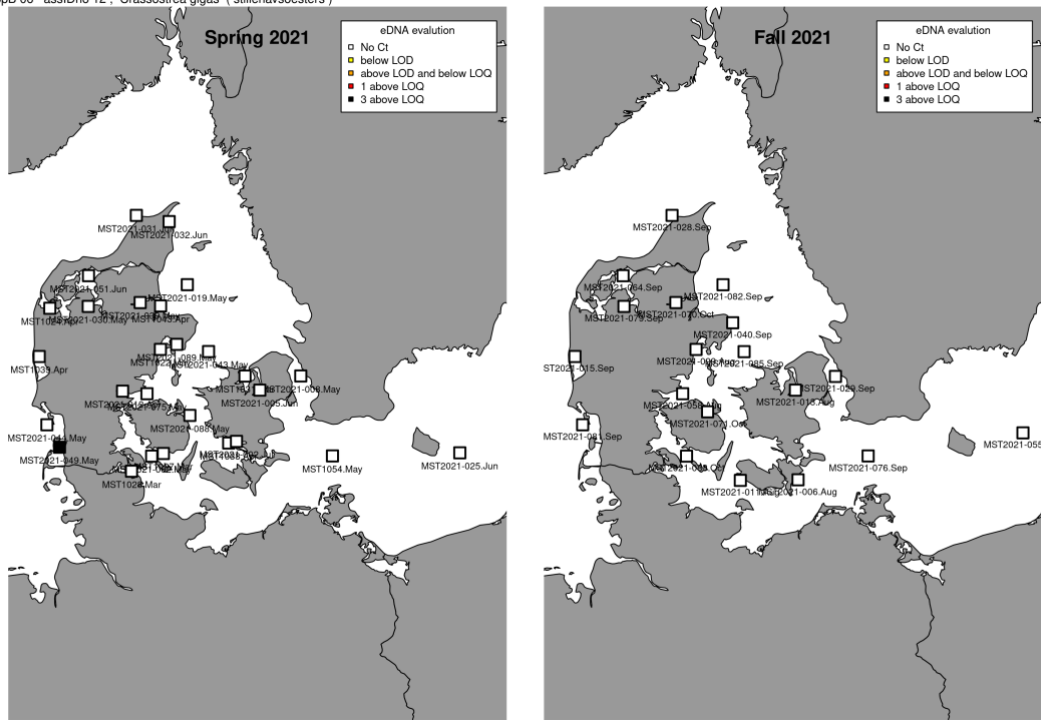
**Figur B4.** Kortlægning af eDNA-niveauer for østerstytv – *Colpomenia peregrine*.

AppB 05 assiDno 18 , *Cordylophora caspia* ( brakvandskroelleepolyp )



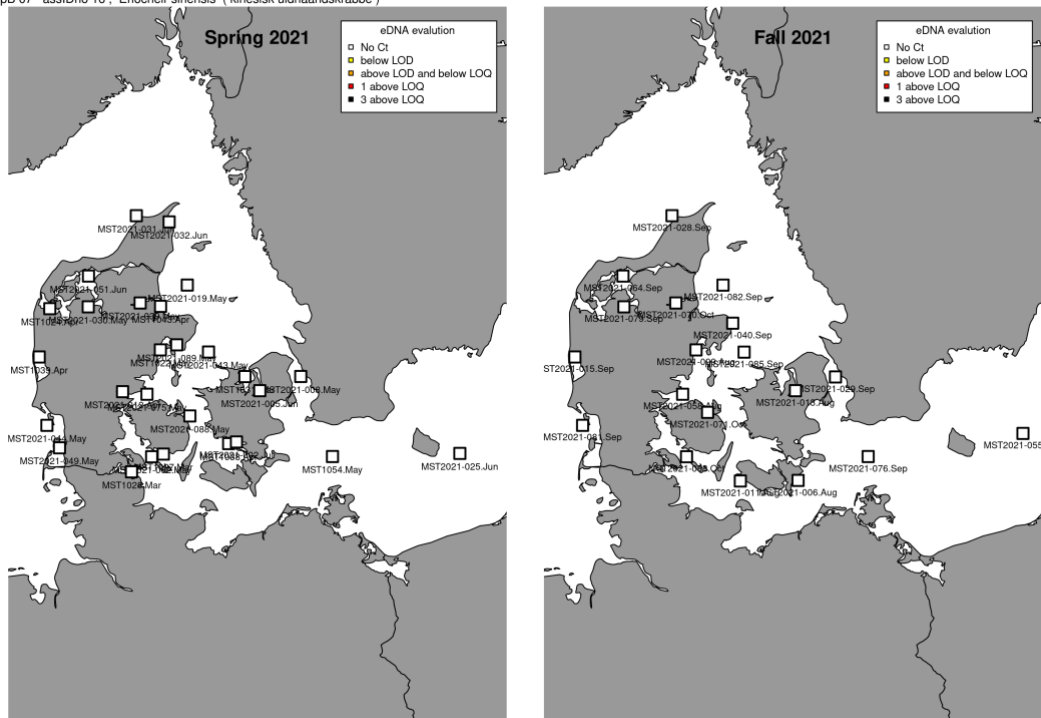
**Figur B5.** Kortlægning af eDNA-niveauer for brakvandskroelleepolyp – *Cordylophora caspia*.

AppB 06 assiDno 12 , *Crassostrea gigas* ( stillehavsoesters )



Figur B6. Kortlægning af eDNA-niveauer for stillehavsoesters – *Crassostrea gigas*.

AppB 07 assiDno 16 , *Eriocheir sinensis* ( kinesisk uldhandskrabbe )



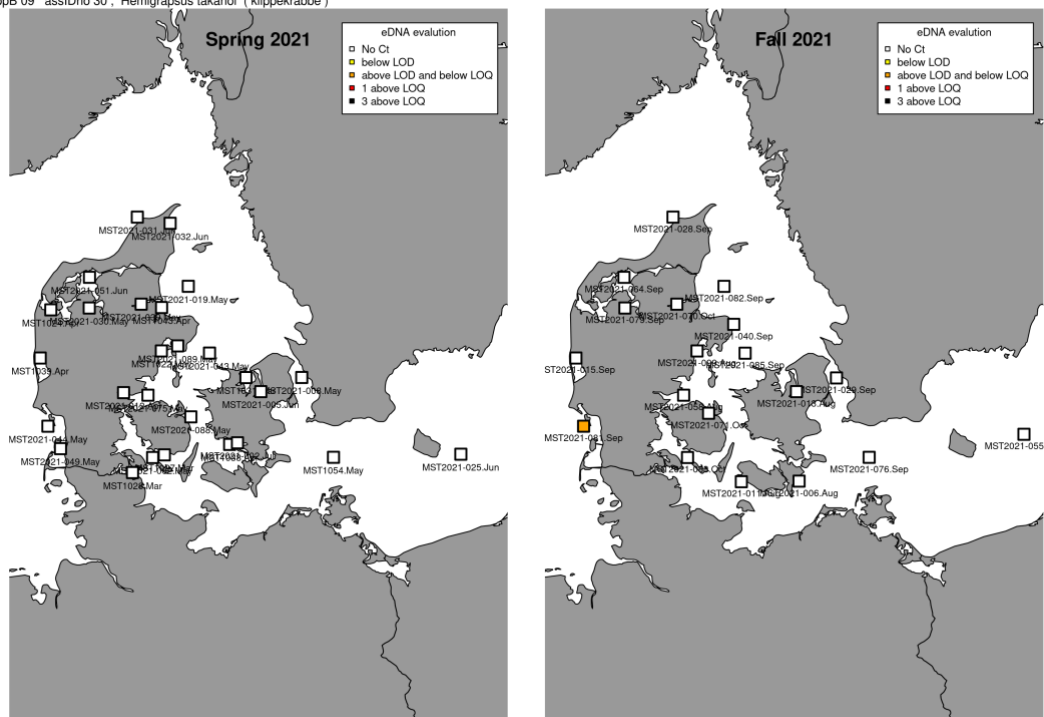
Figur B7. Kortlægning af eDNA-niveauer for kinesisk uldhandskrabbe – *Eriocheir sinensis*.

AppB 08 assiDno 29 , Hemigrapsus sanguineus ( pensel klippekrebbe )



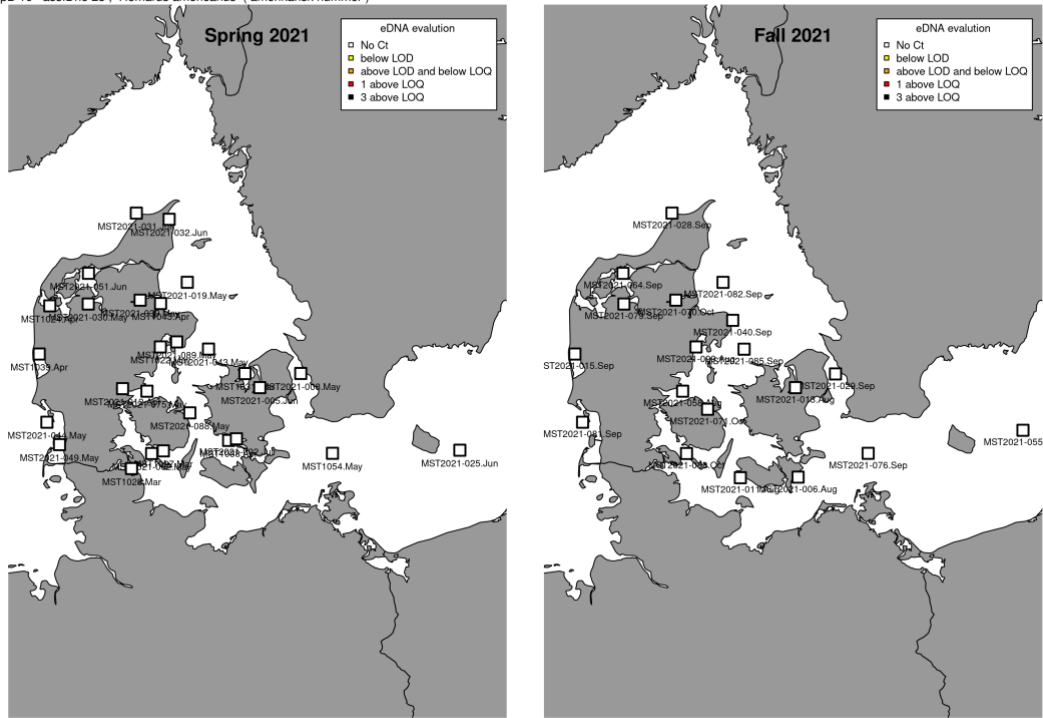
Figur B8. Kortlægning af eDNA-niveauer for pensel klippekrebbe – *Hemigrapsus sanguineus*.

AppB 09 assiDno 30 , Hemigrapsus takanoi ( klippekrebbe )



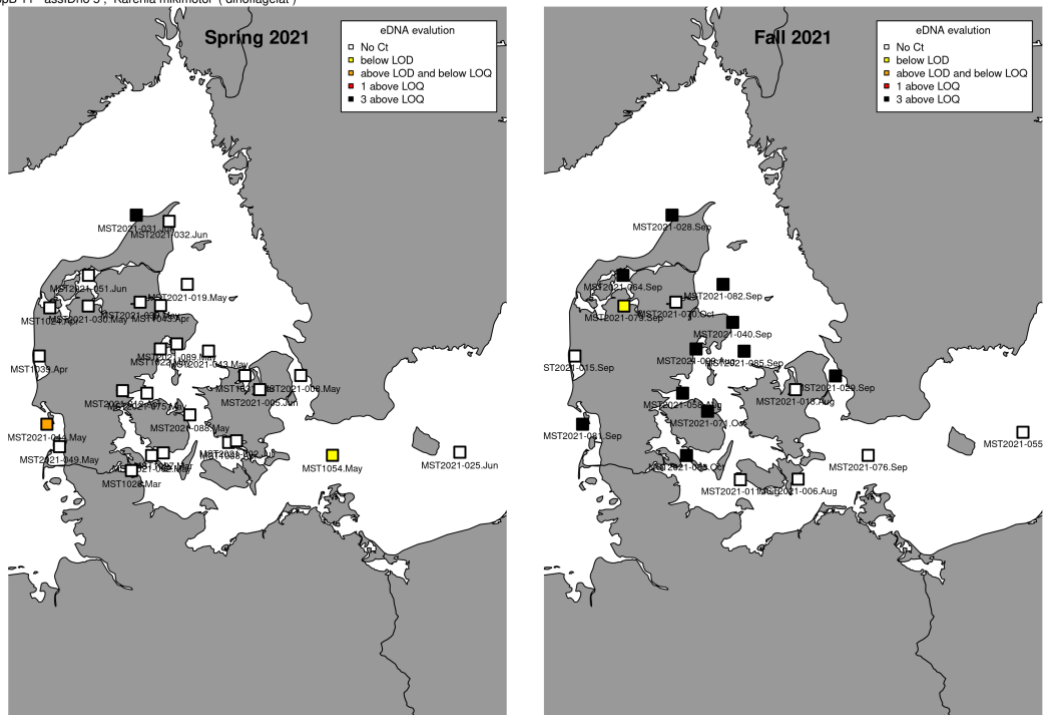
Figur B9. Kortlægning af eDNA-niveauer for klippekrebbe – *Hemigrapsus takanoi*.

AppB 10 assiDno 25, *Homarus americanus* (amerikansk hummer)



Figur B10. Kortlægning af eDNA-niveauer for den amerikansk hummer – *Homarus americanus*.

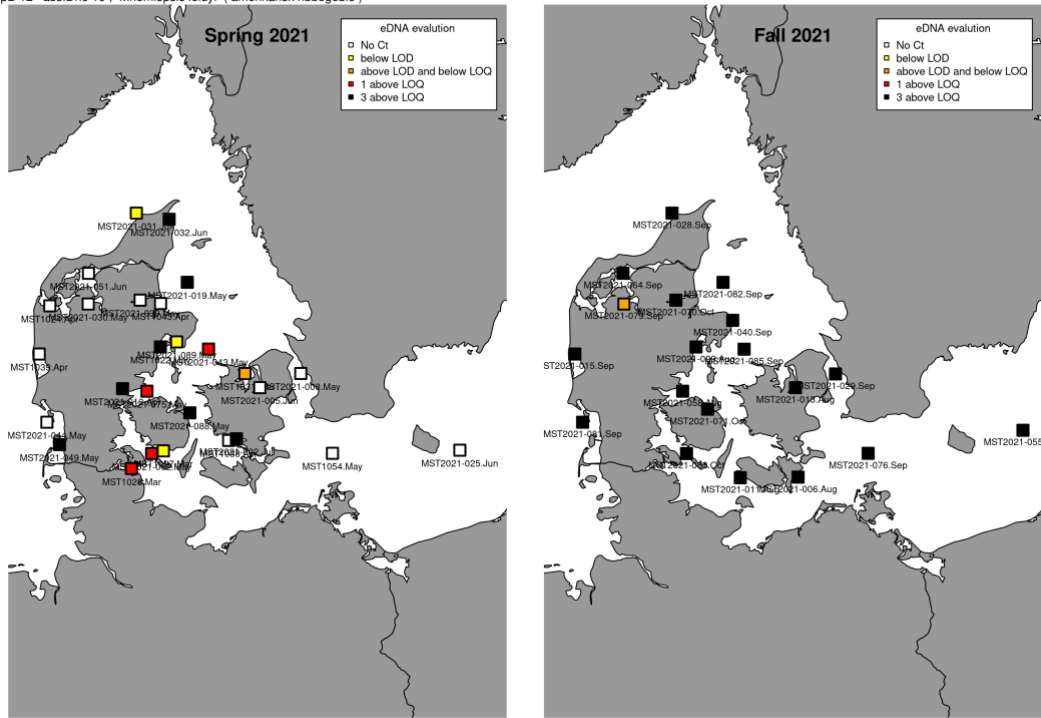
AppB 11 assiDno 5, *Karenia mikimotoi* (dinoflagelat)



Figur B11. Kortlægning af eDNA-niveauer for dinoflagellaten – *Karenia mikimotoi*.

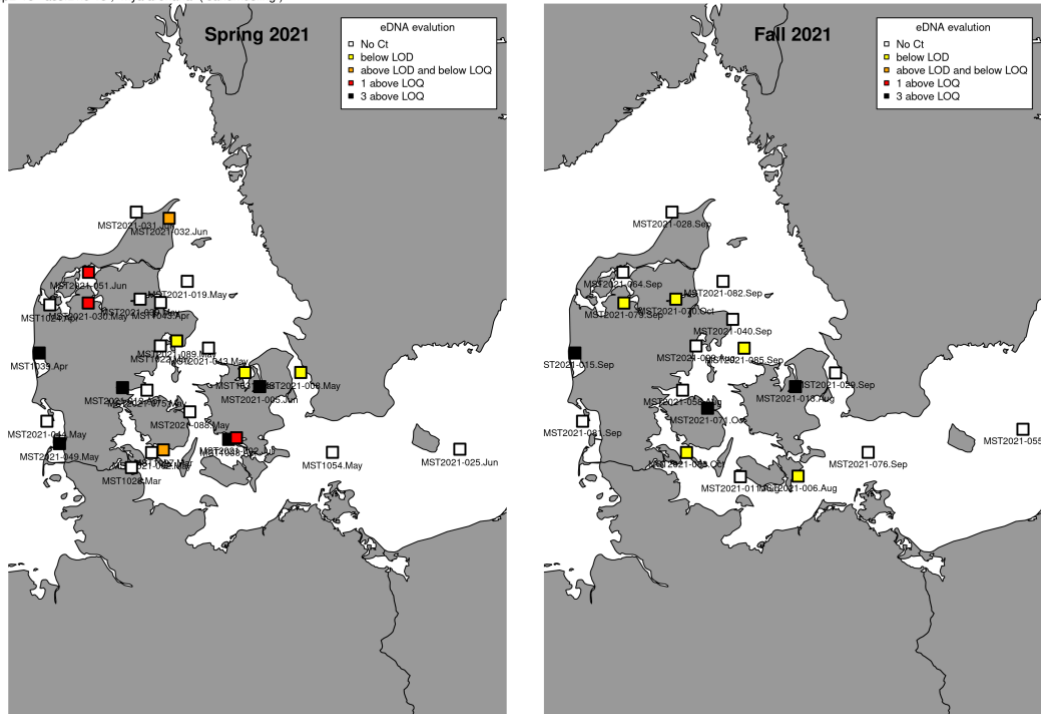


AppB 12 assiDno 19 , Mnemiopsis leidyi ( amerikansk ribbegoble )



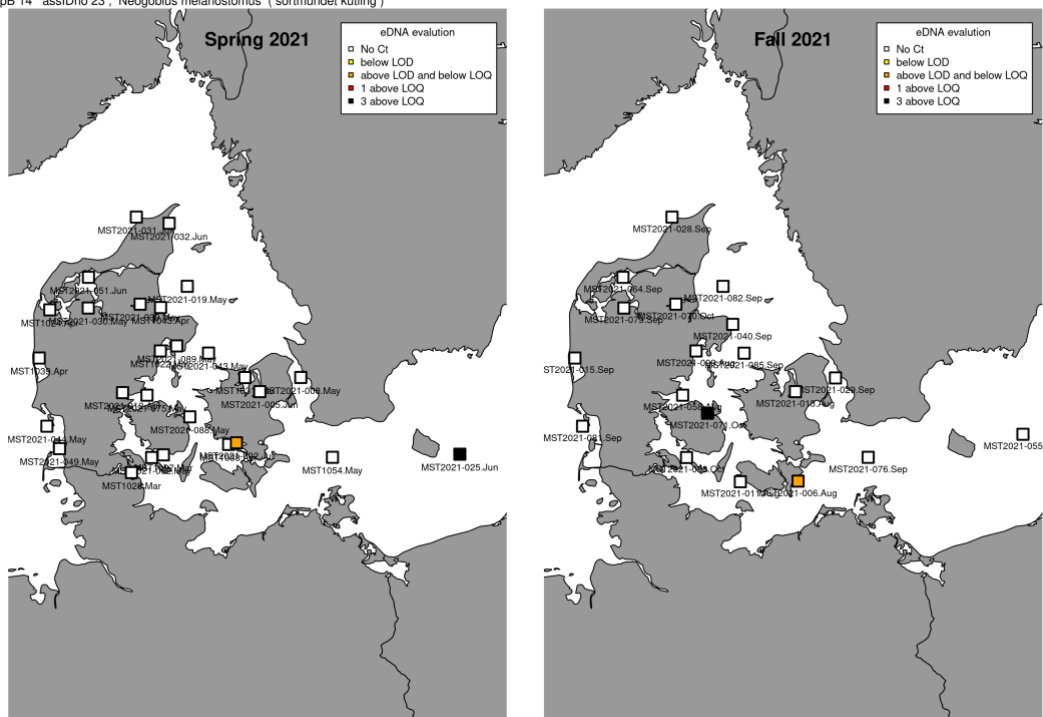
Figur B12. Kortlægning af eDNA-niveauer for amerikansk ribbegoble – *Mnemiopsis leidyi*.

AppB 13 assiDno 13 , Mya arenaria ( sandmusling )



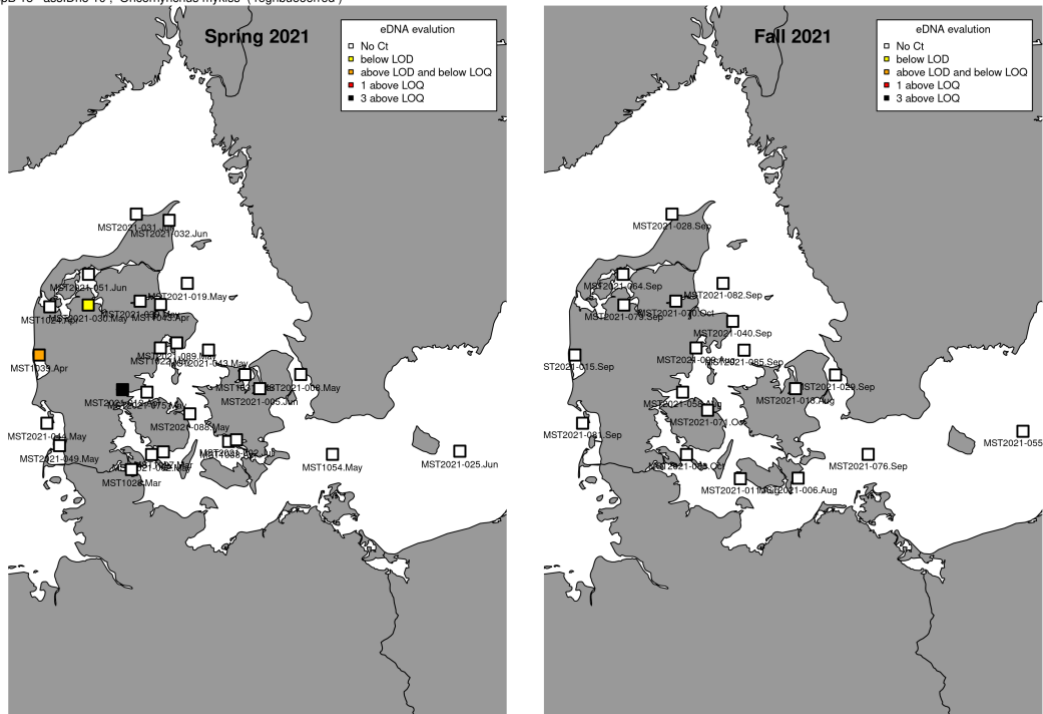
Figur B13. Kortlægning af eDNA-niveauer for sandmusling – *Mya arenaria*.

AppB 14 assiDno 23 , *Neogobius melanostomus* ( sortmundet kutling )



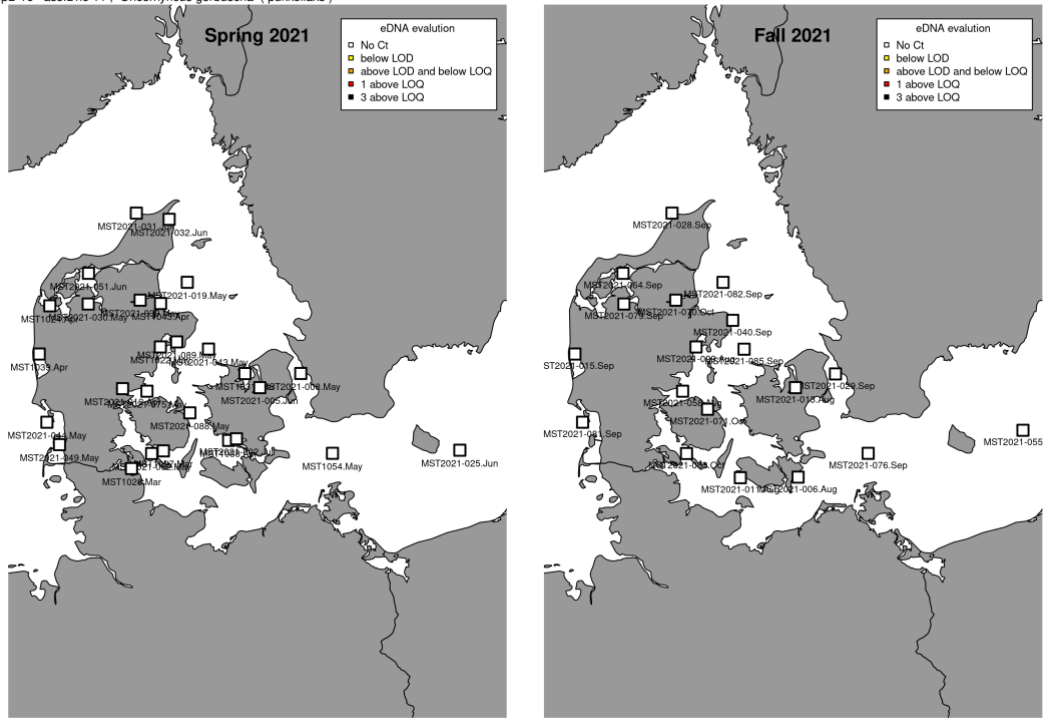
Figur B14. Kortlægning af eDNA-niveauer for sortmundet kutling – *Neogobius melanostomus*.

AppB 15 assiDno 10 , *Onchorhynchus mykiss* ( regnbueørred )



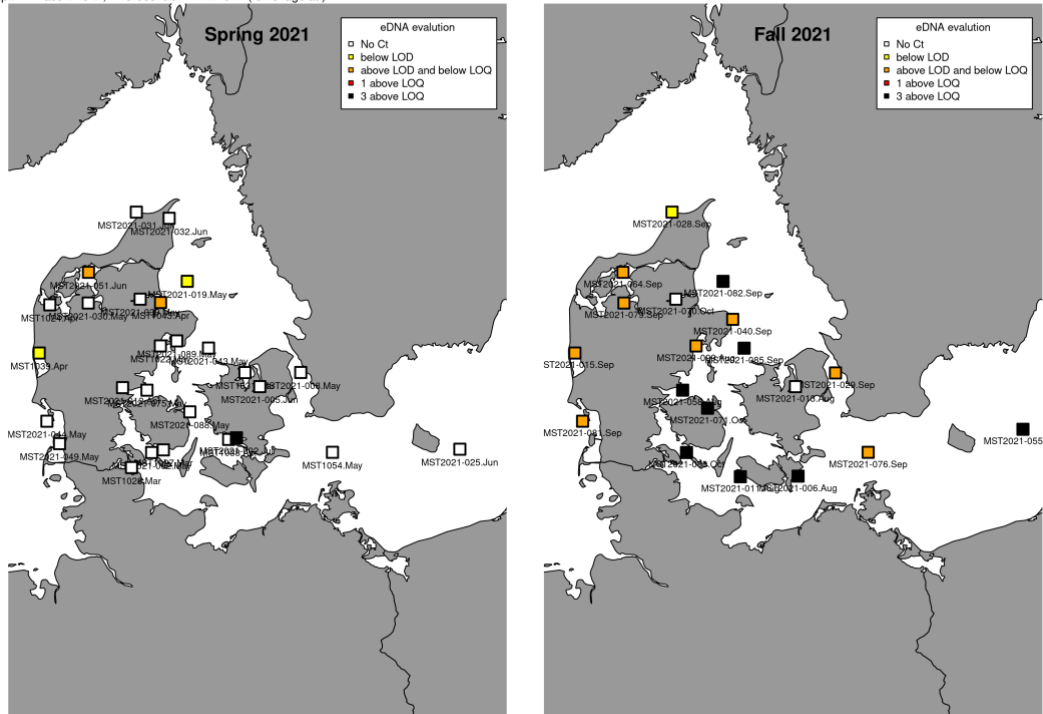
Figur B15. Kortlægning af eDNA-niveauer for regnbueørred – *Onchorhynchus mykiss*.

AppB 16 assiDno 11 , *Onchorhynchus gorbuscha* ( pukcellaks )



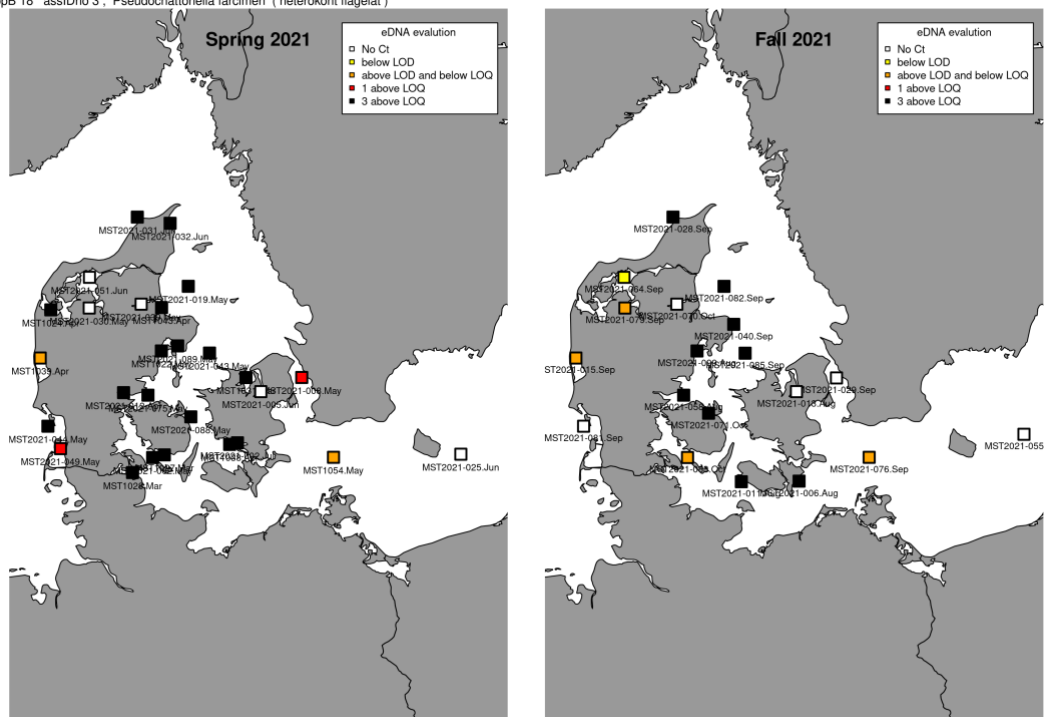
**Figur B16.** Kortlægning af eDNA-niveauer for pukcellaks – *Onchorhynchus gorbuscha*.

AppB 17 assiDno 2 , *Prorocentrum minimum* ( dinoflagelat )



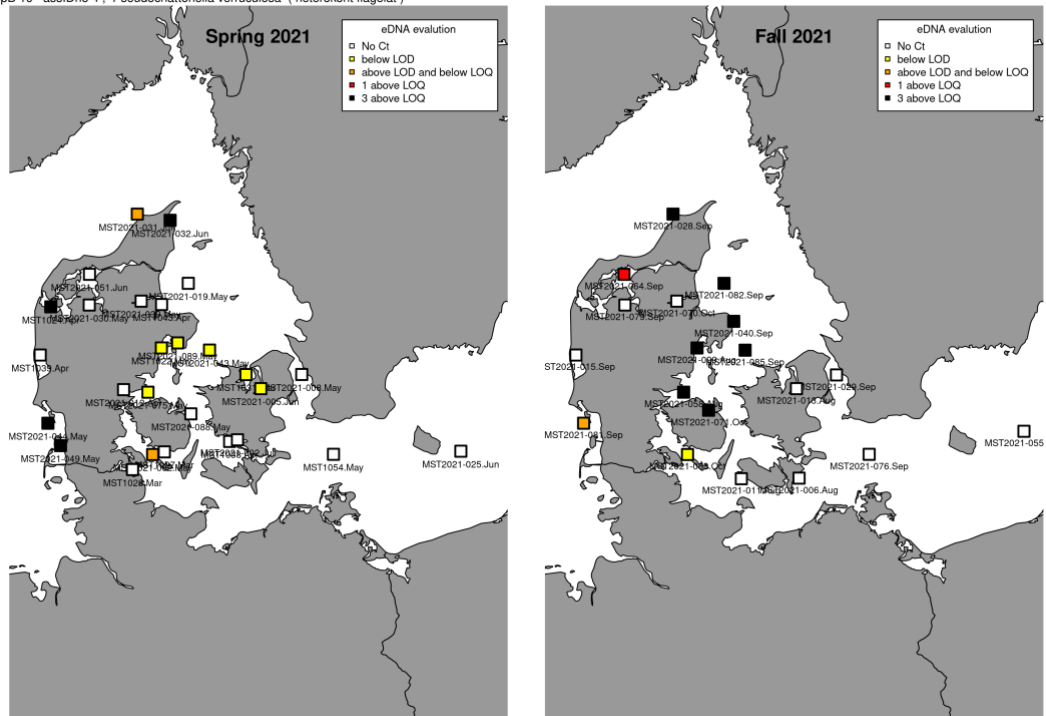
**Figur B17.** Kortlægning af eDNA-niveauer for dinoflagellaten – *Prorocentrum minimum*.

AppB 18 assiDno 3, *Pseudochattonella farcimien* (heterokont flagellat)



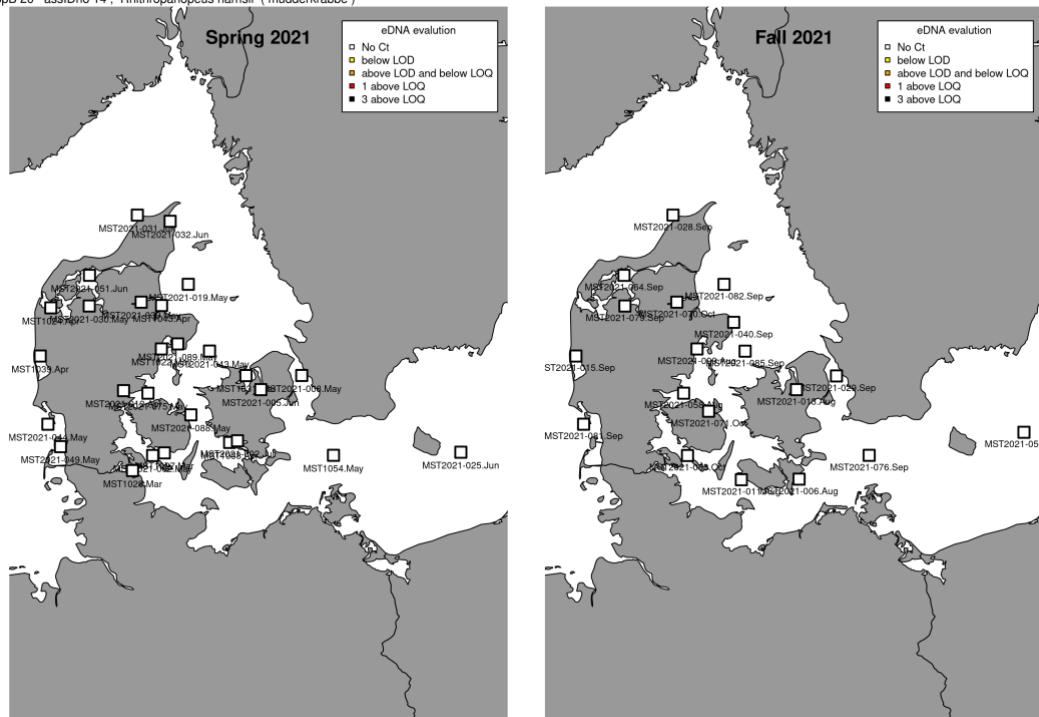
**Figur B18.** Kortlægning af eDNA-niveauer for den heterokonte flagellat – *Pseudochattonella farcimien*.

AppB 19 assiDno 4, *Pseudochattonella verruculosa* (heterokont flagellat)



**Figur B19.** Kortlægning af eDNA-niveauer for den heterokonte flagellat – *Pseudochattonella verruculosa*.

AppB 20 assiDno 14 , *Rhithropanopeus harrissii* (mudderkrabbe)



**Figur B20.** Kortlægning af eDNA-niveauer for den nordamerikanske mudderkrabbe – *Rhithropanopeus harrissii*.

## Rent vand – det er klart

NIVA Danmark er en nyetableret og uafhængig forsknings- og rådgivningsvirksomhed på vandmiljøområdet.

NIVA Danmark er et laboratorium i ordets klassiske betydning - et sted for øvelse, observation og testning. Særlig fokus har vi på forskningsbaseret gennemførelse af en række EU-direktiver, bl.a. vandrammedirektivet og havstrategidirektivet, og internationale konventioner (HELCOM, OSPAR og BDC). Vi rådgiver desuden relevante myndigheder og små og mellemstore virksomheder.

NIVA Danmark arbejder i vandløb, søer, fjorde og åbne havområder. Kerneområder er eutrofiering, miljøfarlige stoffer, biodiversitet, klimaforandringer, økosystemers sundhedstilstand samt effekter af menneskelige aktiviteter. Derfor udvikler vi indikatorer, overvågningsmetoder, værktøjer til tilstandsvurdering med et overordnet formål om at gennemføre analyser og synteseopgaver og bidrage til forsknings-baserede og bæredygtige løsninger på en lang række af de udfordringer vandmiljøet har.

NIVA Danmark er et lande-kontor under Norsk Institut for Vandforskning (NIVA). Vi har således en ressource-base på mere end 200 dedikerede forskere og eksperter.



Univate  
Njalsgade 76, 4. sal  
2300 København S  
Danmark  
Telefon: 39 17 97 33  
E-post: [mail@niva-dk.dk](mailto:mail@niva-dk.dk)  
CVR: 35431063  
[www.niva-danmark.dk](http://www.niva-danmark.dk)