

Kortlægning af flodperlemusling i Varde Å-systemet ved brug af eDNA – en eftersøgning af nålen i høstakken



**Varde
Kommune**



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

**AAGE V.
JENSEN**
NATURFOND

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

Titel Kortlægning af flodperlemusling i Varde Å-systemet ved brug af eDNA – en eftersøgning af nålen i høstakken	Løbenummer 7818-2023	Dato 26.01.2023
Forfatter(e) Jes J. Rasmussen, NIVA Danmark Christoffer Wyrwik, NIVA Danmark Mathias Sørensen, NIVA Danmark Michael Deacon, Miljøstyrelsen Flemming Sørensen, Varde Kommune Jan Pedersen, Varde Kommune Steen W. Knudsen, NIVA Danmark	Fagområde Miljøteknologi	Distribution Åben
	Geografisk område Danmark, Nordeuropa	Sider 24 + bilag

Opdragsgiver(e) Aage V. Jensen Fonden, Varde kommune, Miljøstyrelsen	Kontaktperson hos opdragsgivere Lars Malmberg (AVJ) Michael Deacon (MST)
	Udgivet af NIVA Danmark Projektnummer: 220154 & 220195

Sammendrag I dette studie blev der taget vandprøver i Varde Å, Linding Å, Ansager Å, Grindsted Å og Holme Å til kortlægning af forekomster af flodperlemusling ved brug af eDNA. Analyserne blev foretaget på en digital droplet PCR-plattform, der præsterer bedre end qPCR for små bestande af sjældent forekommende arter. Der blev fundet eDNA fra flodperlemusling i Varde Å ved Varde Sommerland samt opstrøms Vagtborg. Derudover blev der fundet eDNA fra flodperlemusling i udmundingen af Ansager Å samt på fire lokaliteter i Holme Å. For Ansager Å og Holme Å er der tale om nye fund, hvor flodperlemuslingen har været antaget forsvundet. Der er således mulighed for, at der findes kildepopulationer i Holme Å, der potentielt kan danne rekrutteringsgrundlag for den nyligt restaurerede strækning fra Nordenskov til Varde Å.
--

Fire emneord 1. eDNA 2. Overvågning 3. Flodperlemusling 4. ddPCR	Four keywords 1. eDNA 2. Monitoring 3. Freshwater pearl mussel 4. ddPCR
---	--

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

Jes J. Rasmussen
Projektleder/Hovedforfatter

Jesper H. Andersen
Forskningschef/Kvalitetssikrer

ISBN 978-82-577- 7554-4
NIVA-rapport ISSN 1894-7948

© Norsk institutt for vannforskning. Publikationen kan citeres frit med kildeangivelse.

**Kortlægning af flodperlemusling i
Varde Å-systemet ved brug af eDNA
– en eftersøgning af nålen i høstakken**

Forord

Denne rapport udgives af NIVA Danmark som afsluttende produkt i et projekt om kortlægning af miljø-DNA (engelsk: 'environmental DNA', forkortet: eDNA) fra flodperlemusling i Varde Å, Linding Å, Grindsted Å, Ansager Å og Holme Å.

Rapporten omfatter data baseret på indsamlinger af vandprøver i Varde Å, Linding Å, Grindsted Å, Ansager Å og Holme Å og efterfølgende analyseret ved brug af 'digital droplet polymerase chain reaction' (dd-PCR) teknik. Undersøgelsen fokuserer på at beskrive den rumlige ud-bredelse af flodperlemusling i Varde Å, Linding Å, Grindsted Å, Ansager Å og Holme Å.

I Holme Å er fokus desuden på kortlægning af mulige spredningsveje og kildepopulationer for genetablering af tabte bestande af flodperlemuslinger på en ny-restaureret del af Holme Å.

Projektet er gennemført af NIVA Danmark med hjælp til udpegning af prøveindsamlings-lokaliteter fra Varde kommune (Holme Å) og Miljøstyrelsen (Varde Å).

Alle projektdeltagere har set og diskuteret resultater og rammer for rapportering samt selve udarbejdelsen af denne rapport.

NIVA Danmark har alene haft ansvar og beslutningsrettighed for rapportens indhold, fortolkninger af data samt faglige anbefalinger. Alle projektdeltagere er enige om rapportens indhold.

København, 26. januar 2023

Jes J. Rasmussen,
projektleder

Indholdsfortegnelse

1	Introduktion	7
2	Formål	9
3	Metode	10
3.1	Prøveindsamlingslokaliteter	10
3.2	Indsamling og filtrering af vandprøver til eDNA-analyse	10
3.3	Forberedelse af positiv kontrol for reference	11
3.4	eDNA analyse med ddPCR	11
3.5	eDNA kontroller og standardkurver	12
3.6	Grænser for detektion og kvantificering af eDNA	12
3.7	Databehandling	12
4	Resultater og diskussion	14
4.1	Koncentrationer af eDNA fra flodperlemusling i Varde Å-systemet	14
4.2	Prøvetagningslokaliteter med positive fund af eDNA fra flodperlemusling	16
4.3	Perspektivering	17
5	Konklusion	19
6	Tak til	20
7	Referencer	21

Sammendrag

Flodperlemuslingen er gået drastisk tilbage i dens naturlige udbredelsesområde i Europa inden for de seneste 100 år. I Danmark er flodperlemuslingen i dag formentlig kun naturligt forekommende i Varde Å-systemet, om end dens bevaringsstatus er ukendt. Populationer af flod-perlemusling formodes dog at være bevaret på en ca. 2,5 km lang strækning i Varde å. Dette er yderligere underbygget af en tidligere undersøgelse, hvor der blev fundet eDNA fra flodperlemusling ved Varde Sommerland og Vagtborg.

Det er imidlertid ikke undersøgt, om flodperlemuslingen findes andre steder i Varde Å-systemet, herunder opstrøms en nyligt restaureret strækning i Holme Å, hvor der blev fundet skaller af flodperlemusling i det gamle åleje. Formålet med dette projekt er derfor at undersøge mulige forekomster af flodperlemuslinger opstrøms den restaurerede strækning af Holme Å samt i Varde Å, Linding Å, Grindsted Å og Ansager Å ved brug af eDNA. Undersøgelsen rummer et tæt netværk af prøvetagningslokaliteter, især i Holme Å, samt et antal udvalgte prøvetagnings-lokaliteter i Varde Å's hovedløb samt udmundinger af Linding Å, Grindsted Å og Ansager Å.

I starten af september 2022 blev der indsamlet tre vandprøver fra hver af 18 lokaliteter. Vandprøverne blev filtreret med 0,22 µm Sterivexfilter, og der blev søgt efter eDNA fra flodperlemusling med digital droplet PCR (dd-PCR), som er en platform, der præsterer bedre end den traditionelle qPCR-baserede metodik, når der skal eftersøges sjældent forekommende arter og små populationer.

Der blev fundet eDNA fra flodperlemusling på flere prøveindsamlingslokaliteter i Varde Å-systemet. Dog var de detekterede niveauer af eDNA fra flodperlemusling alle i meget lave koncentrationer. Der blev fundet eDNA fra flodperlemusling i Varde Å ved Varde Sommerland og opstrøms Vagtborg. Ligeledes blev der fundet eDNA fra flodperlemusling ved udløbet fra Ansager Å samt på fire lokaliteter i Holme Å omkring Starup og Hovborg. Således er der et muligt rekrutteringspotentiale for flodperlemusling til den nyligt restaurerede strækning af Holme Å.

Koncentrationerne af eDNA var så lave, at de formentlig ikke kunne være blevet detekteret med den traditionelle qPCR-platform, og denne undersøgelse viser, at ddPCR er særdeles egnet til eftersøgninger af sjældent forekommende arter. De nye indikationer af, at der findes flodperlemuslinger i Ansager Å og Holme Å anbefales at følges op med fysiske eftersøgninger, hvor der blev fundet spor af eDNA samt yderligere eDNA-undersøgelser på strækninger af Ansager Å og Holme Å, der ikke var inkluderet i denne undersøgelse.

Abstract

Populations of freshwater pearl mussels have drastically declined in size and numbers across the European continent during the past century. In Denmark, the conservation status of freshwater pearl mussels is unknown, but River Varde is assumed to house the only remaining living individuals. A previous study, based on environmental DNA (eDNA), confirmed the possible presence of living freshwater pearl mussels in River Varde close to Varde Sommerland and Vagtborg.

Surveys based on eDNA have, however, not been conducted in tributaries to River Varde. Recently, a part of Holme stream was restored, and the channelised stream was brought back to its original meandering shape, and empty freshwater pearl mussel shells were discovered in the stream bed of the original stream course. The aim of this project was to search for potential occurrence of eDNA from freshwater pearl mussels upstream the restored reach of Holme stream and at additional sites in River Varde and tributary outlets of Linding stream, Grindsted stream, and Ansager stream.

Three water samples from each of 18 sampling sites were collected in September 2022. The water samples were filtered through 0.22 µm Sterivex filters and analysed for the presence of eDNA from freshwater pearl mussels using digital droplet PCR (dd-PCR). The dd-PCR platform exceeds the performance of the traditional qPCR platform when target organisms are rare.

Several water samples contained eDNA from freshwater pearl mussels although the detected eDNA concentration generally was very low. In River Varde, eDNA from freshwater pearl mussels were detected close to Varde Sommerland and upstream of Vagtborg. Moreover, eDNA from freshwater pearl mussels was detected in samples from the outlet of Ansager stream and at four sites in Holme stream. The detection of eDNA from freshwater pearl mussels in Holme stream indicates a possible recolonisation potential for the recently restored part of Holme stream.

In general, concentrations of eDNA were so low that they may not have been detected using the traditional qPCR platform, and this project shows that dd-PCR provides a viable method for the detection of extremely rare species. The detection of freshwater pearl mussel eDNA in Holme stream and Ansager stream warrants a need for further eDNA-based surveys in Holme stream and Ansager stream and provides a spatially detailed guide for targeted physical surveys aiming to describe age structure and reproductive potential for remnant freshwater pearl mussel populations in Denmark.

1 Introduktion

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

I Danmark er flodperlemuslingen i dag formentlig kun naturligt forekommende i Varde Å-systemet, om end dens bevaringsstatus er ukendt. Populationer af flodperlemusling formodes dog at være bevaret på en ca. 2,5 km lang strækning, hvor store og meget gamle individer har været fundet ved en tidligere dykkerundersøgelse (Kann 2006). Siden studiet af Kann (2006) er der kun fundet et enkelt levende individ, der blev fanget på spinner af en sportsfisker (Porsgaard 2015) på trods af en målrettet eftersøgning under NOVANA-programmet (Fredshavn et al. 2014). Dog har WSP Danmark i september 2021 udført en større dykkerundersøgelse på en 60 m strækning af Varde Å tæt ved udløbet fra Karlsgårdeværket samt en 100 m strækning nedstrøms udløbet af Skonager Lilleå (WSP 2021). Her fandt dykkerne omkring 650 levende individer registreret som flodperlemuslinger – dog kun dokumenteret med billeder af enkelte individer. En sikker artsbestemmelse kan imidlertid kun udføres ved inspektion af hængslerne, som holder de to skaller sammen, eller ved at sammenholde DNA fra indsamlede individer med genetiske referencedatabaser.

Som pilotforsøg blev to lokaliteter på den 2,5 km lange strækning i Varde Å undersøgt i 2015 og 2016 for tilstedeværelse af miljøDNA (engelsk: 'environmental DNA', forkortet: eDNA) (Rodríguez-Ezpeleta et al. 2021; Thomsen et al. 2012) for flodperlemuslingen (Andersen & Wiberg-Larsen 2017). Positive eDNA-signaler for flodperlemusling blev fundet både i vand og sediment fra de to lokaliteter samt fra yderligere to sydsvenske lokaliteter med kendte bæredygtige populationer af flodperlemusling. Derimod blev der ikke fundet eDNA af flodperlemusling længere opstrøms i Varde Å eller i tre øvrige danske åer, hvor arten aldrig tidligere er observeret (Andersen & Wiberg-Larsen 2017). Derfor er indsamling af eDNA foreslået som en effektiv metode til screening efter forekomster af flodperlemusling.

Det er tidligere vist, at flodperlemusling udskiller DNA sammen med slimdannelsen (Henley et al. 2006). Dette kan være en kilde til eDNA fx i Varde Å. Dog viste Geist et al. (2008), at det er muligt at ekstrahere DNA direkte fra knuste skaller af flodperlemusling ved phenol-kloroform-behandling. Rasmussen et al. (2021) viste dog, at gamle skaller fra flodperlemusling ikke udskiller DNA under naturlige forhold. Positive fund af eDNA fra flodperlemusling må derfor antages at stamme fra levende individer. Stoeckle et al. (2016) viste, at eDNA fra flodperlemuslingepopulationer i forskellige størrelser i europæiske vandløbssystemer aldrig kunne detekteres på større afstand end højst 500 m (formentlig væsentlig mindre) fra de kendte populationer. Dette betyder, at der i eftersøgninger af flodperlemuslinger med eDNA er behov for et netværk af prøvetagningslokaliteter, hvor de enkelte lokaliteter forefindes med indbyrdes afstande under 500 m.

Det antages, at organismer udskiller mere eDNA i aktive eller reproduktive perioder (Buxton et al., 2017; Taberlet et al., 2021) men niveauer af eDNA kan også blive influeret af mikrobiel nedbrydning og af størrelse og kropsform på organismen (Allan et al., 2021; Wood et al., 2020; Yates et al., 2021). Flodperlemuslingen kan blive op til cirka 120 år gammel (Bauer, 1992) og forventes tidligst at gyde fra det 15. leveår og frem – dog er de reproduktivt inaktive i de sidste leveår (Geist et al., 2010). Hvis der kun findes flodperlemuslinger tilbage i Varde Å-systemet, som er ældre end den reproduktionsaktive

aldersperiode, er der risiko for, at mindre eDNA vil blive frigivet til vandmasserne, hvilket kan gøre det yderst vanskeligt at detektere få tilbageværende individer.

Aage V. Jensens Naturfond, Varde kommune, Norlys og Danmarks Naturfond gennemførte i 2020-2021 et stort restaureringsprojekt i Holme Å, hvor 12 km af åen blev genslynget i det oprindelige åleje og derfor ikke længere løber gennem Karlsgårde Sø. Herved er der igen skabt fri passage til Holme Å fra Varde Å. Ved udgravningen af det nye forløb i det oprindelige åleje blev der fundet skaller fra flodperlemuslinger (se billeder herunder). Det er derfor interessant at undersøge, om der findes tilbageværende populationer af flodperlemuslinger i og omkring Holme Å som kan bidrage til genetableringen af populationer af flodperlemuslingen på den restaurerede strækning af Holme Å. Samtidig er det interessant at undersøge, hvorvidt flodperlemuslingens udbredelse i Varde Å-systemet afgrænses til den 2,5 km lange strækning undersøgt af Andersen & Wiberg-Larsen (2017), eller om der findes flere lokaliteter med levende individer.



Fotos: Flemming Sørensen, Varde kommune

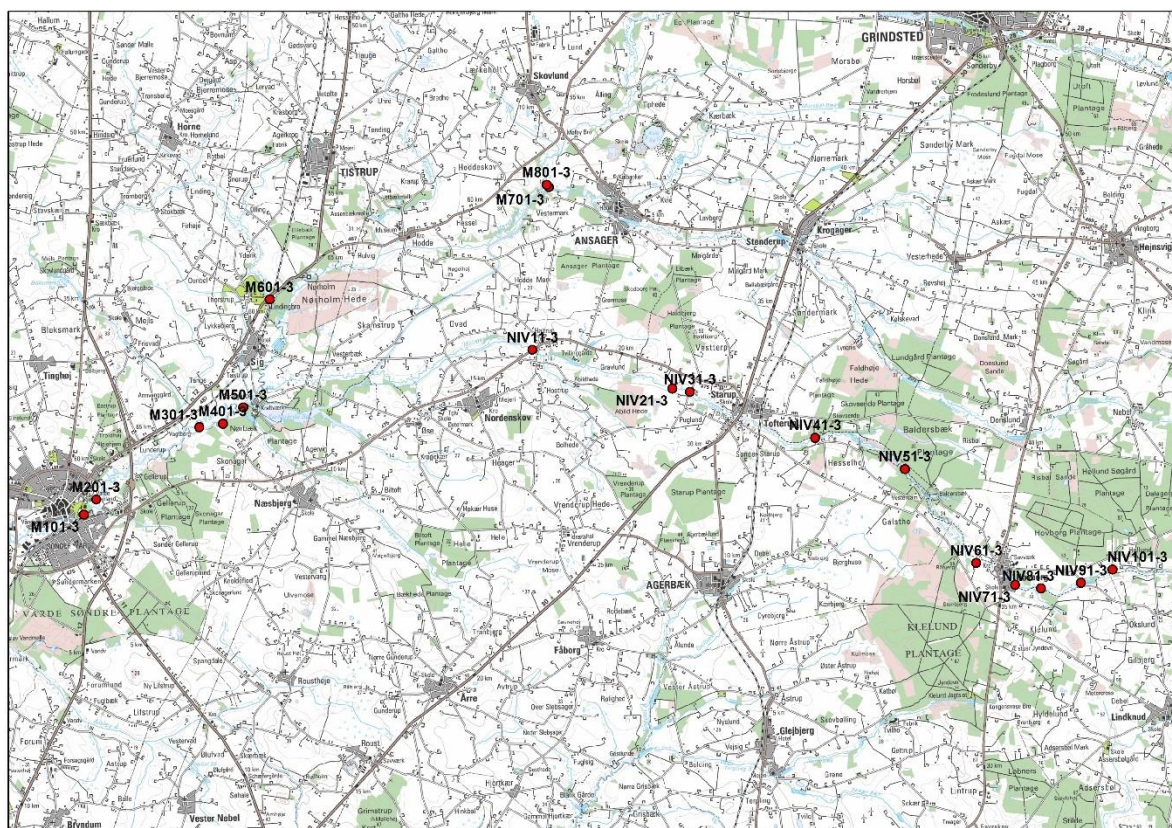
2 Formål

Formålet med dette projekt er at undersøge mulige forekomster af flodperlemuslinger opstrøms den restaurerede strækning af Holme Å samt i Varde Å, Linding Å, Grindsted Å og Ansager Å ved brug af eDNA. Undersøgelsen rummer et tæt netværk af prøve-tagningslokaliteter især i Holme Å samt et antal udvalgte prøvetagningslokaliteter i Varde Ås hovedløb samt udmundinger af Linding Å, Grindsted Å og Ansager Å.

3 Metode

3.1 Prøveindsamlingslokaliteter

Der blev indsamlet vandprøver fra ti lokaliteter i Holme Å samt otte lokaliteter i Varde Å. De ti lokaliteter i Holme Å lå alle opstrøms den nyligt restaurerede strækning og dækkede i alt en strækning på omkring 20 km af Holme Å. Lokaliteterne i Varde Å lå fordelt mellem Varde by og udløbet fra Holme Å ved Karlsgårdeværket samt i udløbene fra Linding Å, Ansager Å og Grindsted Å (Figur 1).



Figur 1. Oversigtskort over prøveindsamlingslokaliteter.

3.2 Indsamling og filtrering af vandprøver til eDNA-analyse

I starten af september 2022 blev der indsamlet vandprøver fra alle prøveindsamlings-lokaliteterne. Der blev indsamlet vand fra ti forskellige steder på hver prøveindsamlings-lokalitet og blandet i en beholder. Det indsamlede vand blev samlet i velopblandede dele af vandløbene for at undgå, at DNA-materiale fra bunden blev medtaget i prøven. Fra denne beholder blev der indsamlet tre vandprøver som blev filtreret gennem 0,22 µm Sterivex-filtre. Filtrene blev frosset i felten på ved at blive lagt i en kasse med tøris efter endt filtrering.

For at filtrere vand igennem Sterivex-filtret benyttedes en 50 mL hospitalssprøjte, hvor det totale vandvolumen efterfølgende blev noteret (Bilag 1). For hver filterprøve blev længde- og breddegrad noteret, samt indsamlingstidspunkt og indfrysningstidspunkt. Filtrene blev tømt for restvand og

indfrosset tomme på tøris, og overført til -15 °C i en almindelig fryser efter dagens feltarbejde var afsluttet. Alle filterprøver blev opbevaret på -15 °C indtil der blev ekstraheret DNA fra filtrene i laboratoriet.

For at undgå at DNA fra tidligere indsamlede lokaliteter blev overført mellem prøver, blev alt indsamlingsudstyr, der skulle genbruges imellem indsamlingslokaliteter skyllet i først 0,05 % klorinopløsning, og derpå skyllet i 70% ethanol. Dette indbefattede både 50 mL sprøjter, spande samt litermål, der blev brugt til indsamling.

Ved hver tredje indsamlingslokalitet blev der også udført en filtrering af destilleret vand (ddH₂O), som skulle tjene som 'felt-blanke'. Blanke prøver fra feltarbejdet tjener til at sikre at der er mulighed for efterfølgende i laboratoriet at kontrollere at der ikke er sket krydskontamination med eDNA imellem indsamlingslokaliteter. Med 18 indsamlingslokaliteter resulterer det i seks 'felt-blanke'; navngivet BLANK1-BLANK6.

De frosne filtre blev ekstraheret ved hjælp af Qiagene Blood and Tissue-kit, med tilsætning af 720 uL ATL buffer og 80 uL proteinase K. Ekstraktionen blev udført inde i filteret ved inkubation i 12-24 timer ved 56 °C, som beskrevet i tidligere protokoller (Knudsen et al., 2019; 2022; Spens et al., 2017). Ekstraktionen blev udført i et laboratorie, hvor PCR-produkter ikke bliver produceret, for at undgå krydskontamination fra tidligere DNA-analyser. Ekstraktet fra hvert filter blev elueret i 200 uL EB-buffer, og koncentrationen af DNA fra filteret blev målt ved hjælp af Qubit fluorescens-måling med 'High Sensitivity assay' (Bilag 1). Ekstraktionerne fra filtrene blev opbevaret ved -15 °C, indtil der kunne foretages ddPCR-analyse. For de i alt 18 x 3 filterprøver plus de seks feltblanke blev der også udført tre negative ekstraktionskontroller ('NEG1-NEG3') parallelt med ekstraktionen fra filtervandprøverne. Disse negative ekstraktionskontroller tjener som kontrol for, at der ikke sker kontaminering undervejs i ekstraktions-processen.

3.3 Forberedelse af positiv kontrol for reference

Som positiv-kontrol blev et PCR-produkt oprenset og fortyndet (se beskrivelse i afsnit 3.5). Syntese af den positive kontrol følger tidligere beskrevne fremgangsmåde (Agernsap et al. 2017; Knudsen et al. 2019). Produktet blev derpå oprenset med 'Qiagene MinElute PCR purification kit', og elueret med 30 uL EB-buffer. Koncentrationen på det oprensede produkt blev målt med 'Qubit HS fluorescence' (Thermo Fisher Scientific) måling, og molekylvægten udledt ved hjælp af OligoCalc (Kibbe 2007), og fortyndet i EB-buffer til at tilsvare 10⁹ molekyler per uL. Denne positive kontrol opbevares på -15 °C indtil selve ddPCR-analysen skal gennemføres. For den indledende syntese af PCR-produktet benyttedes de samme primere, der er artsspecifikke imod flodeperlemusling (Rasmusen et al. 2019).

3.4 eDNA analyse med ddPCR

Analyse af eDNA-niveauer i ekstraktionerne fra filtrene blev udført på en BioRad QX200 ddPCR 'droplet reader'.

Reaktioner for analyse blev gjort klar for et total reaktionsvolumen på 25 µL, som indeholdt 0,4 µL ddH₂O; 0,8 µL probe [i koncentration på 13 uM]; 0,4 µL F-primer [i koncentration på 22 uM]; 0,4 µL R-primer [i koncentration på 22 uM]; 10 µL BioRad supermix (uden dUTP for prober) og 10 µL DNA fra enten positiv kontrol eller fra ekstraktionen fra filteret. De endelige koncentrationer i reaktionerne tilsvare derved de 400 nM for F- og R-primer og 100 nM for proben, som afledt som optimale

(Rasmussen et al., 2021). Alle rør med negative kontroller og ekstraktionsblanke plus feltblanke, blev tilført først og lukket. Derefter blev alle ekstraktioner fra vandprøver tilsat og lukket.

Derefter blev fortyndingsserien af den positive kontrol blev klargjort ved at følge tidligere protokoller (Agersnap et al., 2017; Knudsen et al., 2019; 2022). Forberedelse af fortyndingsserien blev udført på selve dagen for PCR-opsætningen, for at sikre at de laveste niveauer af den positive kontrol ikke var henfaldet i fryseren pga gentagne fryse-/tø-processer.

Reaktionerne blev så overført til en BioRad QX200 'droplet generator', og de 40 µL resulterende dråber i olieemulsion blev derefter overført til en PCR-plade med 96 brønde og anbragt i en PCR-maskine med følgende temperaturindstillinger: Enzym-aktivering ved 95 °C i 10 minutter, efterfulgt af 50 omgange med denaturering ved 95 °C i 1 minut og annealing og forlængelse ved 60 °C i 2 minutter, efterfulgt af en omgang med enzym-deaktivering ved 98 °C i 10 minutter, hold ved 4 °C i 10 minutter, og hold ved 10 °C indtil prøverne blev fjernet fra maskinen. Pladen med reaktioner blev holdt ved 4 °C i køleskab, indtil pladen blev analyseret den efterfølgende dag med BioRad QX200 ddPCR 'droplet reader'. I opsætningen af analyse af vandprøver blev både de 'feltblanke'-vandprøver inkluderet (BLANK1-BLANK6), plus de negative ekstraktionskontroller (NEG1-NEG3, samt en ekstra negative kontrol ('negative target control, forkortet 'NTC') også inkluderet. De felt-blanke tjener til at sikre der ikke er fremmed eDNA fra flodperlemusling fra andre indsamlingslokaliteter, der uhensigtsmæssigt overføres. De negative ekstraktionskontroller tjener til at sikre der ikke er fremmed eDNA, der overføres under ekstraktionsprocessen, og den negative kontrol (NTC) tjener til at give mulighed for at efterkontrollere at de reagenser, der benyttes i laboratoriet, ikke er forurenet med fremmed DNA fra flodperlemusling.

3.5 eDNA kontroller og standardkurver

Den positive kontrol blev lavet ud fra vævsprøver fra flodperlemusling fra Norge og indhentet fra Århus Universitet, som er den samme positive kontrol der blev benyttet i studiet af Rasmussen et al. (2021). Fire yderligere ekstraktioner blev gjort med Qiagene Blood and Tissue-kit, ved at følge den vedlagte protokol for ekstraktion. Fire individer af flodperlemusling indhentet fra Århus Universitet dannede grundlag for de ekstra positive kontroller, der efterfølgende kunne fortyndes ud i en fortyndingsserie.

De seks feltblanke (BLANK1-BLANK6) og de tre negative ekstraktionskontroller (NEG1-NEG3) samt den 'negative target control' (NTC) blev analyseret sammen med ekstraktionerne fra vandprøverne på ddPCR-platform for at sikre, at de detekterede eDNA forekommer stammer fra filtervandprøverne og ikke fra det filtrerede vand eller fra de tomme ekstraktioner.

3.6 Grænser for detektion og kvantificering af eDNA

Nedre grænse for kvantifikation (eng. 'limit of quantification, forkortet: 'LOQ') blev fastsat ud fra fortyndingsserien af den positive kontrol, hvor det laveste fortyndingsniveau, der stadig giver positiv detektion er lig den nedre detektionsgrænse (Agersnap et al., 2017; Knudsen et al., 2019; Klymus et al., 2020). Den nedre detektionsgrænse (eng. 'limit of detection, forkortet: 'LOD') blev samtidigt fastsat som over det niveau, hvor der var detektion i de negative kontroller. For de positive eDNA-forekomster blev antallet af positive dråber vurderet ud fra det totale antal af dråber dannet. De positive sporinger i dråber var alle under 10 kopier per µL.

3.7 Databehandling

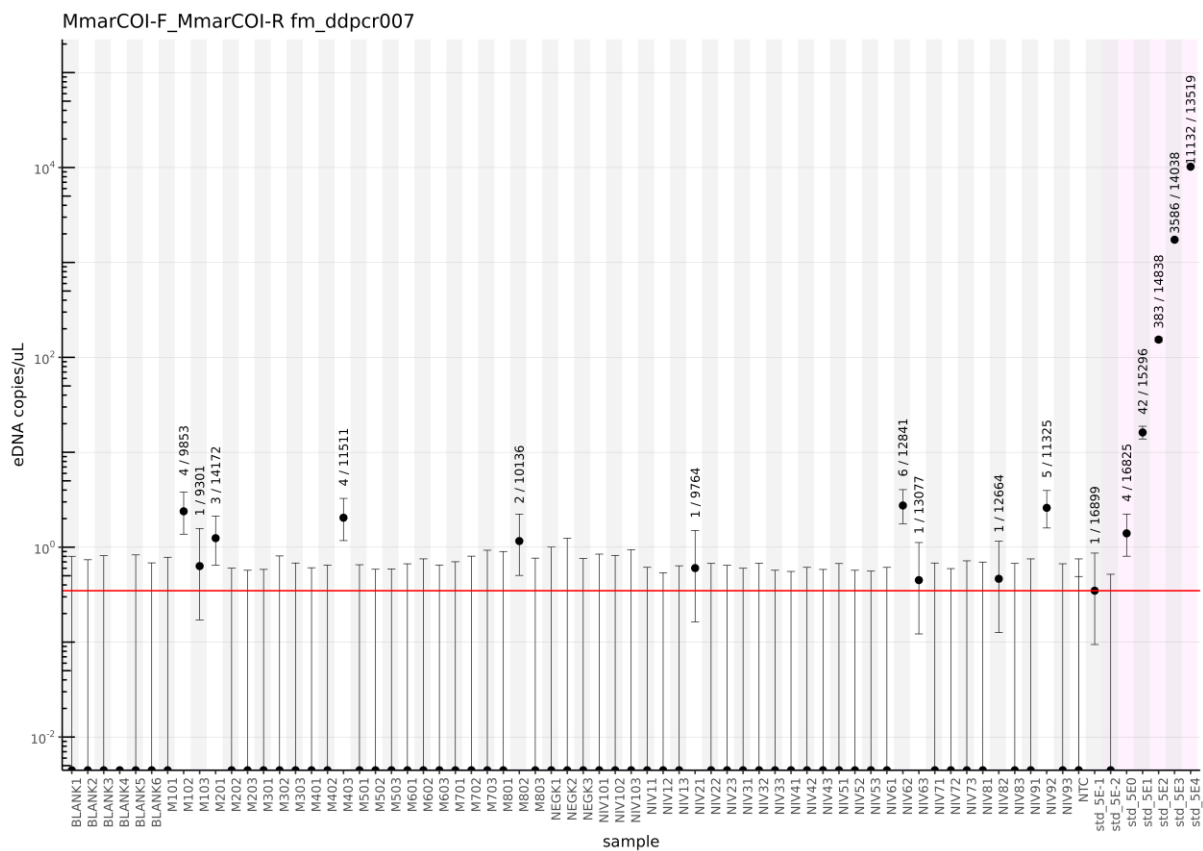
Med BioRad QX200 ddPCR 'droplet reader' blev antallet af positive og negative dråber vurderet med 'direct quantification' og sporing af FAM-fluorescens fra proben. Data fra blev derefter eksporteret

som '.csv' filer ('comma separated value') sammen med koncentrationsmålinger udført på de ekstraherede filterprøver og begge dele blev så læst ind i R v4.2.2 (R Core Team 2022) og analyseret for at lave tabeller og grafiske fortolkninger af resultaterne, ved at gøre brug af pakkerne: "dplyr" (Wickham et al. 2022), "tidyverse" (Wickham et al. 2019), "tidyr" (Wickham & Girlich 2022), "ggplot2" (Wickham 2016), "scales" (Wickham & Seidel 2022).

4 Resultater og diskussion

4.1 Koncentrationer af eDNA fra flodperlemusling i Varde Å-systemet

Der blev fundet eDNA fra flodperlemusling på flere prøveindsamlingslokaliteter i Varde Å-systemet. Dog var de detekterede niveauer af eDNA fra flodperlemusling alle i meget lave koncentrationer (Figur 2, Bilag 1). De meget lave koncentrationer af eDNA, der blev detekteret, indikerer, at 1) der er meget få individer af flodperlemusling tilbage i Varde Å-systemet, 2) der generelt er en meget lav rate af eDNA-udskillelse fra tilbageværende flodperlemuslinger til omgivelserne, eller 3) det filtrerede vandvolumen var for lille til at kunne indsamle et større antal eDNA-molekyler fra flodperlemusling.



Figur 2. Antallet af eDNA-kopier per μL tilsat ekstraktion fra filtrvandprøver på en logaritmisk skala. Den røde linje angiver den nedre grænse for positiv detektion af eDNA. Ratioen over hvert punkt angiver, hvor stor en andel af positive dråber, der blev detekteret med ddPCR-plattformen ud af det totale antal dråber, der var dannet. Punkterne i de violette søjler i højre side angiver fortyndingsserien af de positive kontroller.

De lave niveauer af eDNA fra flodperlemusling (< 10 kopier/ μL ekstrakt), der her blev detekteret, kan være en direkte indikation på, at der er meget få individer af flodperlemusling tilbage. Lave niveauer af eDNA fra den sjældne dyndsmusling (*Misgurnus fossilis*) er også blevet koblet med, at der er meget få individer af den sjældne art tilbage (Sigsgaard et al., 2015). Høje niveauer af eDNA er i andre studier blevet koblet med store forekomster af den eftersøgte art (Knudsen et al. 2019; Salter et al. 2019).

Dette er vanskeligt at komme nærmere i dette studie, da der mangler et sammenligningsgrundlag, hvor en stor population af flodperlemusling udgør en positive reference for et kraftigt eDNA-signal fra flodperlemusling. Tidligere detektioner af eDNA fra flodperlemusling fra Varde Å (Andersen & Wiberg-Larsen 2017) kan desværre ikke sammenlignes, da disse tidligere fund ikke blev kvantificeret som antal molekyler per filtreret vandvolumen. Fremtidige studier, der sigter efter at påvise tilstedeværelse af mange individer af flodperlemusling, bør inkludere en indsamlingslokalitet, der er habitat for store forekomster af flodperlemusling, da dette vil tjene som referencepunkt for, hvordan eDNA-niveauer kan registreres når flodperlemuslingen er almindeligt forekommende.

De lave niveauer af eDNA fra flodperlemusling kan også skyldes, at flodperlemuslingen ikke udskiller meget eDNA til omgivelserne. Studier på eDNA fra flodkrebs har spekuleret i, at udskilleleshastighed af eDNA fra hårdskallede dyr er mindre voldsom end fra dyr uden skal (Agersnap et al., 2017; Strand et al., 2019), og kontrollerede forsøg på fisk (Urban et al. 2022) har eftervist, at nedbrydningshastighed og udskilleleshastighed kan variere fra organisme til organisme. Kontrollerede akvarieforsøg har vist at udskilleleshastighed, målt som eDNA mængde per biomasse, kan variere mellem individer af samme organisme (Rourke et al., 2023). Sæson, årstid og aktivitet over døgnet kan også influere på hvor meget eDNA der udskilles til omgivelserne (Agersnap et al., 2022; Jensen et al., 2022; Sigsgaard et al., 2017). Hvor hurtigt eDNA fra flodperlemusling udskilles og nedbrydes må betragtes som en ukendt faktor, der er vanskelig at bestemme. Det vil forudsætte kontrollerede forsøg med flere individer i akvarier, og må her henlægges til fremtidige projekter.

Med vandprøvevolumener mellem 150 mL og 350 mL blev der filtreret relativt store vandvolumener, der tidligere har gjort det muligt at detektere forekomster af små bestande af fx flodkrebs (Agersnap et al., 2017). Men flodperlemusling udskiller ikke nødvendigvis eDNA til omgivelserne med samme rate som flodkrebs, og strømforhold og opblanding i Varde Å-systemet kan betyde, at de 3 x18 filterprøver ikke har været et tilstrækkeligt stort antal prøver til at detektere eDNA-forekomster af flodperlemuslinger fra alle prøvetagningslokaliteterne i Varde Å-systemet. De lave niveauer af eDNA detekteret i dette studie understreger dog, at et mindre prøveantal, eller et mindre filtreret vandvolumen kunne have betydet, at forekomsterne af flodperlemusling ville være blevet overset. De lave niveauer af eDNA detekteret i dette studie understreger om noget også nødvendigheden af en større prøveindsamling og en mere frekvent prøveindsamling, hvis ønsket er at overvåge eDNA fra flodperlemusling i Varde Å-systemet. Filtrering af større vandvolumen (> 1 L) ifm. vandindsamling er tidligere forsøgt med stor succes for detektion af eDNA fra flodkrebs (Strand et al., 2019). Større vandvolumen i filtreringen vil være med til at øge chancen for at detektere lave niveauer af eDNA fra en i forvejen sjælden art. Filtrering af et større vandvolumen vil dog nødvendiggøre, at en anden filtreringsteknik tages i brug end hvad der kan filtreres igennem et Sterivex-filter. Fordelen ved et Sterivex-filter er, at selve filteret er indkapslet i en plastikcylinder, der forhindrer, at fremmed uønsket eDNA kan forurene filterprøven (Spens et al. 2017). Filtrering af større vandvolumen vil nødvendiggøre, at der benyttes et andet filter, som f.eks. et nitratcellulose-filter (Strand et al., 2019), men det øger samtidig risikoen for, at uønsket eDNA fra andre indsamlingslokaliteter kan bidrage til, at der detekteres falske positive.

I dette studie blev der benyttet artsspecifikke primere og probe imod flodperlemusling (Rasmussen et al., 2021). Hvis undersøgelsen i stedet var baseret på mere generaliserede primere som anvendes i 'metabarcoding'-studier (fx Elbrecht & Leese 2017), hvor et større antal arter søges detekteret på én gang, er der risiko for at sådanne generaliserede primere ville have haft mindre affinitet imod flodperlemusling (Kelly et al. 2019) og dermed have gjort det endnu vanskeligere at detektere de lave niveauer af eDNA.

Den her benyttede metode med ddPCR og mange filterprøver understreger, at det kræver meget specifikke værktøjer (her artsspecifikke primere og probe) samt en bred og højfrekvent indsamling over det potentielle udbredelsesområde, hvis der eftersøges sjældne arter. Til gengæld åbner brug af ddPCR muligheden for, at meget sjældne forekomster kan blive detekteret. For detektion af sjældne arter som flodperlemusling er det en fordel at kunne lave så mange tekniske replikater som muligt. Ved at bruge ddPCR-teknologi er der, med over 10.000 dråbereplikater per enkelt vandprøveanalyse, mulighed for en langt større følsomhed for meget lave niveauer af eDNA end hvad få replikater på en qPCR-platform kan tilbyde (Baker et al., 2018; Capo et al., 2021). Udførelse af tre tekniske replikater per vandprøve på qPCR-platform kan i arbejdstid og remedier nogenlunde svare til, hvad der benyttes for at lave en enkelt ddPCR-analyse af en vandprøve med tusindvis af tekniske replikater i dråber.

4.2 Prøvetagningslokaliteter med positive fund af eDNA fra flodperlemusling

Der var positive fund af eDNA fra flodperlemusling på fire lokaliteter i Holme Å omkring Starup og Hovborg men ikke nedstrøms herfor (Figur 3). Der er således et muligt rekrutterings-potentiale for, at flodperlemuslingen kan sprede sig til den nyrestaurerede strækning i Holme Å forudsat at populationerne er i reproduktionsdygtig alder, og at fysiske og vandkemiske forhold er tilstrækkeligt gunstige. Det kan ikke udelukkes, at der findes yderligere populationer af flodperlemusling længere opstrøms i Holme Å.

Der var positive fund af eDNA fra flodperlemusling på de to lokaliteter i Varde Å ved Varde Sommerland og den ene lokalitet ved Vagtborg (længst opstrøms) (Figur 3). Ved Varde Sommerland og Vagtborg er beliggenheden af stationen længst nedstrøms placeret, hvor der tidligere blev detekteret eDNA fra flodperlemusling (Andersen & Wiberg-Larsen 2017) med anvendelse af identiske primere. Resultaterne fra de to undersøgelser kan ikke direkte sammenlignes ift. eDNA-niveauer, da Andersen & Wiberg-Larsen (2017) rapporterede resultater i form af 'cycle threshold' (Ct) værdier. Dette afspejler antallet af amplifikations-cykluser, der var nødvendige for en tilstrækkelig amplifikation af DNA ift. de fastsatte grænser for detektion. Dette kan ikke direkte oversættes til koncentrationer af eDNA som rapporteres i vores undersøgelse. Det skal dog nævnes, at ikke alle vandprøver fra Varde Sommerland og Vagtborg var positive for eDNA, og der var i alle tilfælde tale om høje Ct værdier. Dette underbygger, at koncentrationerne af eDNA har været lave. Lavere Ct værdier betyder at der er meget DNA tilsat indledende, og at det kræver få cyklusser at amplificere mængden af DNA til et tilstrækkeligt kraftigt signal, der gør det muligt at eftervise, at der indledningsvist var DNA i prøven. Omvendt er høje Ct værdier ensbetydende med, at mange amplifikationscyklusser er nødvendige i PCR forsøget for at kunne eftervise, at der indledningsvis er DNA tilstede i ekstraktionen fra filteret.

På lokaliteten nær Karlsgårdeværket, hvor WSP Danmark tidligere har foretaget dykker-undersøgelse og registreret hundredvis af levende individer af flodperlemusling, var der ingen positive fund af eDNA fra flodperlemusling (Figur 3). Dette indikerer, at der kan være tale om en forveksling mellem flodperlemusling og almindelig malermusling. Ydermere gennemførte Miljøstyrelsen og Varde Kommune en opfølgende undersøgelse i 2022 nedstrøms udløbet fra Karlsgårdeværket og registrerede her kun almindelig malermusling og dammusling (Internt notat aug. 2022, Michael Deacon, Miljøstyrelsen).

Der var positive fund af eDNA fra flodperlemusling i udmundingen af Ansager Å men ikke i udmundinger af Linding Å og Grindsted Å (Figur 3). Ansager Å har et relativt ureguleret forløb med rigelige mængder af groft substrat, og det er derfor ikke usandsynligt, at der findes flere populationer

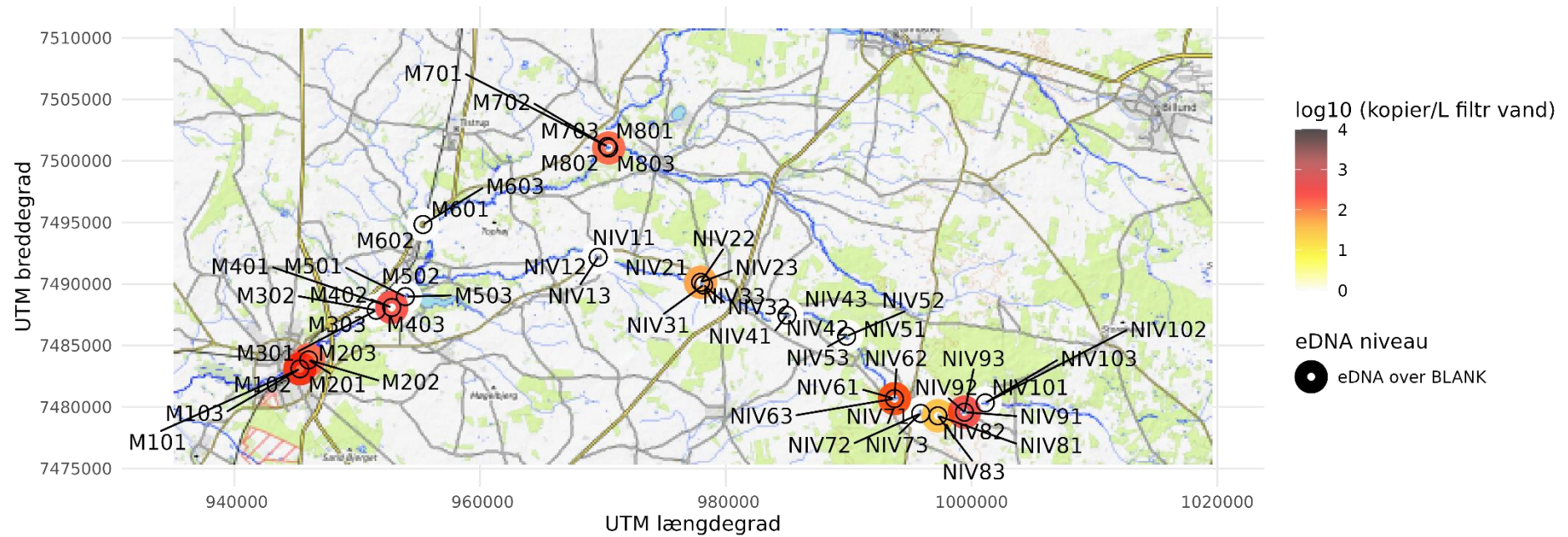
af flodperlemusling længere opstrøms i Ansager Å. Der har dog tidligere været flere dambrug i Ansager Å som qua deres forurening kan have decimeret disse populationer.

4.3 Perspektivering

På baggrund af de meget lave koncentrationer af eDNA fra flodperlemusling er der formentlig i alle tilfælde tale om ganske små populationer, muligvis kun få individer. Men denne undersøgelse kan danne grundlag for en opfølgende og målrettet søgning efter fysiske eksemplarer af levende flodperlemuslinger for at beskrive aldersstrukturer og dermed også muligheden for reproduktion hos denne art. Tilsvarende kan det være meningsfuldt at lave en kortlægning af de eksisterende miljøforhold på de lokaliteter, hvor der blev fundet eDNA fra flodperlemusling for at karakterisere og rangordne eventuelle miljømæssige flaskehalse for artens fremtidige vækst og udbredelse. Der er endvidere også god grund til at udbygge undersøgelserne af forekomst af eDNA fra flodperlemusling med mere frekvent prøvetagning, og gerne med mere vandvolumen over året og døgnet, da vi her har vist at 3 x 18 filterprøver kun akkurat er tilstrækkeligt til at eftervise et svagt spor af eDNA fra flodperlemusling. Det anbefales at indsamle fremtidige eDNA prøver over flere sæsoner i året, da flodperlemuslingens aktivitet kan veksle med årstiden, og dermed influere på mængden af eDNA der kan spores. At eDNA mængder varierer over tid og sæson er i forvejen et kendt fænomen (Agersnap et al., 2022; Jensen et al., 2022; Sigsgaard et al., 2017), og vil bestemt have en indflydelse på hvorvidt det er muligt at detektere eDNA fra noget så sjældent som flodperlemusling.

Der er god grund til at udvide det geografiske søgefelt i yderligere eDNA undersøgelser for flodperlemusling i Ansager Å. Det understreges i denne sammenhæng, at dette bør udføres ved brug af ddPCR, da denne metode giver markant større sandsynlighed for at detektere eDNA i lave koncentrationer.

Flodperlemuslingen kan både anvende bæk-/havørred og laks som vært for deres glochidier, men populationerne er værtsspecifikke, hvilket også betyder, at populationer med præference for laks ikke kan skifte vært til ørred, hvis laksen ikke længere er tilgængelig (Salonen et al., 2017). Populationer af flodperlemuslinger, der findes på vandløbsstrækninger, hvor der historisk har været lakseopgang, har typisk præference for laks mens populationer i små vandløb, hvor der ikke har været laks, har præference for ørred. Dette indikerer, at flodperlemuslingerne i Holme Å og Ansager Å formentlig er knyttet til laks som vært for glochidierne og at opgang af ynglende laks til de lokaliteter er helt betydende for en succesfuld reproduktion. Det kan undersøges i fremtidige studier – såfremt der kan lokaliseres fysiske eksemplarer – hvilken genetisk struktur og dermed hvilken vært, der er nødvendig, for de tilbageværende flodperlemuslinger i Varde Å-systemet.



Figur 3. Koncentrationer af eDNA fra flodperlemusling angivet som farvekoder på kort over Varde Å-systemet. Koncentrationerne er vist på en logaritmisk skala, der angiver antallet af kopier per L af volumen af filtreret vand. For de markerede eDNA-niveauer er detektionerne alle over den nedre grænse for kvantificering (Figur 2). Hvide ringe angiver at intet eDNA blev fundet på lokaliteten.

5 Konklusion

Undersøgelsen påviste eDNA fra flodperlemusling fra de to lokaliteter i Varde Å, hvor der tidligere har været påvist eDNA fra flodperlemuslinger. Desuden påviste undersøgelsen eDNA fra flodperlemusling på lokaliteter i Holme Å samt i udløbet af Ansager Å. Der er således tale om forekomster af flodperlemusling i Holme Å og Ansager Å, hvor arten har været opfattet som forsvundet. Det skal dog nævnes, at mængden af detekteret DNA var utrolig sparsom og formentlig udelukkende kunne dokumenteres gennem anvendelsen af ddPCR-teknik. Dette indikerer også, at der formentlig er tale om ganske få levende individer på de undersøgte lokaliteter.

Undersøgelsen tilvejebragte resultater, der kan anvendes til at indsnævre områder, hvor der ønskes opfølgende eftersøgninger af fysiske individer af flodperlemuslinger. Dette er stadig en nødvendighed ift. at få beskrevet aldersstruktur og reproduktionspotentiale for populationerne. Derudover opstår der, på baggrund af undersøgelsens resultater, spørgsmål om, hvorvidt der findes yderligere fragmenterede populationer i Ansager Å, der er et historisk nærmest ureguleret vandløb, samt længere opstrøms i Holme Å. Dette vil med fordel kunne udføres med netop ddPCR teknikken for at øge sandsynligheden for at finde DNA fra små populationer.

6 Tak til

Prøveindsamling og eDNA-analyser blev dels finansieret af Aage V. Jensen Fonden og Varde Kommune (lokaliteter i Holme Å) samt af Miljøstyrelsen (lokaliteter i øvrige dele af Varde Å-systemet). Fysiske individer af flodperlemuslinger til positive kontroller blev leveret af Liselotte Wesley Andersen (AU) samt af Marc Anglès d'Auriac (NIVA Norge). Tak til GLOBE-laboratoriet ved Københavns Universitet for lån af laboratoriefaciliteter og for hjælp fra laboranter og ansatte ved det moderne genetiske laboratorium.

7 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: Article ID: 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.
- Andersen, L.W. & Wiberg-Larsen, P. (2017). Undersøgelse af forekomsten af flodperlemusling (*Margaritifera margaritifera*) i Varde å ved brug af eDNA. Videnskabelig rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 224.
- Allan, A.E., Gordon Zhang, W., Lavery, A. C., & Govindarajan, A. F. (2021). Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA* 3: 492–514.
- Araujo, R. & Ramos, M.A. (2000). Action plan for *Margaritifera margaritifera* in Europe. Council of Europe. T-PVS (2000) 10: 1-38. Strasbourg.
- Baker, C.S., Steel, D., Nieukirk, 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: Article ID: 133.
- Bauer, G. (1992). Variation in the lifespan and size of the freshwater pearl mussel. *Journal of Animal Ecology* 61: 425-436.
- Buxton, A. S., Groombridge, J. J., Zakaria, N. B., & Griffiths, R. A. (2017). Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. *Scientific reports* 7: Article ID: 46294.
- 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 ecosystems. *Environmental DNA* 3: 343– 352.
- Elbrecht, V. & Leese, F. (2017). Validation and development of COI metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment. *Frontiers in Environmental Science* 5: Article ID: 11.
- Ficetola, G. F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguët-Covex, C., De Barba, M., Gielly, L., Lopes, C. M., Boyer, F., Pompanon, F., Rayé, G., & Taberlet, P. (2015). Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular ecology resources* 15: 543–556.
- Fredshavn, J., Sjøgaard, B., Nygaard, B., Johansson, L.S., Wiberg-Larsen, P., Dahl, K., Sveegard, G.A. & Teilman, J. (2014). Bevaringsstatus for naturtyper og arter. Habitatdirektivets artikel 17 rapportering. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi. 54s.
- Geist, J., Wunderlich, H. & Kuehn, R. (2008). Use of mollusk shells for DNA-based molecular analyses. *Journal of Molluscan Studies* 74: 337-343.

- Geist, J. (2010). Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of Conservation Genetics and Ecology. *Hydrobiologia* 644: 69-88.
- Henley, F., Grobler, P.J., & Neves, R.J. (2006). Non-invasive method to obtain DNA from freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidae). *Journal of Shellfish Research* 25: 975-977.
- IUCN (2016). The IUCN Red List of Threatened Species. *Margaritifera margaritifera* (Freshwater Pearl Mussel).
- Jensen, M.R., Egelyng Sigsgaard, E., Agersnap, S., Jessen Rasmussen, J., Baattrup-Pedersen, A., Wiberg-Larsen, P. & Thomsen, P.F. (2021). Seasonal turnover in community composition of stream-associated macroinvertebrates inferred from freshwater environmental DNA metabarcoding. *Environmental DNA*, 3: 861–876.
- Jensen, M. R., Sigsgaard, E. E., Ávila, M. D. P., Agersnap, S., Brenner-Larsen, W., Sengupta, M. E., Xing, Y., Krag, M.A., Knudsen, S.W., Carl, H., Møller, P.R. & Thomsen, P. F. (2022). Short-term temporal variation of coastal marine eDNA. *Environmental DNA* 4: 747-762.
- Kann, O. (2006). Varde å, Ribe Amt, gensnoning og udlægning af gydebanks. Pp. 67-70 i Madsen S & Debois P (Red.) Vandløbsrestaurering i Danmark – 24 eksempler. Storstrøms Amt, Teknik- og Miljøforvaltningen, 97s.
- Kelly, R.P., Shelton, A.O., & Gallego, R. (2019). Understanding PCR Processes to Draw Meaningful Conclusions from Environmental DNA Studies. *Scientific reports*, 9: Article ID: 12133.
- Kibbe, W.A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research* 35: 43–46.
- 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.
- 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: Article ID: 153093.
- Klymus, K.E., Merkes, C.M., Allison, M.J., Goldberg, C.S., Helbing, C.C., Hunter, M.E., Jackson, C.A., Lance, R.F., Mangan, A.M., Monroe, E.M., Piaggio, A.J., Stokdyk, J.P., Wilson, C.C. & Richter, C.A. (2020). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA* 2: 271–282.
- 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: Article ID: 14064.
- Mollusk Specialist Group (1996). *Margaritifera margaritifera*. The IUCN Red List of Threatened Species 1996: e.T12799A3382532.

- Porsgaard, J. (2015). Flodperlemuslingen i Varde Å. Medieudvalget i VSF. <http://varde-sportsfiskerforening.di/flodperlemusling-varde-aa/>
- R Core Team (2022). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rasmussen, J.J., Andersen, L.W., Johnsen, T.J., Thaulow, J., d'Auriac, M.A., Thomsen, S.N. & Hesselsøe, M. (2021). Dead or alive – Old empty shells do not prompt false-positive results in environmental DNA surveys targeting the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). *Aquatic Conservation: Marine & Freshwater Ecosystems* 31: 2506-2514.
- RStudio Team, 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL.
- Rodríguez-Ezpeleta, N., Morissette, O., Bean, C. W., Manu, S., Banerjee, P., Lacoursiere-Roussel, A., Beng, K. C., Alter, S. E., Roger, F., Holman, L. E., Stewart, K. A., Monaghan, M. T., Mauvisseau, Q., Mirimin, L., Wangenstein, O. S., Antognazza, C. M., Helyar, S. J., de Boer, H., Monchamp, M. E., ... Deiner, K. (2021). Trade-offs between reducing complex terminology and producing accurate interpretations from environmental DNA: Comment on “Environmental DNA: What's behind the term?” by Pawlowski et al. The total pool of DNA isolated from the environment. *Molecular Ecology* 30: 4601–4605.
- Rourke, M.L., Walburn, J.W., Broadhurst, M.K., Fowler, A.M., Hughes, J.M., Fielder, D.S., DiBattista, J.D. & Furlan, E.M. (2023). Poor utility of environmental DNA for estimating the biomass of a threatened freshwater teleost; but clear direction for future candidate assessments. *Fisheries research* 258: Article ID: 106545.
- Salter, I., Joensen, M., Kristiansen, R., Steingrund, P., & Vestergaard, P. (2019). Environmental DNA concentrations are correlated with regional biomass of Atlantic cod in oceanic waters. *Communications biology* 2: Article ID: 461.
- 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.
- Sigsgaard, E.E., Nielsen, I.B., Carl, H., Krag, M.A., Knudsen, S.W., Xing, Y., Holm-Hansen, T.H., Møller, P.R. & Thomsen, P.F. (2017). Seawater environmental DNA reflects seasonality of a coastal fish community. *Marine Biology* 164: Article ID: 128.
- 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.
- Stoeckle, B.C., Kuehn, R. & Geist, J. (2016). Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.): a substitute for classical monitoring approaches? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 26: 1120-1129.
- Strand, D.A., Johnsen, S.I., Rusch, J.C., Agersnap, S., Larsen, W.B., Knudsen, S.W., Møller, P.R. & Vrålstad, T. (2019). Monitoring a Norwegian freshwater crayfish tragedy: eDNA snapshots of invasion, infection and extinction. *Journal of Applied Ecology* 56: 1661–1673.

- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L.H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 1789–1793.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L. & Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 2565–2573.
- Urban, P., Bekkevold, D., Hansen, B.K., Jacobsen, M.W., Nielsen, A., & Nielsen, E.E. (2023). Using eDNA to estimate biomass of bycatch in pelagic fisheries. *Environmental DNA* (in press).
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L.D., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T.L., Miller, E., Bache, S.M., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D.P., Spinu, V., Takahashi, K., Vaughan, D., Wilke, C., Woo, K. & Yutani, H. (2019). “Welcome to the tidyverse.” *Journal of Open Source Software* 4: Article ID: 1686.
- Wickham, H., François, R., Henry, L. & Müller K. (2022). *_dplyr: A Grammar of Data Manipulation_*. R package version 1.0.10.
- Wickham, H. & Girlich, M. (2022). *_tidyr: Tidy Messy Data_*. R package version 1.2.1.
- Wickham, H. & Seidel, D. (2022). *_scales: Scale Functions for Visualization_*. R package version 1.2.1.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York
- Wood, S.A., Biessy, L., Latchford, J.L., Zaiko, A., von Ammon, U., Audrezet, F., Cristescu, M.E., & Pochon, X. (2020). Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system. *Science of the Total Environment* 704: Article ID: 135314.
- WSP (2021). Baseline undersøgelse af flodperlemusling i Varde Å. Internt notat.
- Yates, M.C., Glaser, D.M., Post, J.R., Cristescu, M.E., Fraser, D.J., & Derry, A.M. (2021). The relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature is strengthened by allometric scaling. *Molecular Ecology* 30: 3068–3082.

Bilag 1

Tabel 1. Dato, tidspunkt og koordinater for indsamlede vandprøver samt filtreret vandvolumen og målt koncentration af eDNA fra flodperlemusling på prøveindsamlingslokaliteterne. Total eDNA koncentrationen omfatter alt eDNA fra alle organismer, mens flodperlemusling eDNA kun omfatter eDNA for flodperlemuslingen.

PrøveID	Dato	Tids-punkt	Total eDNA koncentration (ng/ μ L)	Bredde-grad	Længde-grad	Filtreret volumen (mL)	Flodperlemusling eDNA kopier / uL ekstrakt	Flodperlemusling eDNA kopier / L filtreret vand
M101	2022-09-06	13:40	3490	8.492131	55.619812	180	0	0
M102	2022-09-06	13:40	6340	8.492131	55.619812	175	2	273
M103	2022-09-06	13:40	5770	8.492131	55.619812	190	1	67
M201	2022-09-06	14:00	5570	8.498486	55.623508	165	1	151
M202	2022-09-06	14:00	5500	8.498486	55.623508	150	0	0
M203	2022-09-06	14:00	4800	8.498486	55.623508	170	0	0
M301	2022-09-06	14:55	3240	8.547941	55.643945	170	0	0
M302	2022-09-06	14:55	3140	8.547941	55.643945	175	0	0
M303	2022-09-06	14:55	5680	8.547941	55.643945	150	0	0
M401	2022-09-06	15:10	3370	8.559293	55.644007	200	0	0
M402	2022-09-06	15:10	6280	8.559293	55.644007	180	0	0
M403	2022-09-06	15:10	3820	8.559293	55.644007	185	2	221
M501	2022-09-06	15:30	6890	8.569237	55.648002	185	0	0
M502	2022-09-06	15:30	6910	8.569237	55.648002	180	0	0
M503	2022-09-06	15:30	5080	8.569237	55.648002	175	0	0
M601	2022-09-06	17:15	2930	8.582143	55.679265	150	0	0
M602	2022-09-06	17:15	6650	8.582143	55.679265	150	0	0
M603	2022-09-06	17:15	4220	8.582143	55.679265	150	0	0
M701	2022-09-06	18:10	6630	8.716839	55.7108105	200	0	0
M702	2022-09-06	18:10	7400	8.716839	55.7108105	220	0	0
M703	2022-09-06	18:10	5840	8.716839	55.7108105	250	0	0
M801	2022-09-06	18:15	2980	8.717854	55.710732	200	0	0
M802	2022-09-06	18:15	3140	8.717854	55.710732	150	1	155
M803	2022-09-06	18:15	3410	8.717854	55.710732	200	0	0
NIV11	2022-09-07	11:15	5490	8.71015	55.665774	195	0	0
NIV12	2022-09-07	11:15	4730	8.71015	55.665774	185	0	0
NIV13	2022-09-07	11:15	5210	8.71015	55.665774	200	0	0
NIV21	2022-09-07	12:15	5280	8.7850459	55.654771	200	1	60
NIV22	2022-09-07	12:15	5300	8.7850459	55.654771	190	0	0
NIV23	2022-09-07	12:15	3680	8.7850459	55.654771	200	0	0
NIV31	2022-09-07	12:40	6050	8.7872275	55.6543768	200	0	0
NIV32	2022-09-07	12:40	5610	8.7872275	55.6543768	210	0	0
NIV33	2022-09-07	12:40	4890	8.7872275	55.6543768	200	0	0
NIV41	2022-09-07	13:15	6080	8.848186	55.641875	200	0	0
NIV42	2022-09-07	13:15	3480	8.848186	55.641875	220	0	0
NIV43	2022-09-07	13:15	6700	8.848186	55.641875	180	0	0
NIV51	2022-09-07	14:30	9320	8.891781	55.633273	200	0	0

Tabel 1. Dato, tidspunkt og koordinater for indsamlede vandprøver samt filtreret vandvolumen og målt koncentration af eDNA fra flodperlemusling på prøveindsamlingslokaliteterne. Total eDNA koncentrationen omfatter alt eDNA fra alle organismer, mens flodperlemusling eDNA kun omfatter eDNA for flodperlemuslingen.

PrøveID	Dato	Tids- punkt	Total eDNA koncentration (ng/μL)	Bredde- grad	Længde- grad	Filtreret volumen (mL)	Flodperlemusling eDNA kopier / uL ekstrakt	Flodperlemusling eDNA kopier / L filtreret vand
NIV52	2022-09-07	14:30	6910	8.891781	55.633273	200	0	0
NIV53	2022-09-07	14:30	4230	8.891781	55.633273	230	0	0
NIV61	2022-09-07	16:00	6480	8.926734	55.607504	250	0	0
NIV62	2022-09-07	16:00	6510	8.926734	55.607504	300	3	183
NIV63	2022-09-07	16:00	7790	8.926734	55.607504	300	0	30
NIV71	2022-09-07	16:40	5860	8.945915	55.601439	300	0	0
NIV72	2022-09-07	16:40	4840	8.945915	55.601439	330	0	0
NIV73	2022-09-07	16:40	4970	8.945915	55.601439	350	0	0
NIV81	2022-09-07	17:40	5220	8.958539	55.600447	250	0	0
NIV82	2022-09-07	17:40	4950	8.958539	55.600447	290	0	32
NIV83	2022-09-07	17:40	6300	8.958539	55.600447	300	0	0
NIV91	2022-09-07	19:35	6010	8.9779138	55.6019411	240	0	0
NIV92	2022-09-07	19:35	5330	8.9779138	55.6019411	200	3	260
NIV93	2022-09-07	19:35	6770	8.9779138	55.6019411	220	0	0
NIV101	2022-09-07	18:55	1270	8.9931343	55.6057663	150	0	0
NIV102	2022-09-07	18:55	1130	8.9931343	55.6057663	150	0	0
NIV103	2022-09-07	18:55	5360	8.9931343	55.6057663	150	0	0

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
CVR: 35431063
www.niva-danmark.dk