

E-DNA

Niras



Best practice: eDNA til Naturovervågning

Rigkilde LIFE afslutningsseminar
1. December 2022 kl 14.30-15

Martin Hesselsøe og Nadiéh de Jonge, NIRAS

Martin Hesselsøe



MHES@NIRAS.DK

+45 40979503

- **Københavns Universitet** (Ph.D. student 1998-2001)
- **Aalborg Universitet** (Post doc 2001-2006).
- **Amphi Consult**, Aalborg 1993-2018 (naturovervågning, naturgenopretning mm).
- **NIRAS A/S** fra 2018 (Markedschef for natur og biodiversitet).

Eksempler på mine større eDNA F&U projekter siden 2012:

- **"DNA Kit for tracking of aquatic biodiversity 2012-2015"**. Amphi Consult, Eurofins and University of Copenhagen. Højteknologifonden.
- **"DNA-based species identification in bulk tissue samples from environmental monitoring 2015-2018"**. Amphi Consult and Aalborg Universitet. Innovationfond Denmark
- **"DNA based Performance Indicators of Natural and Engineered Ecosystems (DNA-PINE) 2020-2022"** NIRAS A/S and Aalborg Universitet. Innovationfond Denmark.
- **"Spildevandets påvirkning af biodiversitet (SPaB) 2022-2024"** SK Forsyning A/S, NIRAS A/S, Aalborg Universitet, DMR A/S- Støtte fra Ecoinnovation - MUDP.

Nadieh de Jonge

Erhvervsforsker i NIRAS 2020-2022



- Nøgleord: Molekylær økologi, miljøovervågning, naturbevaring, **eDNA**
- **2014-2018: PhD studerende, Aalborg Universitet**, "Microbial community dynamics in Anaerobic Digestion", Innovationsfonden
- **2018-2020: Postdoctoral fellow, Aalborg Universitet**, "Novel screening approaches for identification of enzymes of biotechnological interests directly in complex microbial consortia (IKEBA)", Novo Nordisk Fonden
- **2020-nov. 2022: Erhvervsforsker, NIRAS A/S & Aalborg Universitet**, "DNA-based Performance Indicators in Natural and Engineered ecosystems (DNA-PINE)", Innovationsfonden
- **Dec. 2022- : Tenure-track adjunkt, Aalborg Universitet, eDNA-forskning**, miljøvurdering med molekylære teknikker, anvendte forskningsprojekter, bl.a. "Spildevandets påvirkning af biodiversitet (SPaB)", MUDP, et samarbejde mellem SK Forsyning A/S, NIRAS A/S, Aalborg Universitet og DMR A/S
- **eDNA fokus:** Udvikling af nye (DNA-)metoder og redskaber til undersøgelse og vurdering af naturområder

Program:

- Hvad er eDNA
- Prøveindsamling
- Analyse an enkeltarter (fx qPCR)
- Analyse af mange arter (Metabarcoding med DNA sekventering)
- Afslutning

*DNA til undersøgelse af biodiversitet:
environmental DNA, eDNA, miljø DNA*



Her startede eDNA i Danmark:

11. december 2011

En hel sø i et snapseglas

Naturovervågning

MOLECULAR ECOLOGY

Molecular Ecology (2011)

doi: 10

FROM THE COVER

Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA

PHILIP FRANCIS THOMSEN,^{1*} JOS KIELGAST,^{1*} LARS L. IVERSEN,[†] CARSTEN WIUF,[‡] MORTEN RASMUSSEN,^{*} M. THOMAS P. GILBERT,^{*} LUDOVIC ORLANDO^{*} and ESKE WILLERSLEV^{*}

^{*}Centre for GeoGenetics, Natural History Museum of Denmark, University of Copenhagen, Øster Voldgade 5, Copenhagen, Denmark, [†]Freshwater Biology Section, Department of Biology, University of Copenhagen, 3400 Hillerød, Denmark, [‡]Bioinformatics Research Center (BiRC), Aarhus University, C. F. Møllers Allé 1, Aarhus, Denmark

SPECIES MONITORING BY ENVIRONMENTAL DNA 5

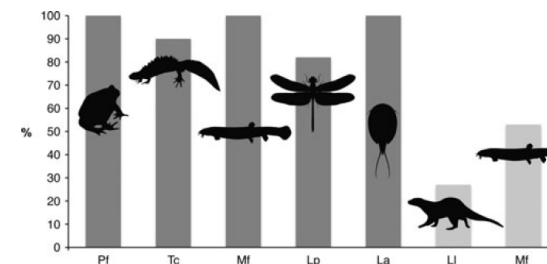
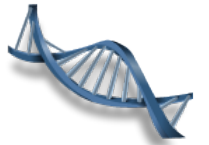


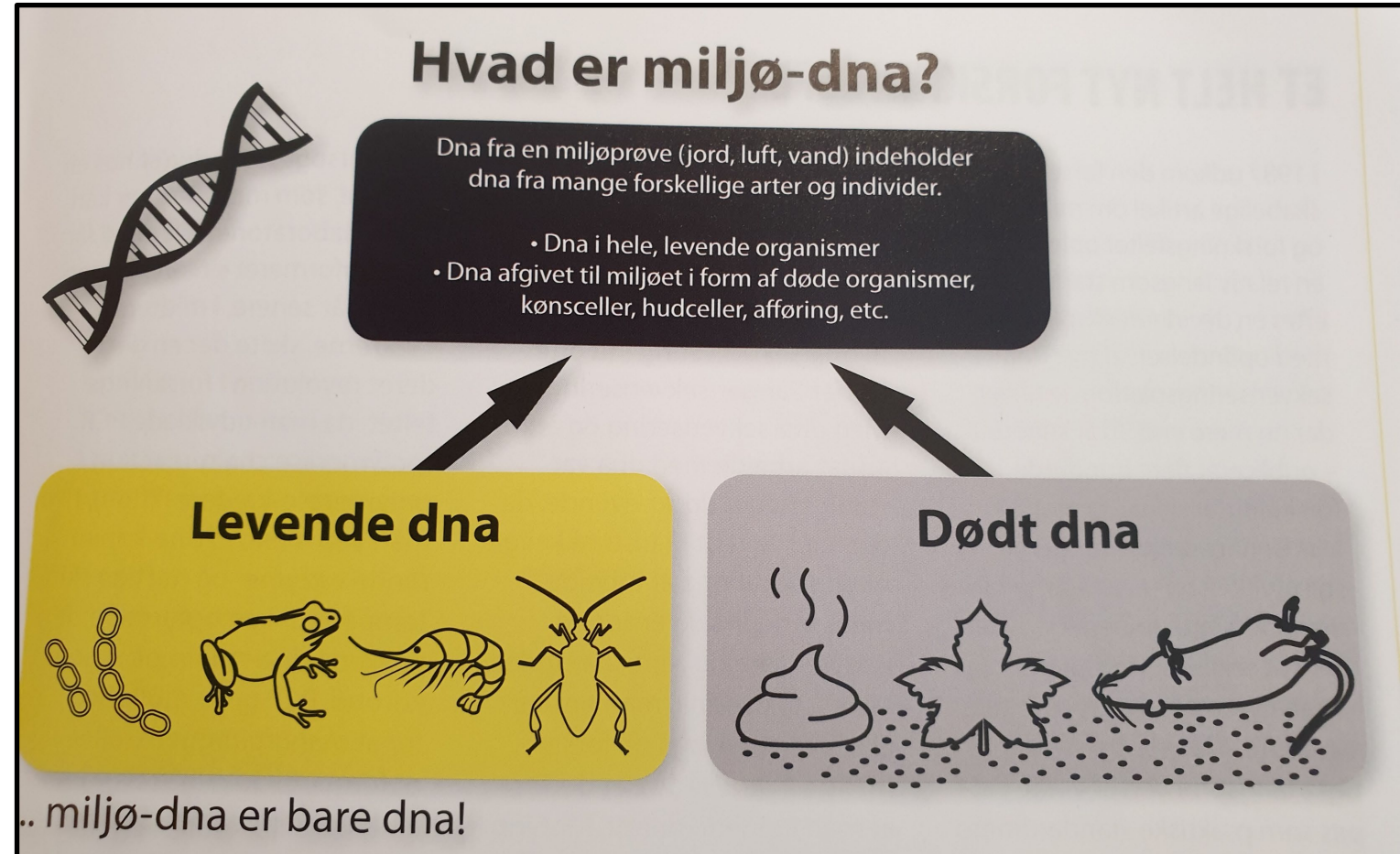
Fig. 2 Environmental DNA detection rates by qPCR in natural freshwater ponds with 100% occurrence of the species confirmed in the field (dark grey) or larger freshwater systems with known occurrence in the area (light grey). Detection rates are given in percentage positive localities out of the total number of localities surveyed for each species. Data covers amphibians: Pf (*Pelobates fuscus*, $n = 9$) and Tc (*Triturus cristatus*, $n = 11$); fish: Mf (*Misgurnus fossilis*, $n = 11$ ponds and $n = 15$ streams—light grey); insects: Lp (*Leucorhina pectoralis*, $n = 11$); crustaceans: La (*Lepidurus apus*, $n = 10$) and mammals: LI (*Lutra lutra*, $n = 15$ streams and lakes).

- DNA findes i alle levende celler
- Alle organismer udskiller døde eller døende celler til miljøet
- DNA-spor som kan findes i miljøet kalder vi miljø-DNA, environmental-DNA eller bare eDNA.

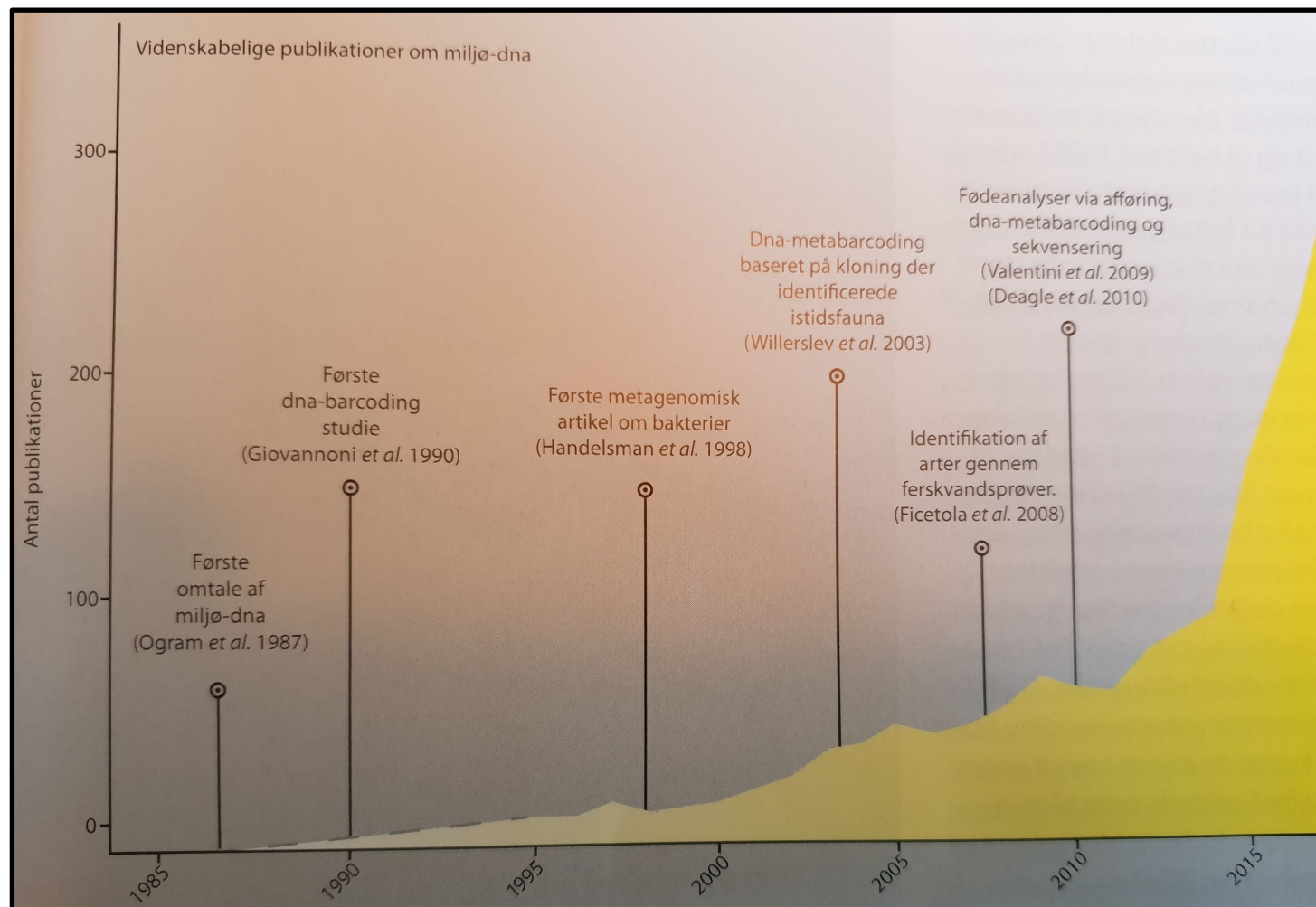
DNA
A new tool for biological surveys



Hvad eDNA, environmental DNA eller miljø-DNA?



Videnskabelige publikationer om environmental DNA:





DNA –prøvetyper fra miljøet:

- **Vand** (søer, åer, havet) –(eDNA)
- **Blandede vævsprøver** (bunddyr, planter mm)
- Jord (dyr, planter, bakterier, svampe mm)
- Teknisk vand (drikke- og procesvand)
- Bioreaktorer (biogas, renseanlæg mm)

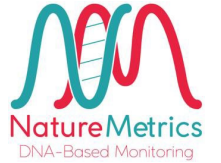
Potentielle fordele – eDNA

- Sammenlignet med konventionelle undersøgelser
- Standardiseret og reproducerbar
- Uafhængigt af artseksperter
- Uafhængig af vejrforhold
- Non-invasiv
- Potentiel ressourcebesparende
- Potentiel højere sensitivitet
- Forbedret værktøj til beslutningstagere

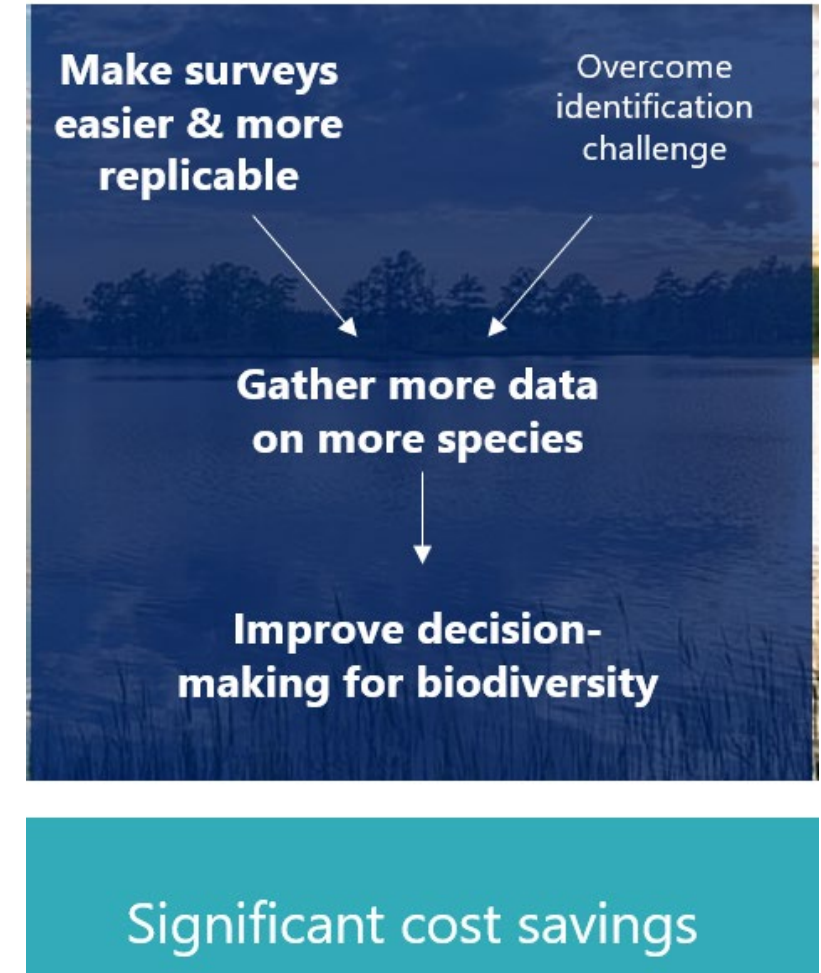


Muligheder– eDNA

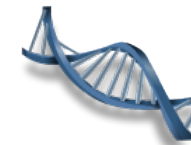
Benefits



- “Whats in it for me?”
- Hvilke arter findes?
- Findes bestemte beskyttede arter?
- Baseline af biodiversitet i miljøvurdering.
- Biologisk tilstand før, under og efter.
- DNA data som supplement til konventionel undersøgelse.
- Flere data om flere arter i samme indsats.
- Mere viden - Vidensbaseret forvaltning



eDNA –begrænsninger:



- Ingen tælle data (-men andre kvantitative potentialer – relative sammenligninger).
- Ingen alder og størrelses information.
- Rummelige usikkerheder (-eDNA “flyder med strømmen”).
- Begrænset af reference databaserne, som skal indeholde DNA sekvenser for de arter vi leder efter (ellers finder vi “ukendte” arter).
- Måske ukendte regionale sekvensforskelle – “mærkelige” resultater skal derfor altid vurderes af ekspert.
- Negative DNA-analyseresultater ikke kan tages som udtryk for artens fravær på en lokalitet (-DNA spor er som nålen i høstakken-).

eDNA – trin fra prøvetagning til resultat

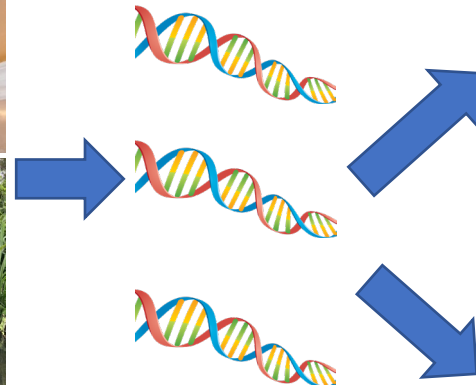
Prøvetagning

eDNA
ekstraktion

Opformering
af DNA-
barcode(s)

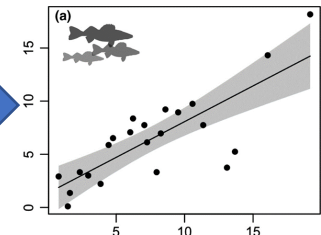
eDNA
sekventering

Analyse



	A	B	C
Archaea	6	7	1
Bacteria	2505	2836	2171
Fungi	75	162	120
Cerczoa	30	44	12
Ciliophora	29	140	42
Cryptomonads	71	74	31
Diatomea	127	452	166
Dinoflagellata	6	6	8
Chlorophyceae	42	68	134
Chrysophyceae	258	307	124
Eustigmatophyceae	9	9	13
Trebouxiphyceae	24	51	71
Ulvoiphyceae	23	43	26
Gastrotricha	4	5	8
Nematozoa	2	5	3
Annelida	3	4	3
Arthropoda	13	36	11
Mollusca	1	2	0
Chordata	5	15	0
Other Eukaryotes	127	186	75
Total	3360	4452	3019

Metabarcoding =
artsliste over en
dyr gruppe



qPCR = følsom
detektion af 1
art ad gange

Nålen i høstakken!

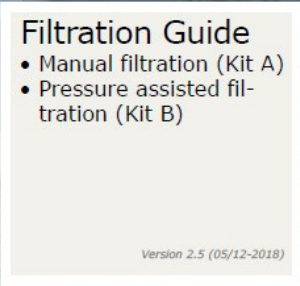


- DNA kan være som nål i en høstak.
- Opkoncentrering er vigtig.
- Forskellige filtre og filtreringsmetoder.



Press out remaining water in the filter with a syringe filled with air.

17



Requisition

KIT A

Requestion form for cDNA samples
 (Form with fields for Date, Sample ID, Location, Quantity, and a table for Sample Information)

Label

Preservation liquid

Luer locks

Gloves

60 ml syringe

1 ml syringe

Sterivex filter

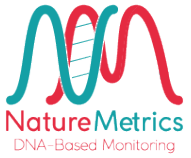
Sample Kit A includes a requisition, unique labels, gloves, Sterivex filter, two luer lock stoppers, 1 ml syringe, 60 ml syringe, and preservation liquid.

- 

eDNA Metabarcoding – in the field



@Naturemetrics



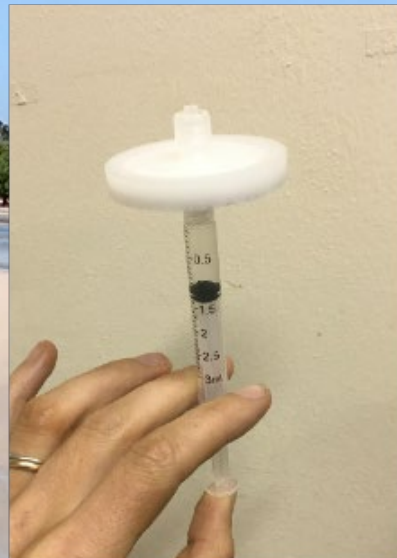
The filter



Filter water



Preserve



Cap ends



Post to lab



No pump

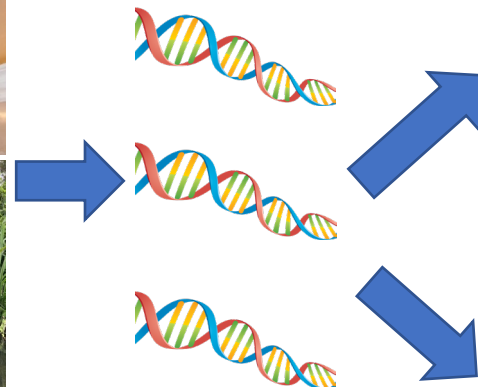
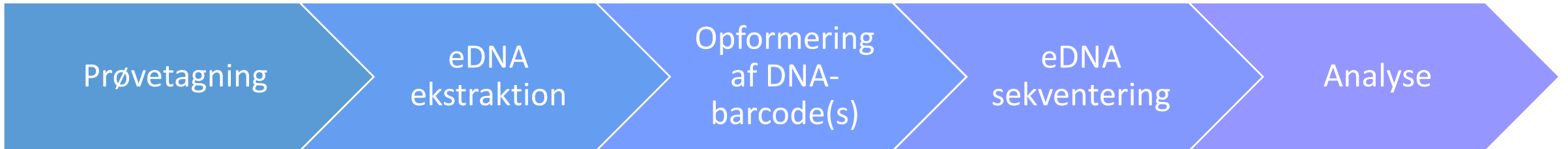
No refrigeration

Reduced clogging

Low contamination risk

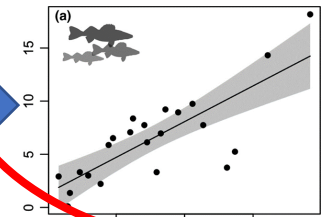
eDNA – teknikker

-Enkeltartsdetektion (qPCR)



	A	B	C
Archaea	6	7	1
Bacteria	2505	2636	2171
Fungi	75	162	120
Cercaria	30	44	12
Ciliophora	29	140	42
Cryptomonads	71	74	31
Diatomea	127	452	166
Dinoflagellata	6	6	8
Chlorophyceae	42	68	134
Chrysophyceae	258	307	124
Eustigmatophyceae	9	9	13
Trebouxiphyceae	24	51	71
Ulvophyceae	23	43	26
Gastrotricha	4	5	8
Nematozoa	2	5	3
Annelida	3	4	3
Arthropoda	13	36	11
Mollusca	1	2	0
Chordata	5	15	0
Other Eukaryotes	127	186	75
Total	3360	4452	3019

Metabarcoding = artsliste over en dyr gruppe



qPCR = følsom detektion af 1 art ad gange

Validering af eDNA for Naturstyrelsen (2014):

Evaluering af eDNA-detektion til overvågning af vandhulsarter

Pilotstudie af konventionelle feltmetoder og eDNA-baseret artsovervågning for stor vandsalamander, løgfro og stor kærguldsmed



Rekvirent: Naturstyrelsen (Michael Hastrup og Søren Oldenburg)
Feltarbejde og prøveindsamling: Jos Kielgast, Philip F. Thomsen, Wouter de Vries, Per Klit Christensen, Morten Larsen, Lars Chr. Adrados og Lars Iversen.
Laboratorium: Sara Starke og Søren Bastholm
Tekst: Jos Kielgast, Lars Iversen, Martin Hesselsoe
Version: 3. udgave 11. januar 2013



Amphi Consult

Evaluering af eDNA detektion til overvågning af vandhulsarter



Validering:



vs.

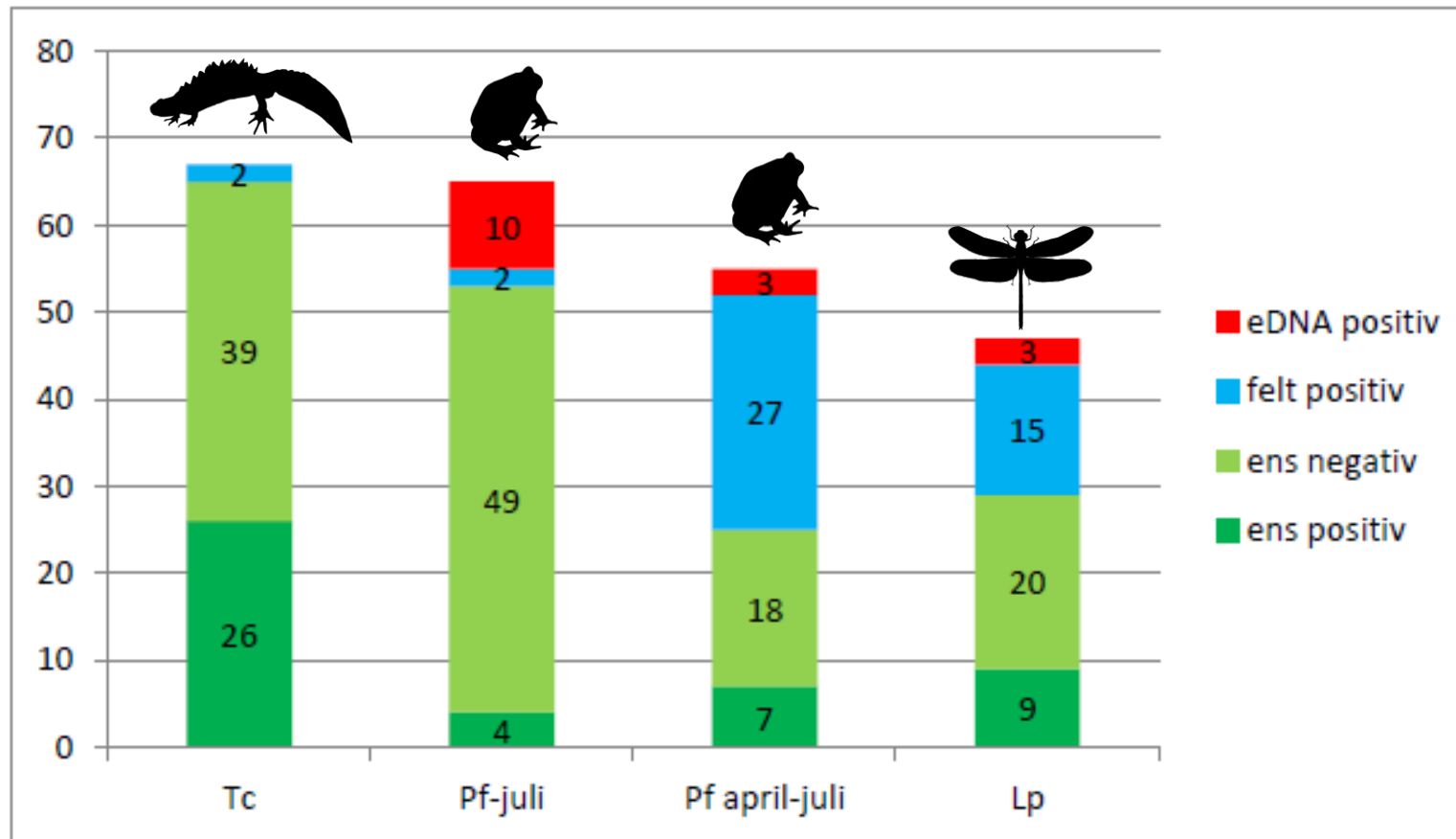


		eDNA-monitering	
		+	-
Felt-monitering	+		
	-		

Konventionelle metoder



Resultater validering



		eDNA-monitoring	
		+	-
Felt-monitoring	+		
	-		

Kan vi finde løgfrø med eDNA?



Figur 1: Løgfrø fotograferet mens den fouragerer på land om natten (Foto: Martin Hessel-søe).

*Hesseløe, Thomsen, Knudsen,
Møller, Bruun: Vand & Jord
2019 (3): 100-102*

Kan vi finde løgfrø med eDNA?



102 • Vand & Jord

Tabel 1: Vurdering af eDNA resultater fra Lübker Golf Resort i Syddjurs Kommune i 2018. Høje positive eDNA signaler blev observeret i de fire undersøgte lokaliteter. På den baggrund er resultaterne tolket kvantitativt. Den relative fordeling af eDNA mellem de fire undersøgte lokaliteter fremgår af den sidste kolonne (se også teksten).

	eDNA analyse	Filtrering	Søareal	Fordeling af eDNA
	Kvalitativ	Vol (ml)	(m ²)	(%)
Teknisk sø B	Positiv	700	8458	60-70%
Lübker 42	Positiv	200	179	1-2%
Lübker 34	Positiv	150	326	13-15%
Lübker 35	Positiv	200	529	15-23%

på land om natten (Foto: Martin Hessel-

Lars D Bruun, biolog i Syddjurs Kommune:

«Med eDNA metoden kan jeg få flere oplysninger om lokaliteten på kort tid, og resultaterne kan bruges til at prioritere vores arbejde med naturbeskyttelse og naturpleje»

Dyndsmerling

- Miljøstyrelsen 2019



Forekomst af dyndsmerling undersøgt med eDNA screening

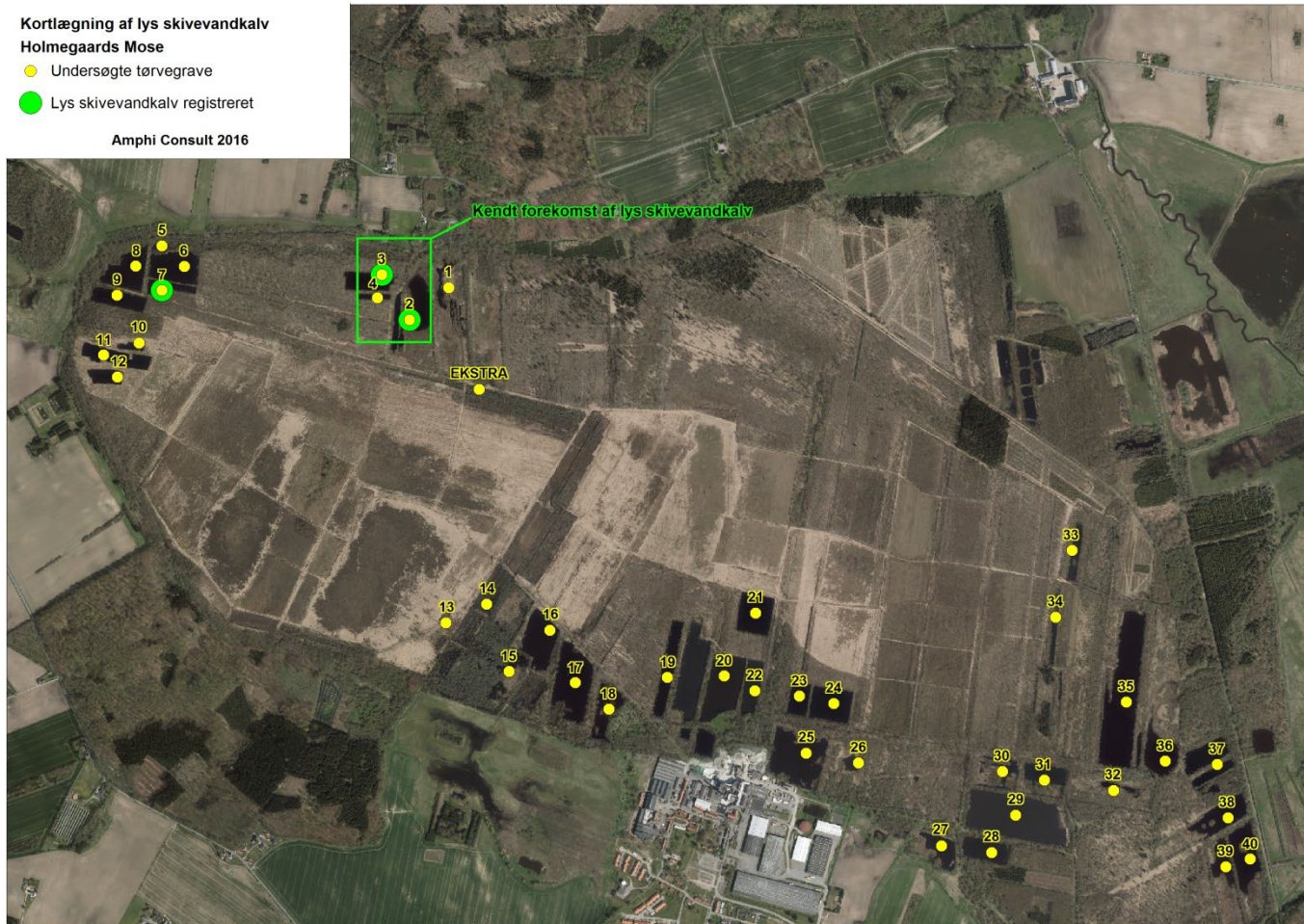
- Kan dyndsmerling overvåges med eDNA?
- Ja!
- Prøver bør tages for hver 200 m i vandløb med vandbevægelse

Notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 3 marts 2020 | 22



eDNA detektion af Lys skivevandkalv (*Graphodeus biliniatus*) i Holmegaards Mose (Naturstyrelsen: Raised Bog LIFE projekt):



Forsigtig kvantitativ tilgang:

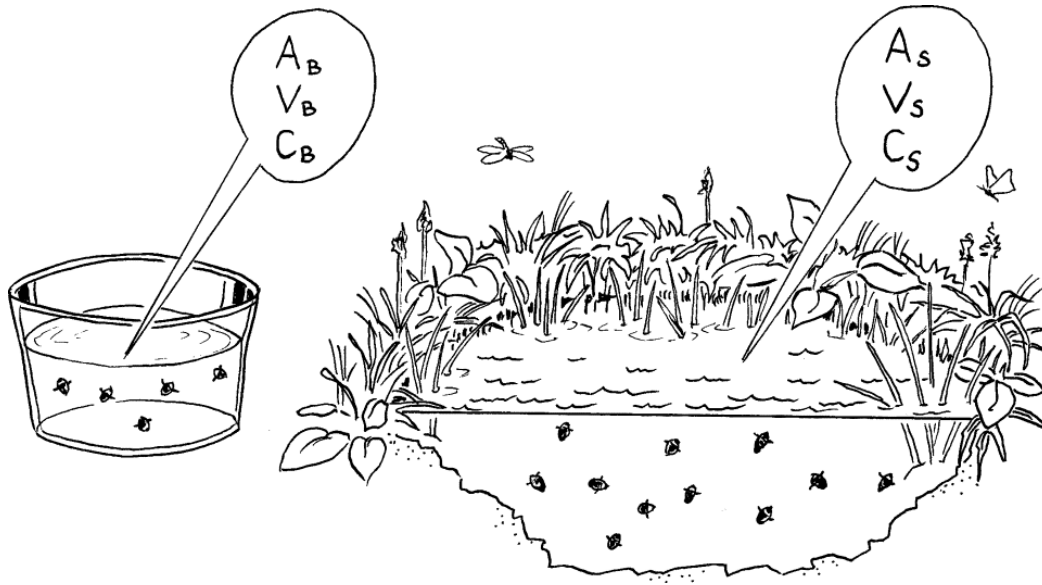


Sø no. 3
(50x130x1m= 6500 m³)

6 mio. L vand



Spand: 18 biller
40 L vand



- A: Antal biller
- C: Koncentration af eDNA
- V: Volume



$$A_S = A_B \cdot \frac{C_S \cdot V_S}{C_B \cdot V_B}$$

Find beskyttet vandbille med e-DNA

To vandbillearter i Danmark er beskyttet af Habitatdirektivet. Vandbillerne er meget vanskelige at finde og artsbestemme, selv for de dygtigste biologer. Myndighederne skal vide, hvor billerne findes for at kunne sikre den beskyttelse, der kræves i Habitatdirektivet. DNA-teknikker kan hjælpe med at finde både vandbiller og andre vandlevende dyrearter. Måske kan DNA-teknologien også bruges til kvantificering.

MARTIN HESSELSØE, MORTEN LARSEN,
STEEN W. KNUDSEN, LARS LØNSMAN
IVERSEN, PETER RASK MØLLER &
TORBEN HVIID

Østdanmarks største højmos

Holmegaard Mose, der ligger 10 km nord for Næstved, er Østdanmarks største højmos. Den er privatejet, men Naturstyrelsen har siden 2005 været plejemyndighed i kraft af fredningen og en frivillig tinglyst aftale.

Højmosen er opstået som en tilgroningsmos efter sidste istid. I alt blev der over et areal på 500 ha opbygget en tørvepude på op mod 6 meters tykkelse. Fra starten af 1800-tallet gik udviklingen den anden vej. Tørv udgør en brændselsresurse, og fra 1825, hvor Holmegaard Glasværk blev etableret, og til midt i 1950'erne, blev højmosen udnyttet intensivt.

Holmegaard Mose er nu en mosaik af helt



Figur 1: Lys skivevandkalv (*Graphodeus bilineatus*). Arten er opført på Habitatdirektivets bilag II og bilag IV (Foto: Lars Iversen, Amphi Consult).

*Hesselsoe; Larsen; Knudsen; Iversen; Møller;
Hviid: Vand & Jord 2017(2) p. 74-76.*

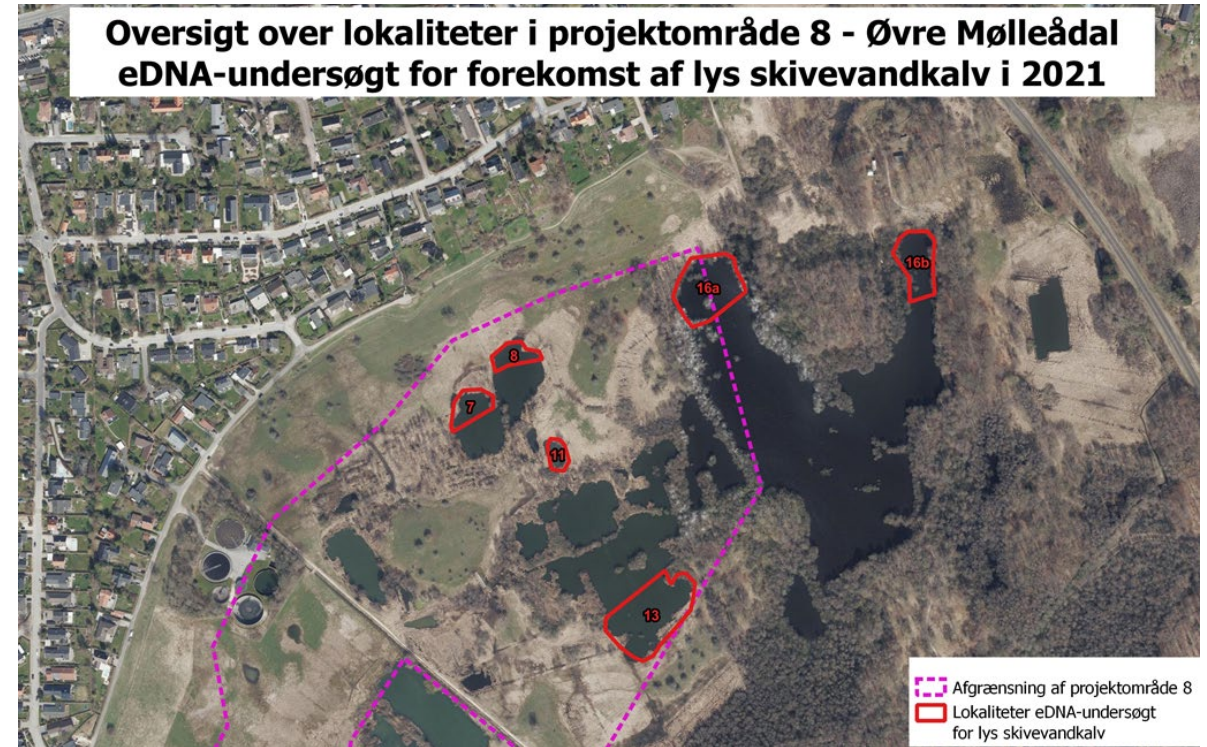
Tabel 1 Antal vandbiller i tørvegrav estimeret ved udtyndingsmetoden og ved e-DNA. De to uafhængige metoder rammer samme størrelsesorden.

Metode	Antal (A_5) vandbiller i tørvegrav nr. 3
Estimeret ved udtynding (Konventionel metode)	595
Estimeret ved e-DNA måling	1406

LIFE RigKilde: Lys skivevandkalv



- Resultater
- Indsamling af 6 vandprøver fra mulige levesteder af lys skivevandkalv
- Artsspecifik PCR-analyse af 5 tekniske replikater for hver vandprøve viste ingen positive resultater for de 6 testede lokaliteter
 - Brug af vævsprøve *G. bilineatus* som kontrol
- Konklusion: Tilstedeværelse af lys skivevandkalv er ikke påvist.
- Husk "Nålen i høstakken": Negative DNA-analyseresultater ikke kan tages som udtryk for artens fravær på en lokalitet



Forsigtig tolkning af data fra qPCR

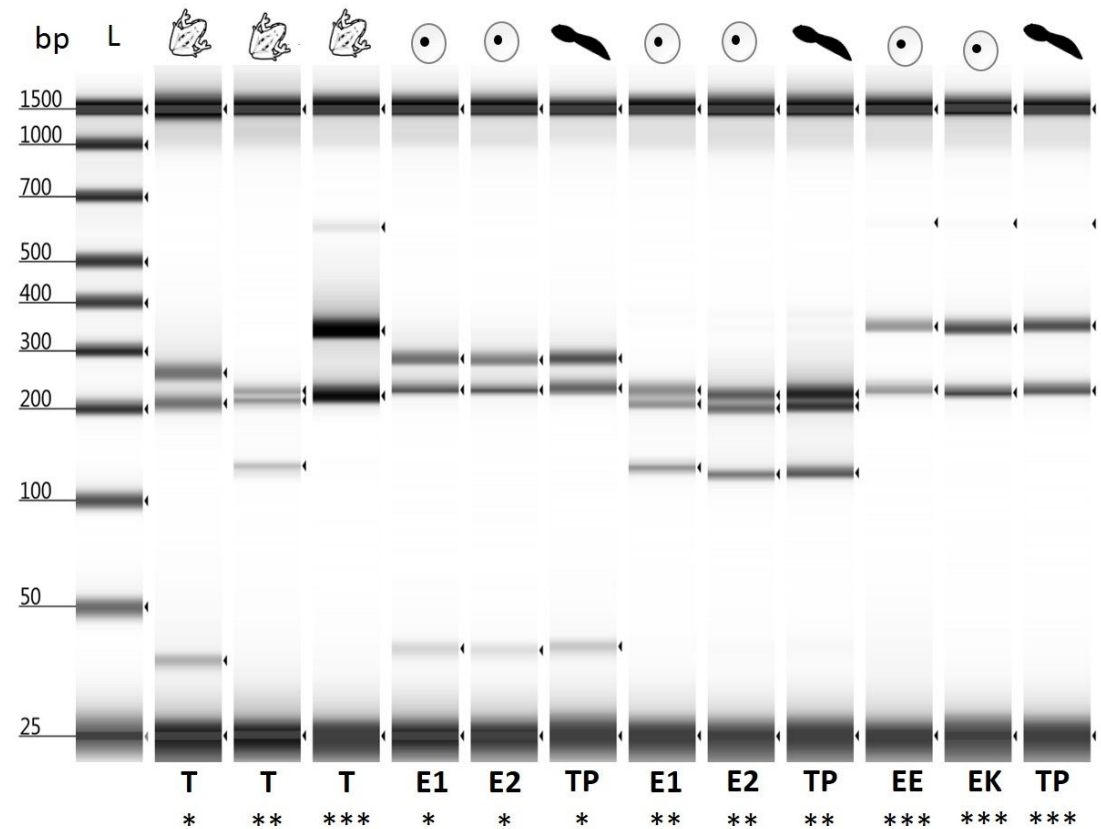
- **Positive and quantitative interpretation DNA possible**
- **Positive (no quantification)**
- **Possible positive (“Måske” positive)**
- **Negative**

Rigkilde LIFE DNA til artsbestemmelse af paddeæg:



Artsidentifikation af paddeæg

- Identifikation paddeæg fra de brune frøer (spidssnudet frø, butsnudet frø og springfrø) kan være vanskelig eller umulig.
- NIRAS har udviklet en enkelt, og nøjagtig metode til artsidentifikation af paddeæg fra disse 3 arter.
- Et enkelt æg indgår i et kort protokol til DNA ekstraktion, PCR, og efterfølgende restriktions analyse. Analysen kan adskille *R. arvalis*, *R. temporaria*, og *R. dalmatina* med 100% sikkerhed.
- Teknikken blev anvendt for at validere artsidentifikation af paddeæg fra flere lokaliteter under LIFE RigKilde



* = *R. arvalis*, ** = *R. temporaria*, *** = *R. dalmatina*

Rigkilde LIFE DNA til artsbestemmelse af paddeæg:

Lokalitet	Art bestemt i felten	Kommentar til analyse	Resultat af DNA-analyse	Eventuel kommentar
1-2	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
1-3	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
1-5	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
1-7	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
1-8	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
1-9	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
1-14	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
3-4	Formodet spids- snudet frø	Analyse af første æg	Butsnudet frø	Inventøren var ikke sikker på bestemmelsen til spidssnudet frø i felten
		Analyse af andet æg	Butsnudet frø	
3-6	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
3-10	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
5-1	Spidssnudet frø	Analyse af første æg	Ukendt	Sandsynligvis er der sket en fejl i forbindelse indsamling af prøven
		Analyse af andet æg	Ukendt	
7-1	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
7-2	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
7-4	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
7-5	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
8-2	Spidssnudet frø	Analyse af ét æg	Spidssnudet frø	-
8-6	Formodet but- snudet frø	Analyse af ét æg	Butsnudet frø	Formodningen blev verificeret
8-9	Formodet but- snudet frø	Analyse af ét æg	Butsnudet frø	Formodningen blev verificeret

Tabel 2.2: Oversigt over resultater af DNA-analyser i forbindelse med baseline-monitoringen.

eDNA – teknikker:

Metabarcoding – detektion af mange arter i samme taxonomiske gruppe

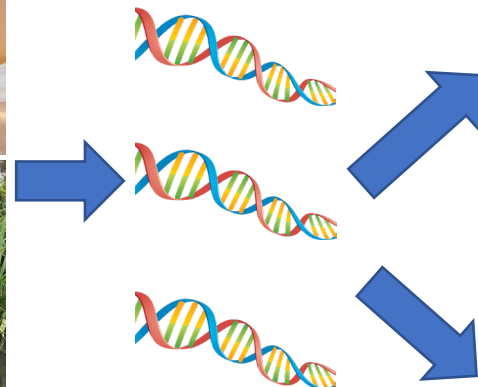
Prøvetagning

eDNA
ekstraktion

Opformering
af DNA-
barcode(s)

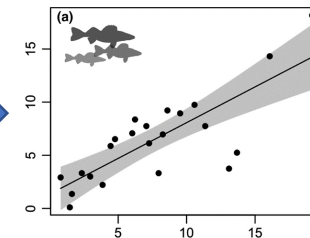
eDNA
sekventering

Analyse



	A	B	C
Archaea	6	7	1
Bacteria	2505	2836	2171
Fungi	75	162	120
Cercozoa	30	44	12
Ciliophora	29	140	42
Cryptomonads	71	74	31
Diatomea	127	452	166
Dinoflagellata	6	6	8
Chlorophyceae	42	68	134
Chrysophyceae	258	307	124
Eustigmatophyceae	9	9	13
Trebouxiophyceae	24	51	71
Ulvophyceae	23	43	26
Gastrotricha	4	5	8
Nematozoa	2	5	3
Annelida	3	4	3
Arthropoda	13	36	11
Mollusca	1	2	0
Chordata	5	15	0
Other Eukaryotes	127	186	75
Total	3360	4452	3019

Metabarcoding =
artsliste over en
dyr gruppe



**qPCR = følsom
detektion af 1 art
ad gange**

Paddeanalyser - metabarcoding (2020-2022)

Silkeborg, Silkeborg kommune, Vejdirektoratet, By og Havn, Femern, FjordPtX, Nr. Hostrup Gr.grav

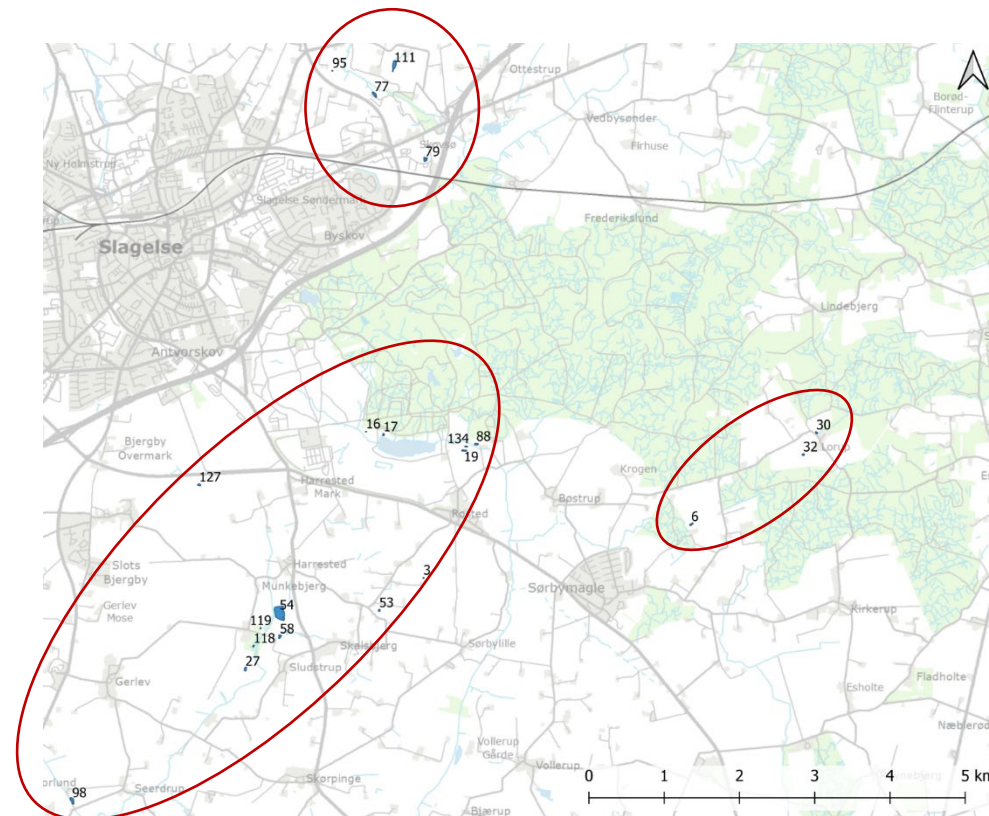
- eDNA analyse af **padder** har været vores **mest efterspurgte MBC assay**
- Ca. 150 vandhuller analyseret 2020--2022
- De fleste opgaver blev udført med **både eDNA og konventionelle undersøgelser** - til sammenligning.
- Vi har meget **ny viden omkring hvordan vi bedst udfører, og bedst fortolker** eDNA resultater fra padder.



Beskyttede padder i vandindvindingsprojekt

SK Forsyning - Slagelse

- Opgavebeskrivelse:
 - Sammenligning af konventionelle, og metabarcoding analyse til paddeundersøgelser
 - Etablering af Nanopore sekventering protokol + databehandling fremtidig egen brug SK-Forsyning
- Konventionel besigtelse af 143 lokaliteter (vandhuller)
 - 16 udvalgt til eDNA analyse på basis af:



Beskyttede padder i vandindvindingsprojekt

SK Forsyning - Slagelse



Resultater

Konventionelt vs metabarcoding:

Overenstemmelse: 29*/55 (53%)

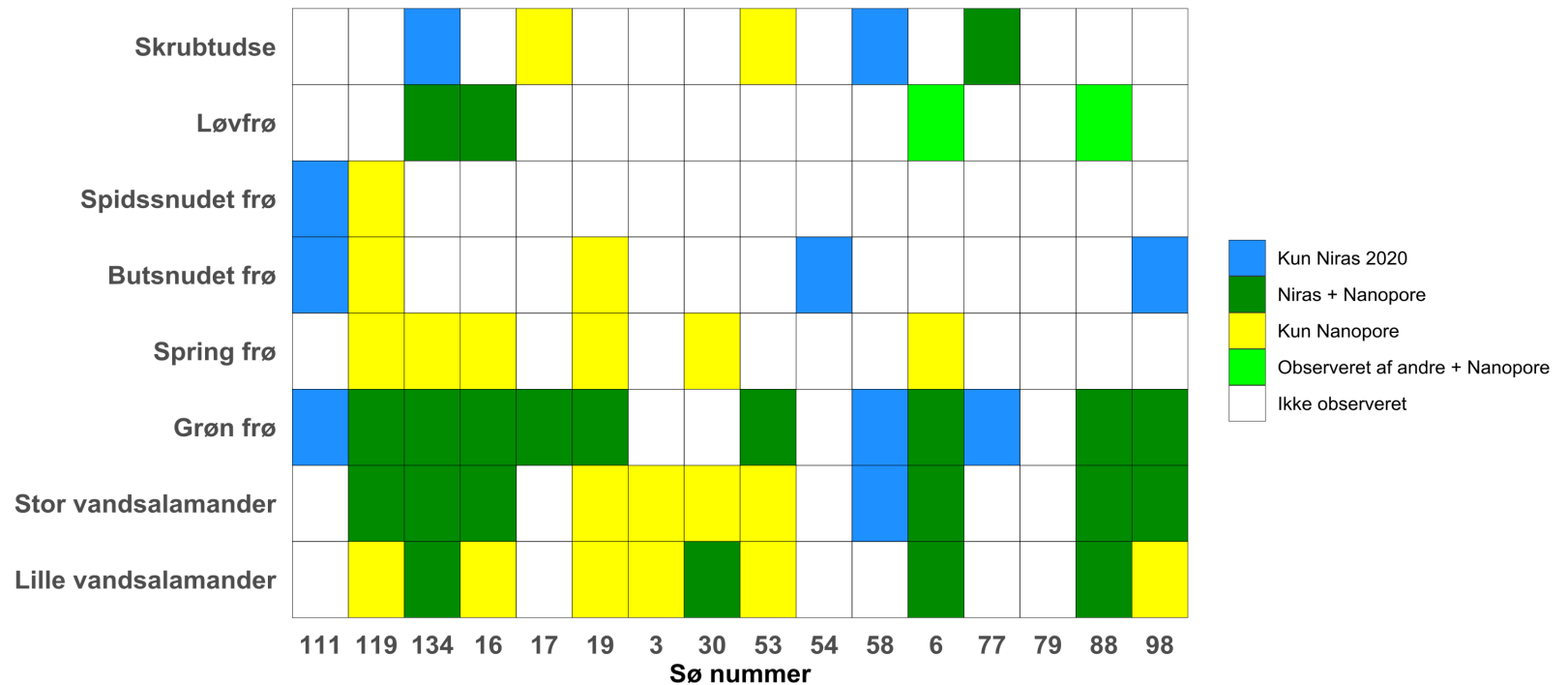
Kun konventionelt: 10/55 (18%)

Kun Nanopore: 17*/55 (31%)

*korrigeret for ubestemte frøer

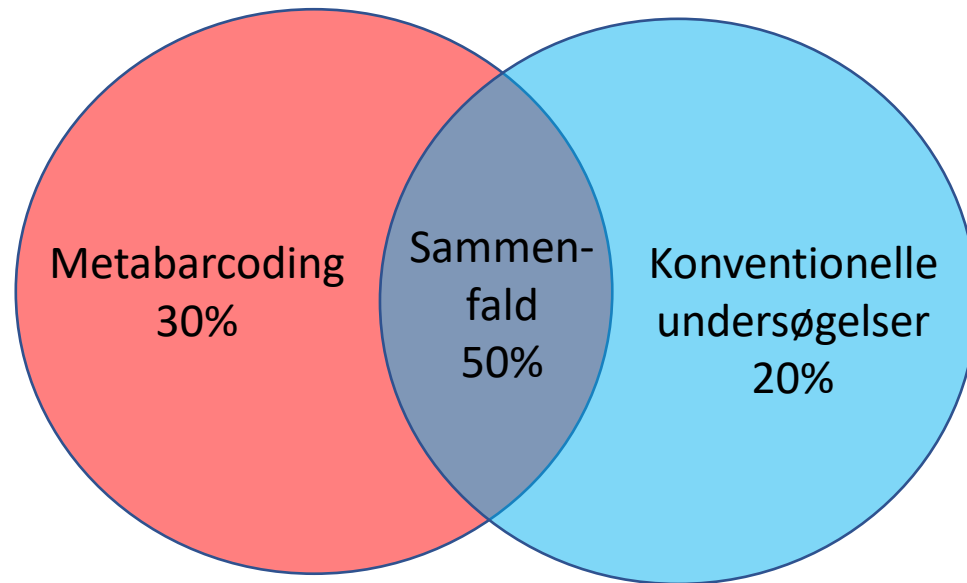
Nogle "ubestemte frøer" kunne identificeres vha eDNA resultatet.

Nogle søer viste sig at være svære at analysere vha eDNA analyser, men overordnet set gode resultater.



Paddeanalyser med eDNA - hvad kan vi (-ikke)?

Padde eDNA resultater
(erfaringer fra 150 prøver 2020-22)



Følsom eDNA analyse

(Falske positive)

Falske negative

Konklusioner fra MBC af eDNA fra padder:

- De fleste prøver virker fint
- Falske negative kan forekomme ("nålen i høstakken" eller fejl et sted i analysen)

eDNA analyse af padder virker – i princippet - men:

- Flere forhold kan påvirke resultatet
- Ler/humus kan forringe DNA analysen, nedbrydning før og efter prøvetagning kan påvirke resultatet mm)
- Korte barcodes giver flest resultater men større usikkerhed

Anbefalinger ved eDNA analyser:

- Vurder prøvetagningsbehov for hver lokalitet
- Afklar forventede arter på forhånd, og KS på DNA resultat
- Konservativ analyse (3-5 replikater per prøve)
- Korte DNA barcodes (Tab på ID-sikkerhed, større chance for at finde de fleste arter)

Det virker i princippet – men:

- Prøverne skal indsamles i de perioder, hvor dyrene afsætter DNA spor.
- Resultaterne skal vurderes kritisk af en ekspert der kender artsgruppen
- eDNA analyse kan primært anvendes til at bevise tilstedeværelse ikke til at bevise fravær af en art.

Fiskeundersøgelser i danske søer

Gentofte Kommune

Opgavebeskrivelse:

Detaljerede søundersøgelser.

eDNA analyser af fiskepopulationer af 3 søer og sammenligning med konventionelle undersøgelser.

Analyse med metabarcoding.

Samtidig analyse af både padder og fisk.

Resultater:

DNA: +, ++ eller +++

Konventionel: BLÅ

Overenstemmelse: 11/14 (79%)

Kun konventionelt: 1/14 (7%)

Kun eDNA: 2/14 (14%) (sandsynlige fund)

	Nymosen	Søndersø	Hundesømosen
Carassius carassius (Karusse)	+		++
Scardinius erthrophthalmus (Rudskalle)	+++	++	+++
Rutilus rutilus (Skalle)		+	++
Esox lucius (Gedde)		+	
Tinca tinca (Suder)		+	+
Leucaspis delineatus (Regnløje)		+++	++
Cyprinus carpio (Karpe)			+++
Perca fluviatilis (Aborre)			

Monitering af invasive fisk i Norge

AKVAPLAN NIVA

Opgavebeskrivelse:

eDNA analyser for invasive fiskearter i 6 norske vandløb (samlet 16 stationer). Sammenligning med konventionelle og qPCR analyser
Metabarcoding med Illumina sekventering.

Resultater:

Ved 100% af tilfælde hvor der var sammenfald mellem konventionelle og qPCR undersøgelser, var der også sammenfald med metabarcoding.

~30% af observationer kun observeret med metabarcoding.

<5% af observationer kun fundet med konventionelle tilgange.

		Halle vannet	Akersvannet	Tuftdammen	Åletjønn	Bakkanetjern	Ulfbakktjern
Gedde	Konventionelt	?	★				
	qPCR	amb	★				
	Metabarcoding		x	x			
Aborre	Konventionelt	★	★				
	qPCR	★	★				
	Metabarcoding	x	x	x	x		x
Elritse	Konventionelt		x				
	qPCR		neg				
	Metabarcoding	x	x				
Karusse	Konventionelt			?			
	qPCR			neg			
	Metabarcoding						
Skalle	Konventionelt						
	qPCR						
	Metabarcoding						
Ørred (ingen qPCR)	Konventionelt						
	qPCR						
	Metabarcoding			(x)	(x)	x	
Karpe	Konventionelt			?		x	★
	qPCR			neg		amb	
	Metabarcoding	x					x
Rudskalle	Konventionelt	★	★	★			
	qPCR	★	★	★			
	Metabarcoding	x	x	x		x	(x)
Suder	Konventionelt			★			
	qPCR			★			
	Metabarcoding			x			



Tykskallet malermusling i

Næstved kommune

Opgavebeskrivelse:

Reintroduktion af tykskallet malermusling (*Unio crassus*) i øvre Suså vha. inficerede elritser (*Phoxinus phoxinus*) og hvidfinnet ferskvandsulk (*Cottus gobio*).

eDNA undersøges som muligt detektionsredskab fordi konventionelle undersøgelser først kan udføres efter flere år pga. malermuslingens langsomme vækst.

Lokaliteter:

Indsamling af vand, spand og sedimentprøver ved 4 lokaliteter (samlet 8 prøver).



Lokalitet	Prøvetyper	Begrundelse
1. Assendrup	V, Sed, Spand	Kendt levested <i>U. crassus</i>
2. Nymølle bro	V, Sed	Udsættelsesområde
3. Fordeler bygværk	V, Sed	Mange muslinger, ingen <i>U. crassus</i>
4. Rødebro	V	Udenfor udsættelsesområde

Analyse med metabarcoding (Nanopore sekventering):

- Ferskvandsvertebrater
- Muslinger



Tykskallet malermusling i Suså

Næstved kommune

Resultater:

Bedste detektion af arter (også de fleste muslinger) i vandprøverne, dog er *U. crassus* signal meget lokaliseret.

- Forslag til **forbedret prøvetagning** lige over vandløbsbund
- Indsnævring af metabarcoding til kun den relevante musling og fiskefamilier hvor muligt

Total udbytte (arter):

- 15 fiskearter
- 12 muslingearter
- 37 non-target dyrearter (padder, pattedyr, insekter)

Opgaven fortsætter sommer 2023:

- Ny prøvetagning ved 15 stationer fordelt over 3 forskellige vandløb (Salling Å, Odense Å og Suså)

Tabel 5.1: Oversigt over eDNA detektion af fisk og muslinger på de 4 undersøgte stationer.

Art	Assendrup	Nymølle bro	Fordelerbygværk	Rødebro
<i>Fisk</i>				
Abramis brama (Brasen)			+++	++
Anguilla anguilla (Ål)	+	+		++
Blicca bjoerkna (Flire)			+	
Carassius carassius (Karusse)			+	
Cobitis taenia (Pigsmerling)	++	++	+	+
Esox lucius (Gedde)	+++		+++	+++
Gobio gobio (grundling)	+++		+++	
Leuciscus idus (Rimte)		+	+	+
Perca fluviatilis (Aborre)	+++	++	+++	+++
Phoxinus phoxinus (Elritse)	+		+	
Pungitius pungitius (Nipigget hundestejle)		+++		++
Rutilus rutilus (Skalle)	+++	+++	+++	+++
Salmo trutta (Ørred)	+++	+++	+++	
Scardinius erythrophthalmus (Rudskalle)		+++	+	+
Tinca tinca (Suder)	++	+	+++	+
<i>Muslinger</i>				
Anodonta cygnea (Stor dammusling)				+++
Musculium lacustre			++	
Pisidium amnicum (Stor ærtemusling)	+++		+++	++
Pisidium casertanum				+
Pisidium henslow anum			++	
Pisidium nitidum	+		+++	++
Pisidium pulchellum/subtruncatum	++		++	
Pisidium supinum				+
Sphaerium corneum (Stor bønnemusling)	++	++	++	+++
Unio crassus (Tykskallet malermusling)	+			
Unio pictorum (Ægte malermusling)	+++		+++	++
Unio tumidus (Tilspidset malermusling)	+++		+++	++

Dansk Vandløbs Fauna Index (DVFI)

Danish Stream Fauna Index (DSFI)



AALBORG UNIVERSITET

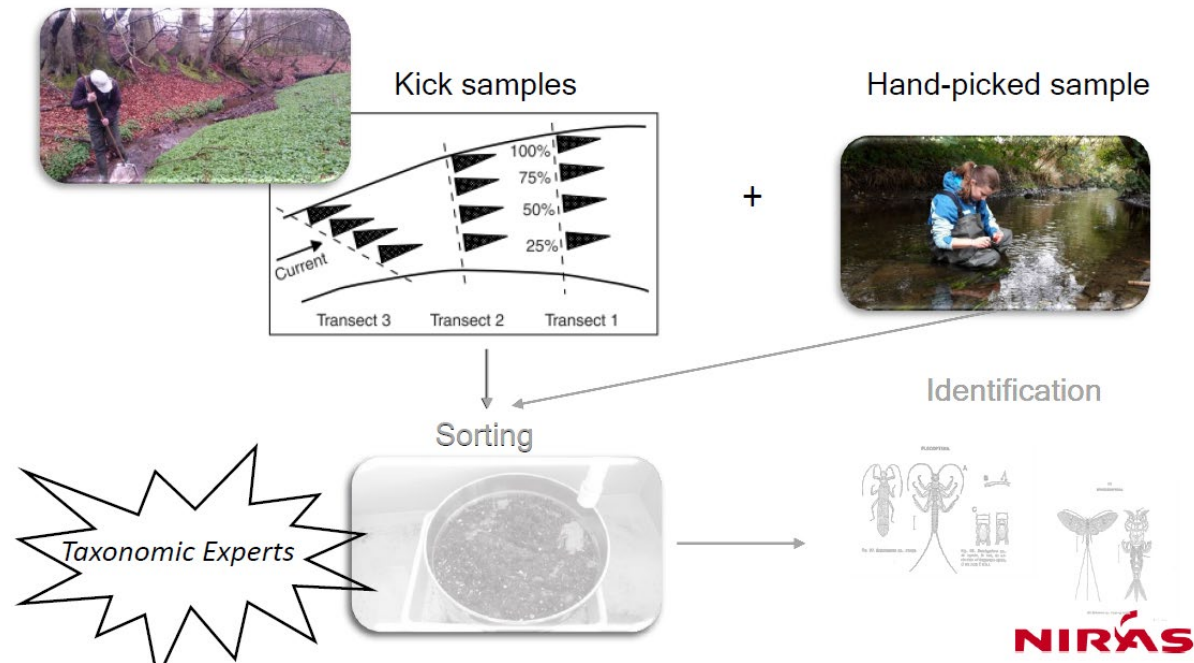
Category	Quality	
7	extremely good	} <i>"good ecological status"</i>
6	very good	
5	good	
4	impaired	
3	poor	
2	very poor	
1	extremely poor	

NIRAS

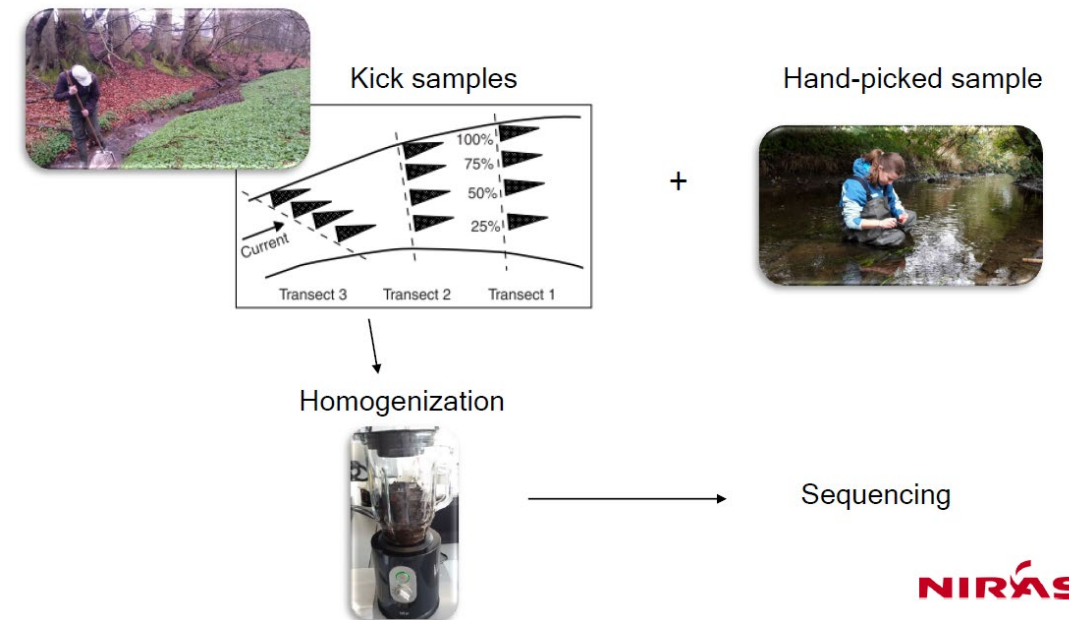
FISKEØKOLOGISK
LABORATORIUM

Sparkeprøver med smådyr fra vandløb

Danish Stream Fauna Index (DSFI)

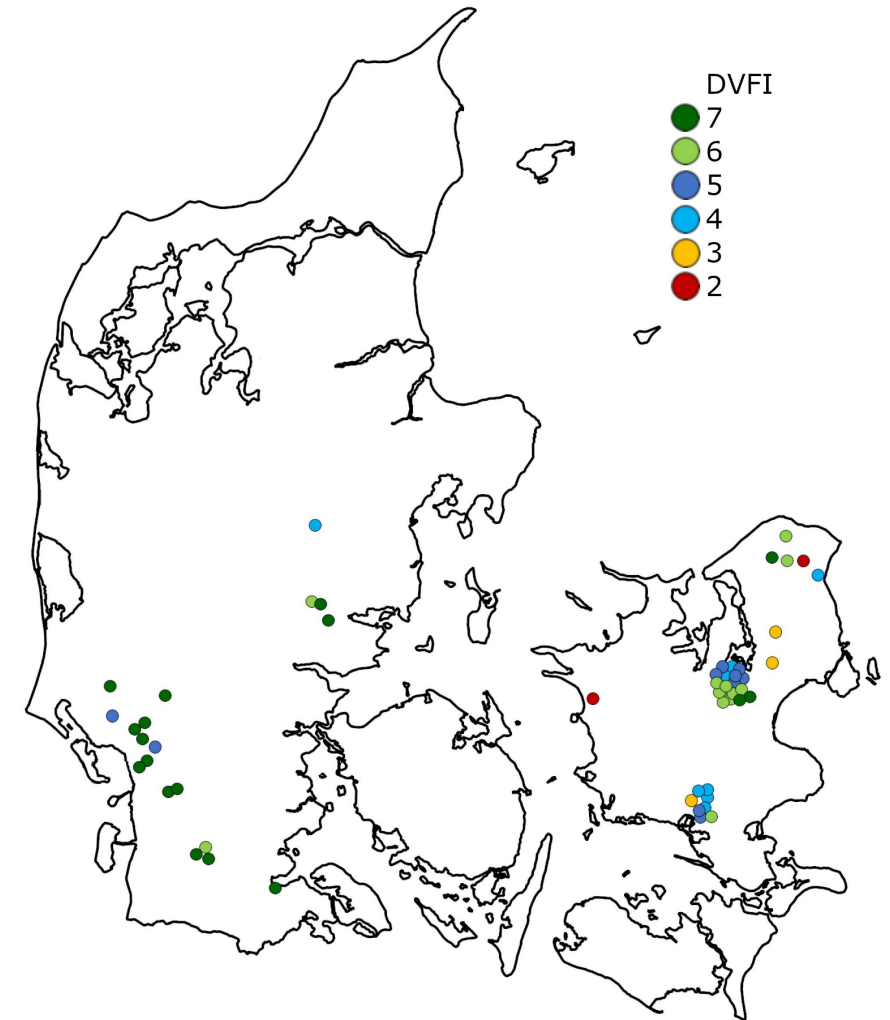
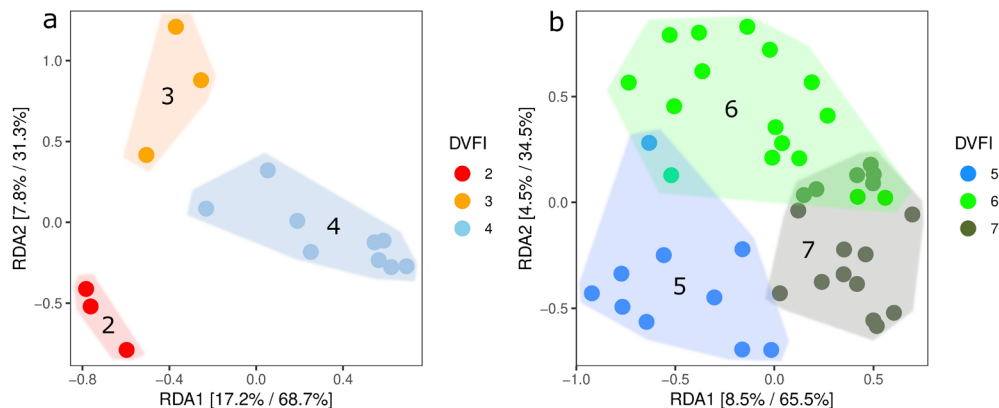


Danish Stream Fauna Index (DSFI)



Proof-of-concept (metabarcoding)

- DNA multivariat analyse - vandkvalitet i vandløb
- Vandløbsprøver er indsamlet over alt i DK.
- Prøverne repræsenterer forskellige økologisk tilstand (målt med DVFI)
- Alle prøver er DNA sekvenseret.
- Forskelle i DNA sekvenser afspejler forskelle i DVFI (illustreret her under med multivariat analyse)

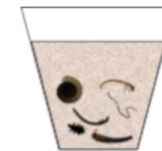


*DVFI Dansk vandløbsfauna Index

Proof-of-concept

- Analyse af kvaliteten i en prøve fra et vandløb med "ukendt" kvalitet er nu udviklet.
- Kan opdage forandringer og/eller dokumentere den økologisk kvalitet.
- Kan dokumentere biologisk variation og vise forskelle på reference lokaliteter og påvirkede lokaliteter.
- Klar til anvendelse og afprøvning i stor skala..

1. Fauna prøve ● med ukendt DVFI fra vandløb



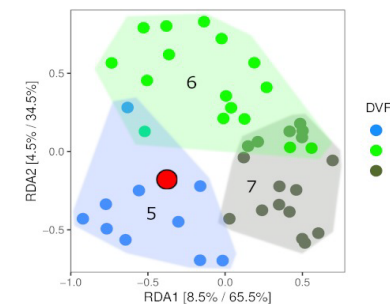
2. Homogenisering



3. DNA ekstraktion

4. Metabarcoding

5. Multivariat analyse



Konklusion: Den ukendte prøve ● tilhører DVFI 5

Proof-of-concept

- DK publikation: Vand og Jord, Maj 2019
- International publikation Ecological Indicators januar 2020:
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105982>

Kan vi måle vandkvalitet i vandløb med DNA?

26. årgang nr. 2, maj 2019

Ecological Indicators 111 (2020) 105982

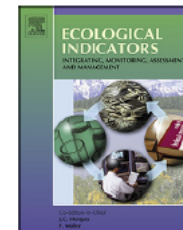


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Ecological Indicators

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecolind



Original Articles

Stream water quality assessment by metabarcoding of invertebrates

Franziska Kuntke^{a,b,1}, Nadieh de Jonge^{a,1}, Martin Hesselsø^{b,c}, Jeppe Lund Nielsen^{a,*}

^a Department of Chemistry and Bioscience, Aalborg University, Fredrik Bajers Vej 7H, DK-9220 Aalborg East, Denmark

^b Amphi Consult ApS, Niels Jernes Vej 10, DK-9220 Aalborg East, Denmark

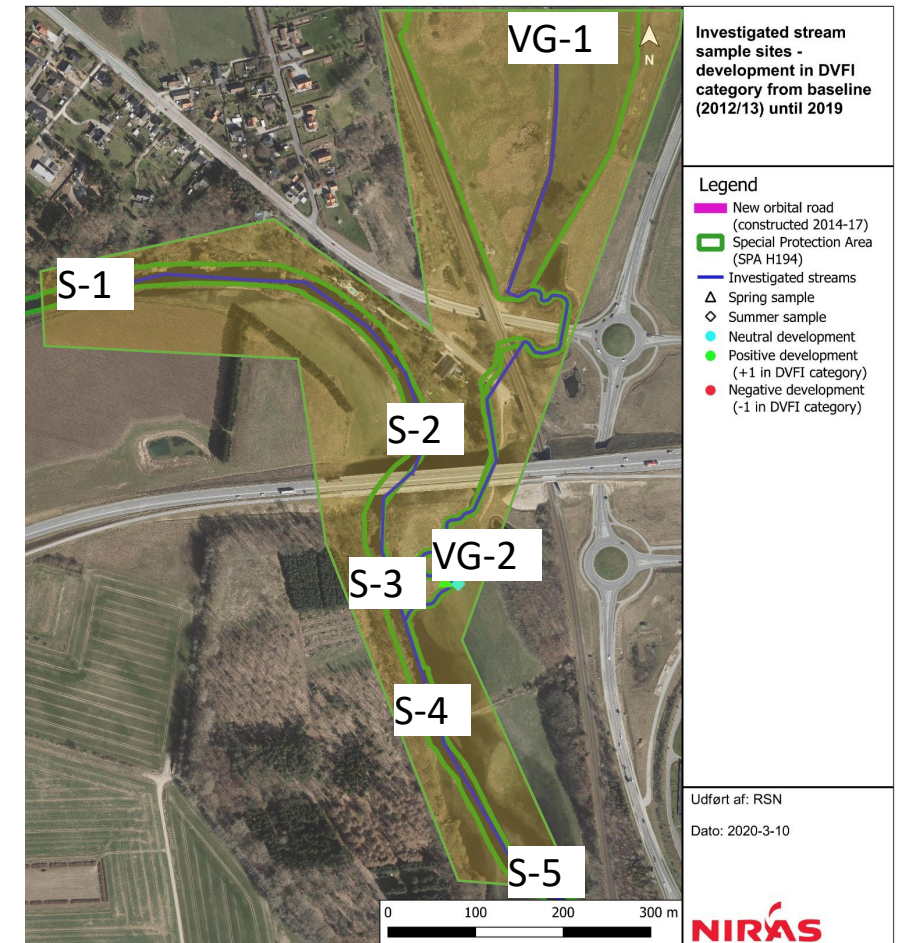
^c NIRAS A/S, Østre Havnegade 12, DK-9000 Aalborg, Denmark



DNA-DVFI i praksis

Vejdirektoratet – Næstved omfartsvej

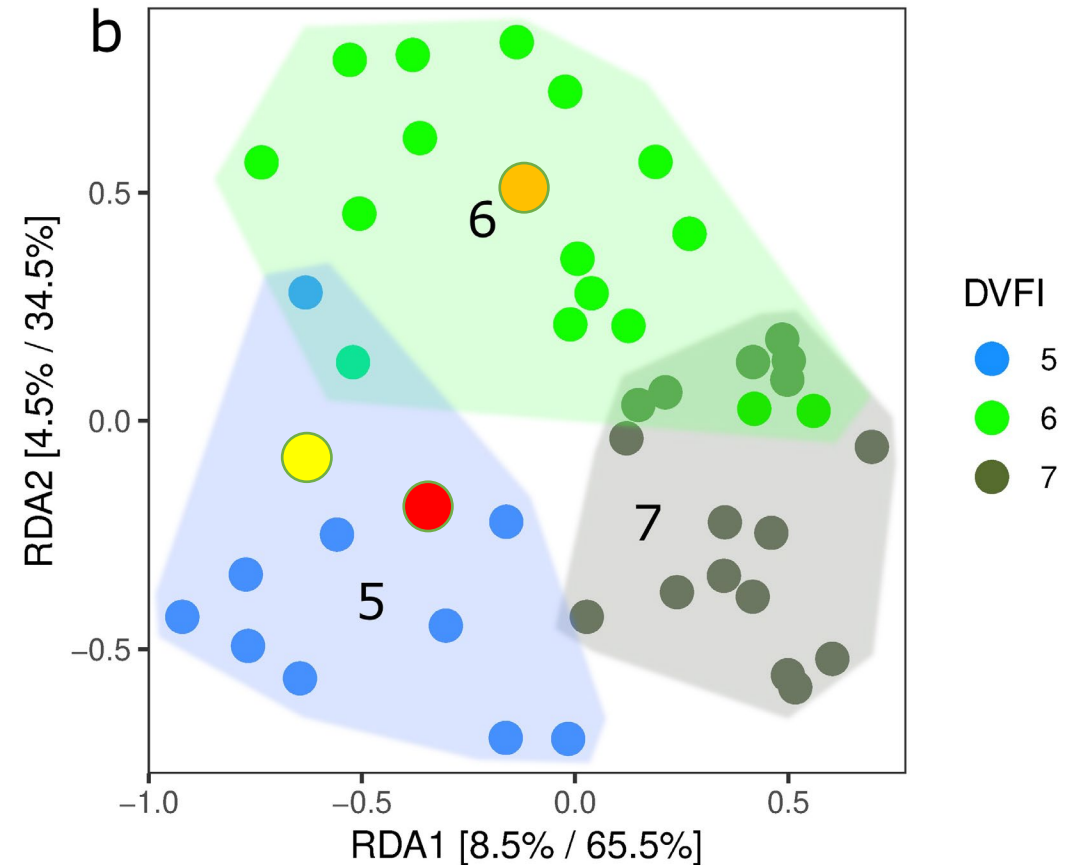
- Anlægsarbejde ny motorvej (Næstved omfartsvej)
- Natura 2000 område
- Sammenligning konventionel DVFI og DNA-DVFI i 2017, 2019 og 2020
- 75 % direkte overensstemmelse mellem DVFI og DNA-DVFI analyse



Proof-of-concept

- Fx et redskab til dokumentation af baseline og tilstandsændringer i anlægsprojekt:

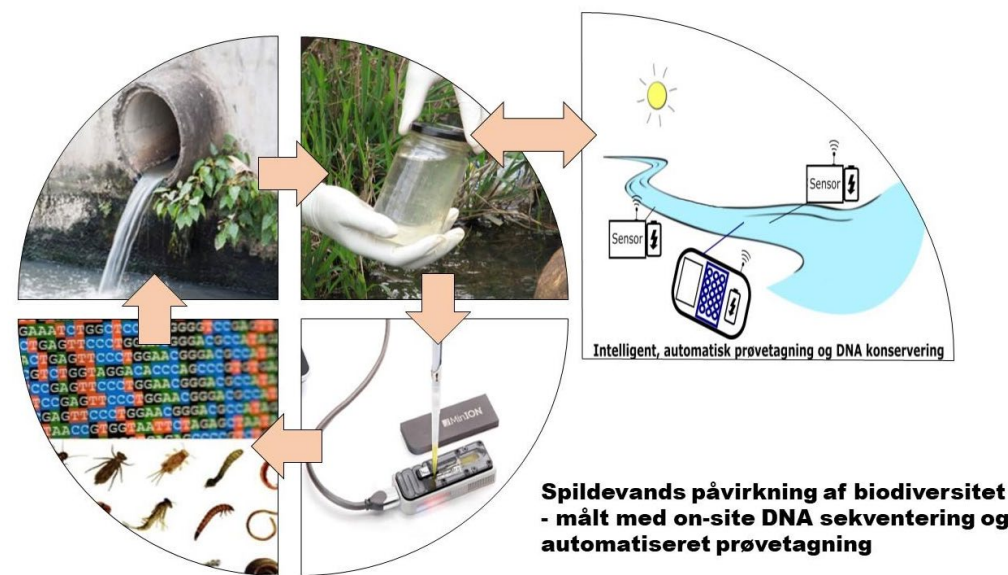
- **RØD:** Før tilstand (baseline)
- **ORANGE:** Under anlæg
- **GUL:** Efter anlæg



Spildevandets påvirkning af biodiversitet

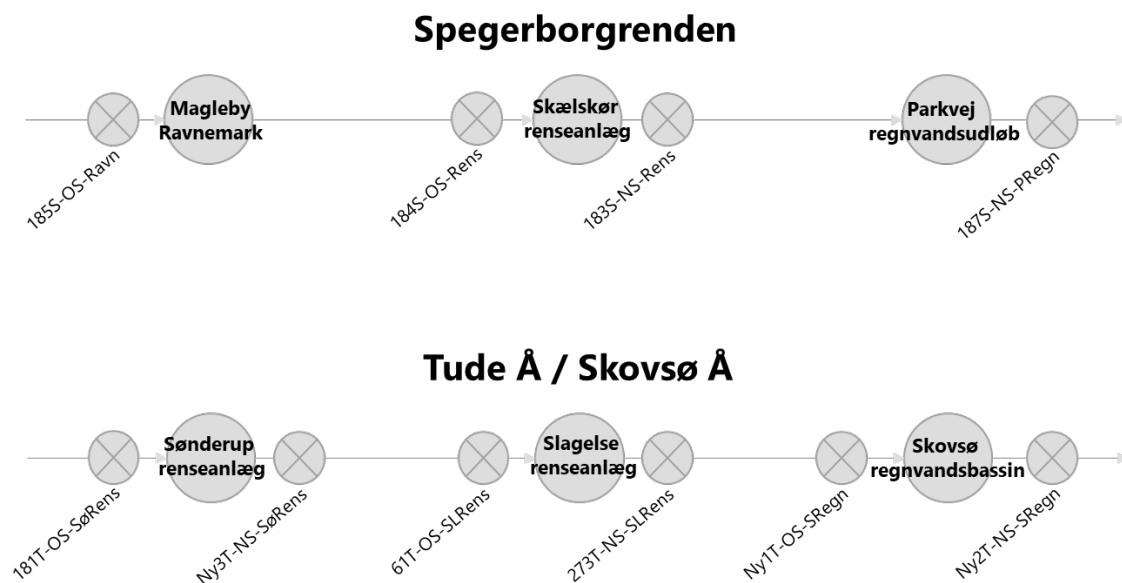
MUDP projekt (2022-2024)

- Samarbejde mellem SK Forsyning – NIRAS – Aalborg Universitet – DMR
- **Udvikling af standardiseret metode til prøvetagning og analyse af biodiversiteten (DNA-DVFI) i forbindelse med:**
 - Udledning fra renseanlæg
 - Udledning fra forsinkelsesbassin
 - Udledning af urensset spildevand fra kloakoverløb
- Undersøgelse af sæsonafhængighed af DNA-DVFI (og biodiversitetsundersøgelser generelt)
- Laboratorie protokoller, modeller og data behandlingsredskaber udvikles (NIRAS/AAU)
- Udgangspunkt i at levere en metode som kan udføres og bliver testet af slutbruger (SK Forsyning)
- Forsøg med automatisk prøvetagning ud fra forskellige sensorer (DMR)



Spildevandets påvirkning af biodiversitet

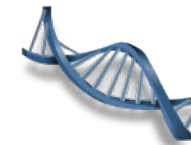
MUDP projekt 2022-2024



8 prøvetagninger af vand, sediment og periodiske fauna prøver 2022-2023, total eDNA biodiversitetsanalyse

Resultater fra vandprøver
første datapunkt (antal
unikke arter per gruppe):

	A	B	C
Archaea	6	7	1
Bacteria	2505	2836	2171
Fungi	75	162	120
Cercozoa	30	44	12
Ciliophora	29	140	42
Cryptomonads	71	74	31
Diatomea	127	452	166
Dinoflagellata	6	6	8
Chlorophyceae	42	68	134
Chrysophyceae	258	307	124
Eustigmatophyceae	9	9	13
Trebouxioophyceae	24	51	71
Ulvophyceae	23	43	26
Gastrotricha	4	5	8
Nematozoa	2	5	3
Annelida	3	4	3
Arthropoda	13	36	11
Mollusca	1	2	0
Chordata	5	15	0
Other Eukaryotes	127	186	75
Total	3360	4452	3019



eDNA – Hvor er vi i 2022?

- Forskerne har arbejdet >10 år på test og udvikling
- Mange metoder er klar til brug* (Fx fisk, padder, muslinger mm)
- Vi har analyseret prøver fra ca. 100 vandhuller i 2022
- Hvad skal analyseres i 2023?
- Priser fra 1000-3000 DKK pr prøve (>10 prøver)
- Husk begrænsninger:
 - Ingen tælle data (-men andre kvantitative potentialer – relative sammenligninger).
 - Ingen alder og størrelses information.
 - Rummelige usikkerheder (-eDNA “flyder med strømmen”).
 - *- in principle”: “Mærkelige” resultater skal altid vurderes af ekspert.
 - Negative DNA-analyseresultater ikke kan tages som udtryk for artens fravær på en lokalitet (-DNA spor er som nålen i høstakken-).

Tweets November-2022

Dr eDNA i Europa



Florian Leese

Prof. Dr. rer. nat. · Professor (Full) at University of Duisburg-Essen
Essen, North Rhine-Westphalia, Germany



Florian Leese @leeselab · 7h

2/11 Unfortunately, the [#biodiversitycrisis](#) is real, yet where & how biodiversity changes is poorly known. New monitoring tools & a global [#agenda](#) are needed. [#eDNAforScience](#) can play a role key role for [#biodiversitydata](#) generation. doi.org/10.1111/ele.13... @SCJaehnig



Till Macher and 3 others



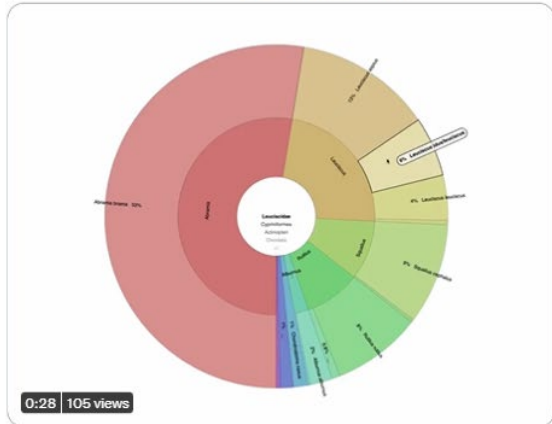
Florian Leese @leeselab · 7h

1/11 [#biodiversity](#) on [🌍](#), how it originated, changes in space & time, is one of the big mysteries that motivates our research @unidue @zwu_ude We study biodiversity from pole-to-pole with a focus on [#freshwater](#) [#ecosystems](#), esp. [#rivers](#) [#OuluTC](#) [#eDNAforScience](#)



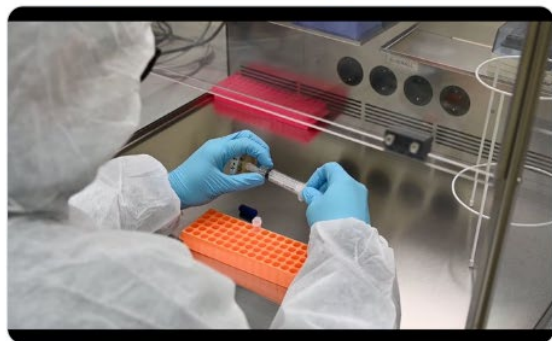
Uni Duisburg-Essen and 8 others

Florian Leese @leeslab · 7h
 4/11 #Taxalists generated from #DNA #metabarcoding are often comprehensive, have a high resolution & are plausible for #biomonitoring & #stressor research. @Umweltbundesamt
 Macher et al. 2021 : doi.org/10.3897/mbmg.5...
 Beermann et al. 2021 : doi.org/10.1016/j.scit...



6 14

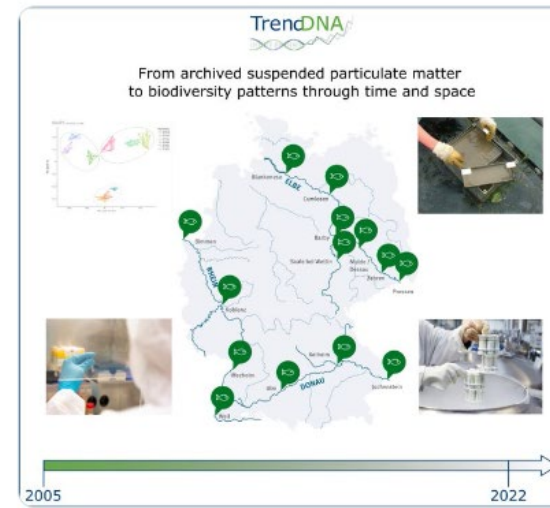
Florian Leese @leeslab · 7h
 3/11 Generating aquatic biodiversity data via eDNA metabarcoding is straightforward #inprinciple : Sampling - Filtration - Extraction - PCR - Sequencing - Data analysis
 Workflow youtube.com/watch?v=cdV5BF...
 Software doi.org/10.1111/1755-0... doi.org/10.1093/bioinf...



Robin Schütz and 4 others

4 11

Florian Leese @leeslab · 7h
 6/11 It is even possible to travel back in time and unveil #biodiversitytrends using #eDNA #metabarcoding of samples stored in the treasures of biological archives. #timetravel #eDNAforScience #OuluTc
 Find out more: trenddna.de



Umweltbundesamt and 8 others

3 10

Florian Leese @leeslab · 7h
 5/11 eDNAsurveys provide insights on many aspects #bluegreenbiodiversity #invasivespecies #restoration #pathogens e.g. we found re-migration of a fish to be much faster than expected.
doi.org/10.3389/fevo.2...
 #Urban overview paper transcript-open.de/doi/10.14361/9...
doi.org/10.1007/s10750...



Kamil Hupalo and 4 others

3 8

Florian Leese @leeselab · 7h
 8/11 Other challenge: eDNA traces can be vry diluted. But finding the #NeedleInHaystack is possible with clever #PrimerDesign ! With these we revealed 100s of #invert species
 #3PrimeMatters #TheTroubleSlide2
doi.org/10.1002/edn3.1... 
doi.org/10.1111/2041-2...



3 8

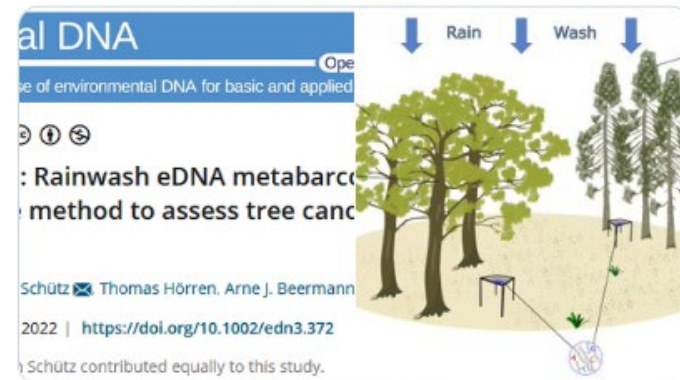
Florian Leese @leeselab · 7h
 7/11 So why adding #inprinciple to the title? Bc eDNA hits found are st misleading or unexpected. Do we really have wolves and marine species in urban freshwater streams? 
 Difficulty to interpret #Contamination #SewageInflux #Primerbias #DatabaseErrors #TheTroubleSlide1



Robin Schütz

3 10

Florian Leese @leeselab · 7h
 10/11 Latest proof highlighting the power: Rainwash #eDNA #metabarcoding – a simple & cost-effective monitoring tool using rainwater. Immense potential to uncover biodiversity beyond rivers 
 Macher et al. 2022 doi.org/10.1002/edn3.3...



Thomas Hörren @thoerren@ruhr.social and 4 others

7 12

Florian Leese @leeselab · 7h
 9/11 Conclusion: #eDNA #monitoring is NOT the #HolyGrail yet a fast, simple & scalable approach with great resolution. Need: rules & guidance to produce #reliabledata . This is key for #implementation in international frameworks. #Standardization #OuluTC
doi.org/10.3897/ab.e68...



COST Action CA15219 and 6 others

5 13

eDNA projekter hos NIRAS A/S

- **DNA-PINE: DNA-based Performance Indicators in Natural and Engineered Ecosystems (2020-2022)**
- Erhvervsforsker: NIRAS A/S, AAU
- SK Forsyning – Paddeundersøgelser (+protokol)
- SK Forsyning – DNA-DVFI (+protokol)
- Grønlands Naturinstitut (GL) – Phytoplankton overvågning i søer
- Næstved kommune – Tykskallet malermusling i Suså
- AKVAPLAN NIVA (NO) – overvågning af invasive fisk
- NIVA (NO) – DNA-DVFI Osloelverne
- By og Havn – Paddeundersøgelser
- Femern – Paddeundersøgelser
- Nr. Hostrup grusgrav – Paddeundersøgelser
- Fjord PtX – Paddeundersøgelser
- DNA-PINE: fortsat
- University of Aberdeen – phytobenthos v. udledning af afsaltningsanlæg på Cypern
- LIFE RigKilde – Lys skivevandkalv detektion
- Vejdirektoratet – Næstved omfartsvej DNA-DVFI, paddeundersøgelser
- Diverse kommuner – Padde-, fiskeundersøgelser
- **SPaB: Spildevandets påvirkning på biodiversitet (2022-2024)**
- MUDP projekt: SK Forsyning A/S, NIRAS A/S, AAU, DMR A/S
- Udvikling af standardiseret metode til prøvetagning og analyse af biodiversiteten (DNA-DVFI) i forbindelse med:
 - Udledning fra renseanlæg
 - Udledning fra forsinkelsesbassin
 - Udledning af urensset spildevand fra kloakoverløb



Naturvurdering og –sagsbehandling

- Naturbeskyttelsesloven, Miljøvurdering, Vandløbsloven, Skovloven, Habitatdirektivet, Vandrammedirektivet, vandindvinding/grundvandssænkning, kabelprojekter, veje, jernbaner, dispensationer, tilladelser, mm.



Naturkortlægning og –overvågning

- Beskyttede arter (bilag IV-arter), beskyttede naturtyper, habitatnaturtyper, invasive arter, rødlistede arter, biologiske kvalitetselementer (BQE) fx kvalitetsvurdering af §3-natur, habitatnatur, vandløb mm, **eDNA**.



Naturplaner, naturpleje og naturgenopretning

- Naturgenopretning, vandløbsprojekteter, søgenopretning erstatningsnatur, afværgeforanstaltninger, plejeplaner, biodiversitetsplaner, opfølgning på biodiversitetsplan, digitale planer (DK-plan og web GIS), grønt danmarkskort.