

Tekniske anvisninger for eDNA-baseret overvågning af ikke-hjemmehørende marine arter



Hovedkontor

Gaustadalléen 21
NO-0349 Oslo, Norge
Tlf. (47) 22 18 51 00
Internet: www.niva.no

NIVA Region Syd

Jon Lilletuns vei 3
NO-4879 Grimstad, Norge
Tlf. (47) 22 18 51 00

NIVA Region Øst

Sandvikaveien 59
NO-2312 Ottestad, Norge
Tlf. (47) 22 18 51 00

NIVA Region Vest

Thormøhlensgate 53 D
NO-5006 Bergen Norge
Tlf. (47) 22 18 51 00

NIVA Danmark

Njalsgade 76, 4. sal
DK-2300 København S, Danmark
Tlf. (45) 39 17 97 33
www.niva-danmark.dk

Titel Tekniske anvisninger for eDNA-baseret overvågning af ikke-hjemmehørende marine arter	Serienummer 7455-2020 Ny version av NIVA-rapport 7203-2017 ISBN 978-82-577-6938-3	Dato 20. januar 2020
Forfattere Steen W. Knudsen og Jesper H. Andersen, NIVA Danmark Dorte Bekkevold, DTU Aqua Martin Hesselsøe, NIRAS Søren K.S. Jensen, Eurofins Steins Peter Rask Møller, Statens Naturhistoriske Museum	Emne Overvågning	Distribution Åben
	Geografisk område Danmark Nordsøen Østersøen	Sider 33 + bilag

Klient Miljøstyrelsen (MST)	Klientens reference Ulrik Berggreen
	Udgivet af NIVA Projektnummer 180280

<p>Sammenfatning</p> <p>Disse tekniske anvisninger er en revideret udgave af de anvisninger, der tidligere er udarbejdet for Miljøstyrelsen og publiceret vinteren 2017/2018. De reviderede tekniske anvisninger indeholder en detaljeret protokol for hvordan miljø-DNA (environmental-DNA eller blot eDNA) kan indsamles, opbevares, oprensnes og spores. Anvisningerne er delt i tre dele og omfatter (1) indsamling og filtrering af vand med instruktionerne for efterfølgende opbevaring af filterenheder, (2) ekstraktion af eDNA fra filterenheder, og (3) sporing af eDNA ved hjælp af kvantitativ PCR. Den sidste del med kvantitativ sporing forudsætter, der er udviklet og testet artsspecifikke primere og prober for korrekt sporing af eDNA stammende kun fra ikke-hjemmehørende arter.</p>

<p>Fire emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> Ikke-hjemmehørende arter eDNA Havstrategidirektivet (HSD) Overvågning 	<p>Four keywords</p> <ol style="list-style-type: none"> Non-indigenous species eDNA Marine Strategy Framework Directive (MSFD) Monitoring
--	---

Denne rapport er kvalitetssikret i overensstemmelse med NIVAs kvalitetssystem og godkendt af:

Jesper H. Andersen
Forskningschef

Jørgen Bendtsen
Kontorleder

ISBN 978-82-577-7190-4
NIVA Rapport ISSN 1894-7948

© Norsk institut for Vandforskning. Publikationen kan citeres frit med kildeangivelse.

MONIS, fase 5

**Tekniske anvisninger for
eDNA-baseret overvågning
af ikke-hjemmehørende marine arter**

Klient: Miljøstyrelsen

Indhold

1 Indledning	3
2 Metode	4
2.1 Indsamling af vand	4
2.2 Ekstraktion af eDNA fra det indsamlede vand.....	10
2.3 <i>In vivo</i> -detektering af eDNA ved kvantitativ-PCR	10
2.4 Tid, sted og periode	15
2.5 Udstyr.....	15
2.6 Procedure.....	18
2.6.1 Protokol for indsamling af vand.....	18
2.6.2 Protokol for ekstraktion fra direkte indfrosne filtrerede vandprøver ved brug af DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen).....	19
2.6.3 Protokol for detektering af artsspecifik eDNA vha. qPCR.....	22
2.7 Tjekliste.....	25
2.8 Vedligehold af instrumenter	26
2.9 Særlige forholdsregler - faldgruber	26
3 Databehandling	27
3.1 Beregninger	27
3.2 Data og koder	27
4 Kvalitetssikring	30
4.1 Kvalitetssikring af metode	30
4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering.....	30
5 Referencer	31

Bilag 1:

Kilder til usikkerheder i forbindelse med prøvetagning, transport, konservering og analyser

Disse tekniske anvisninger skal citeres som:

- Knudsen, S.W., J.H. Andersen, D. Bekkevoold, M. Hesselsøe, S.K.S. Jensen & P.R. Møller (2020): Tekniske anvisninger for eDNA-baseret overvågning af ikke-hjemmehørende arter. NIVA Danmark rapport, 43 sider. ISBN: 978-82-577-7190-4.

1 Indledning

Disse reviderede tekniske anvisninger er udarbejdet som en del af det af Miljøstyrelsens igangsatte og finansierede MONIS-projekt. Yderligere oplysninger om MONIS-projektet, herunder faser, formål, og foreløbige resultater, kan findes i følgende rapporter:

- MONIS 1: 'Monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters: Background and proposal for a monitoring strategy and a monitoring network' af Andersen *et al.* (2014).
- MONIS 2: 'Steps toward nation-wide monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters under the Marine Strategy Framework Directive' af Andersen *et al.* (2016).
- MONIS 3: 'Development of species-specific eDNA-based test systems for monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters' af Andersen *et al.* (2017).
'Tekniske anvisninger for eDNA-baseret overvågning af ikke-hjemmehørende marine arter' af Knudsen *et al.* (2018).
- MONIS 4: 'A baseline study of the occurrence of non-indigenous species in Danish harbours' af Andersen *et al.* (2019).

De reviderede tekniske anvisninger er udarbejdet for indsamling af marine vandprøver med henblik på detektering af miljø-DNA ('environmental DNA' eller 'eDNA'), som beskrevet i flere studier (f.eks. Ficetola *et al.* 2008, Goldberg *et al.* 2011, Olson *et al.* 2012, Thomsen *et al.* 2012a,b, Takahara *et al.* 2012, Pilliod *et al.* 2013, Taberlet *et al.*, 2012, Deiner *et al.* 2015, Sigsgaard *et al.*, 2015, 2017, Knudsen *et al.* 2019).

De reviderede tekniske anvisninger forudsætter at der forudgående er designet artsspecifikke primere og prober – gennem *in silico*-design (dvs. design gennem analyse af nukleotid-sekvens data) – for den pågældende art, der ønskes detekteret. Derudover er det også en forudsætning, at eDNA i den indsamlede vandprøve forekommer i tilstrækkeligt høje koncentrationer.

De reviderede tekniske anvisninger er under stadig udvikling og bør derfor betragtes som foreløbige. Det skyldes bl.a., at det ikke er endeligt fastlagt, hvorledes eDNA bedst kan indsamles, opbevares og detekteres, da det i høj grad afhænger af både vandkvalitet, indsamling og opbevaring af vandprøve, ekstraktion af DNA og brugerens erfaring med både taxonomi og bioinformatik (jf. Deiner *et al.* 2015, Renshaw *et al.* 2015, Thomsen & Willerslev 2015, Taberlet *et al.* 2012, Sigsgaard *et al.* 2015, 2017).

Erfaringer fra de første års overvågning, bl.a. under NOVANA-programmet, forventes derfor at medvirke til en løbende udvikling af de tekniske anvisninger. Anvisningerne bør som udgangspunkt kun følges såfremt indledende valideringstest (også kaldet *in vitro*-test) er blevet udført for de benyttede primer- og probe-systemer på DNA ekstraheret fra væv fra både den eftersøgte art, samt på DNA ekstraheret fra væv fra tætbeslægtede arter. Indledende *in vitro*-test er påkrævet for ikke at risikere at fejlagtige konklusioner baseres på grundlag af falske positive signaler fra analysen.

Denne anvisning er lavet med henblik på at kunne anvendes både i laboratoriet og under feltarbejde. Derfor er dele af metoderne gentaget i forbindelse med de forskellige afsnit for at undgå misforståelser og fejl ved målingerne..

2 Metode

I dette dokument gives separate tekniske anvisninger for de tre hovedelementer i eDNA analyse:

- Indsamling af vand.
- Ekstraktion af eDNA fra det indsamlede vand.
- Detektion af artsspecifik eDNA vha. kvantitativ PCR (qPCR). Bemærk at forskellige metoder for indsamling og ekstraktion af eDNA er beskrevet i litteraturen (jf. Ficotela *et al.* 2008, Takahara *et al.* 2012, 2013, Tréguier *et al.* 2014, Deiner *et al.* 2015, Spens *et al.* 2017).

For at sikre at resultater er sammenlignelige på tværs af prøver, indsamling og arter, er det vigtigt at fremgangsmåden er standardiseret fra begyndelsen.

2.1 Indsamling af vand

Udbyttet af eDNA er alt andet lige koblet med mængden af indsamlet vand – jo mere vand, jo mere eDNA (Thomsen *et al.* 2012a, Taberlet *et al.* 2012, Goldberg *et al.* 2015).

Ved filtrering af vand anbefales det derfor, at så meget vand som muligt filtreres igennem en filter-enhed. I denne anvisning filtreres de 1,5 L vand ved at presse vand igennem en steril filtreringsenhed under overtryk. Eftersom der er bedst erfaring med filtrering ved overtryk (Spens *et al.* 2016), bygger disse reviderede tekniske anvisninger udelukkende på filtrering i modsætning til tidligere studier der benytter sig af ethanol-fældning af vandprøver (f.eks. Ficotela *et al.* 2008, Thomsen *et al.* 2012a).

Inden indsamlingen af vandprøver indledes, skal selve indsamlingen tilrettelægges hensigtsmæssigt for at opnå maksimalt eDNA-udbytte i de efterfølgende trin. Indsamling af vandprøver bør så vidt det er muligt koordineres med de eftersøgte organismers aktivitet og biologi. Jo mere aktive de eftersøgte organismer er, jo større er chancen for at spore deres eDNA. Skal der indsamles information om organismene med konventionel fangst/indsamling med henblik på at sammenholde disse data med eDNA-niveauer, skal indsamling af vandprøver tilrettelægges så vandindsamlingen, så vidt det er muligt, er sammenfaldende med den konventionelle overvågning. Det nuværende eDNA-program under NOVANA-overvågningen sigter mod at spore eDNA fra mange forskellige organismer. Både fytoplankton, krebsdyr, muslinger og fisk. For nogenlunde at indsamle vandprøver indenfor et tidsrum hvor alle disse organismer er aktive i vandsøjlen skal der indsamles to gange årligt. En gang i foråret og tidlig sommer, og en gang i sensommeren og efteråret. Indsamlingen af vandprøver foretages indenfor perioden maj-juni og indenfor perioden august-september i koordination med relevante overvågningsaktiviteter i NOVANA-programmet. Derudover skal vandindsamlingen samtidig finde sted på et tidspunkt, der minimerer risiko for at store koncentrationer af alger eller opslemmede partikler i vandsøjlen blokerer filteret (eksempelvis under algeopblomstringsperioder), og derved forhindrer, at det nødvendige 1,5 L volumen vand per filter-enhed kan filtreres. Er vandprøven for mudret og indeholder den for mange opslemmede partikler til at mindre end 50 mL kan presses gennem filteret, skal der ikke indsamles vandprøve fra den pågældende lokalitet. I stedet forsøges vandprøven enten indsamlet et andet sted, dog maks. 1000 m fra den planlagte lokalitet, eller på et senere tidspunkt, dog ikke mere end en uge efter. Hvis vejrlig eller andre årsager forhindrer at vandprøven kan indsamles på den udvalgte lokalitet, kan indsamlingslokaliteten også flyttes maksimalt 1000 m væk og eventuelt også til et senere tidspunkt, dog ikke mere end en uge efter planlagt indsamling.

Vandindsamling skal tilrettelægges således at en eventuel sideløbende konventionel vurdering af størrelsen af bestanden af en given invasiv art foretages enten på samme dato eller med få dages mellemrum. Der må maksimalt være en uges tidsrum imellem datoen for vandprøvetagningen og datoen for prøvetagning efter den ikke-hjemmehørende art. Fordi eDNA hurtigt nedbrydes kan et eDNA-signal hurtigt ændres, og ønskes der en sammenholdning med konventionel overvågning er det vigtigt at prøvetagning for eDNA-vandprøven er så tæt på tidspunktet på hvor en eventuel konventionel prøvetagning bliver gennemført.

Vandprøvetagning kan foretages indenfor en radius på 1000 m omkring den planlagte indsamlings-lokalitet, såfremt bundforhold og strømforhold kan betragtes som værende ensartede indenfor denne radius. Er bund- og strømforhold væsentligt forskellige indenfor denne 1000 m radius, må prøveindsamlingslokaliteten ikke flyttes længere væk end at disse forhold stadig kan betragtes som tilsvarende for forholdene på den oprindeligt planlagte lokalitet. Flyttes en vandindsamlingsstation således væk fra den oprindeligt planlagte position, noteres i stedet længde- og breddegrad for den alternative vandindsamlingslokalitet, og i indsamlingsskemaet anføres årsagen til at indsamlingslokaliteten er flyttet.

Uanset om der indsamles planktonprøver i overfladen eller i de åbne vandmasser eller der indsamles bundfauna-prøver eller der indsamles bundprøver eller andre prøver langs et transekt, så skal alle vandprøver altid indsamles mindst 1 m over bunden. Vandprøver indsamlet tættere på bunden kan resultere i at der uheldigvis indsamles 'gammelt' eDNA fra bunden fra døde organismer og ikke fra de levende organismer i vandsøjlen.

Fordi der ud fra hver enkelt filterprøve ønskes en eDNA-vurdering af organismer i overfladevandet og organismer som lever associeret med bunden, er prøvetagningsmetoden i disse reviderede tekniske anvisninger et kompromis mellem at kunne spore eDNA fra bundlevende organismer samtidigt med at der kan spores eDNA fra organismer i overfladen. Vandprøver indsamlet i overfladen kan resultere i en fejlvurdering af eDNA-niveauer af de bundlevende organismer og omvendt for vandprøver indsamlet nær bunden. Derudover kan bundmateriale ophobe gammelt eDNA, hvilket kan medføre fejlvurderinger af eDNA-forekomsten i tilfælde af at vandprøven indsamles for tæt på bunden. For at undgå at eDNA-niveauerne eventuelt bliver fejlvurderet, skal det sikres at alle vandprøverne samles ind fra en dybde der er 1 m over bunden og samtidig er 1 m under overfladen. Dette er selvfølgelig ikke muligt på lokaliteter, hvor dybden er mindre end 2 m. Er dybden mindre end 2 m frarådes det at indsamle vandprøver.

Hvis lagdelingen af vandsøjlen bevirker at vandprøven skal foretages i en dybde der er mindre end 1 m over bunden, skal der ikke indsamles vandprøve (se nedenfor). Et eksempel kunne være, at der er lagdeling af vandsøjlen 1 meter under havoverfladen på grund af salinitets- eller temperaturforskelle. Er der 3 meter til bunden i den dybeste del af transektet, og er lagdelingen ved 2 meter under havoverfladen, kan der ikke samles en vandprøve under lagdelingen uden at vandprøven bliver indsamlet fra en dybde der mindre end 1 meter under havoverfladen. I dette tilfælde skal der altså ikke indsamles nogle prøver.

På indsamlingslokaliteter for bundfauna indsamles ét sæt eDNA-vandprøver fra det dybdeinterval, der er en 1 m over bunden og samtidig også er 1 meter under havoverfladen. Alle vandprøverne til samme sæt af vandprøver skal indsamles fra samme dybde på den pågældende lokalitet.

Ved samtidig indsamling af bundfauna skal vandprøverne indsamles så der ikke filtreres vand med unødige mængder af partikler, som kan være blevet opslemmet under indsamlingen. Der er risiko for at en forudgående bundprøveindsamling kan mudre en efterfølgende vandprøve til med store

mængder sediment. Det anbefales derfor, at vandprøven altid indsamles inden en eventuel bundprøve bliver indsamlet. Hvis mængden af sediment i vandet er et problem, skal vandprøven indsamles længere væk (dog maks. 1000 m) fra den oprindeligt planlagte position eller på et senere tidspunkt (dog maks. en uge). Der er ikke nogen forudgående studier af hvor 'sedimentfri' en vandprøve skal være for at der kan spores eDNA i vandprøven. Men er der så meget sediment i vandet, at det ikke muligt se igennem en portion på 1 dL til 3 dL vand i et almindeligt drikkeglas, er det sandsynligt' at det vil være vanskeligt at filtrere det ønskede vandvolumen. I så fald bør indsamlingslokaliteten flyttes eller prøvetagningstidspunktet udskydes.

Ved vandprøveindsamling i forbindelse med transekter gående ud fra kysten, skal vandprøverne indsamles i den del af transektet, der er dybest og længst væk fra kysten, og stadig er minimum 1 m over bunden. Der må ikke samles vandprøver ind fra vandlaget i den første meter over bunden. Det betyder at er den dybeste dele af transektet ikke dybere end 2 m, så skal der ikke indsamles vandprøver.

Filter-enheden skal være steril inert, indelukket i en plasticbeholder og have en effektiv porestørrelse på 0.2–0.5 μm (f.eks. et Millipore 'Sterivex'-filter) (som også anbefales af Spens *et al.* 2017). Filteret placeres i en integreret filterholder, som tillader læktæt samling med tryksat filtreringsenhed (f.eks. tryk-assisteret filtreringsenhed (PAF; Pressure Assisted Filtration), hvor en tryktæt beholder er i stand til at udøve et overtryk på f.eks. en plasticpose med indsamlet vand, hvorved vandet presses ud af plasticposen og igennem et filter) ved et effektivt overtryk på minimum 1 bar atm (101 kPa), men gerne op imod 3 bar (304 kPa). Indsamles vandprøven fra en større beholder, er det nødvendigt at fjerne potentielt kontaminerende rester af eDNA fra evt. tidligere vandprøvetagning. En større beholder, som f. eks. en vandbeholder i en Rosette-vandhenter, skal derfor gennemskylles med vand fra den nye indsamlingslokalitet, så vand fra den forrige indsamlingslokalitet ikke kan lede til senere falsk sporing af eDNA. En vandbeholder skal derfor inden prøvetagning gennemskylles behørigt inden vandprøven indsamles. Derved sikres det, at filteret kun indsamler eDNA fra den pågældende indsamlingslokalitet. For en Rosette-vandhenter vil en sådan gennemskylning automatisk finde sted når vandhenteren i åben tilstand sænkes ned til den ønskede vanddybde.

Indsamles prøven med vandslange skal vandslangen først gennemskylles. Der skal gennemskylles med minimum 6 gange det volumen vand der kan være i slangen inden selve vandprøven udtages. For at tilsvare kravene i TA M01 (se Fossing *et al.* 2019) skal indsugningsstudsens 'parkeres' i prøvetagningsdybden, inden vandet skal pumpes op. Vand pumpes derpå gennem systemet svarede til minimum seks gange slange- og pumpesystemets volumen, der kan være i slangen. Derved gennemskylles vandslangen med havvand fra den indsamlingslokalitet hvorfra vandprøven skal indsamles inden selve vandprøven udtages. Dette sikrer, at vandslangen kun indeholder vand fra netop den pågældende indsamlingslokalitet hvorfra prøven indsamles. Derved undgås kontaminering med eDNA fra forrige indsamlingslokaliteter. Efter gennemskylning seks gange kan vandprøven udtages.

For den efterfølgende filtrering skal den indelukkede filterenhed ('Sterivex'-filteret) benyttes sammen med en PAF-enhed med dertilhørende engangsplastic, der forhindrer kontaminering. Studier i filtrering og efterfølgende opbevaring peger på at 'Sterivex'-filtre er den mest praktiske løsning, der samtidig sikrer et højt udbytte af eDNA i den efterfølgende ekstraktion (Spens *et al.* 2017).

Med en PAF-enhed beregnet for indsamling af eDNA følger også instruktion og vejledning i prøvetagning, samt anbefaling af pumpe eller kompressor, der kan kobles til PAF-kittet. Det anbefales at bruge en kompressor, men som en nødløsning kan en almindelig cykelpumpe også monteres til PAF enheden og anvendes til at generere overtryk under filtrering.

Indsamlet vand, hentet med f.eks. en Rosette-vandhenter, skal filtreres umiddelbart efter vandet er indsamlet. eDNA i vandprøver vil henfalde eksponentielt med en halveringstid på under 12 timer (Sigsgaard *et al.* 2016, 2017, Andruszkiewicz *et al.* 2017, Collins *et al.* 2018, Jo *et al.* 2019). Filtrering af vandprøven skal derfor ske indenfor maksimalt en time efter vandprøven er indsamlet.

Den indsamlede vandprøve må ikke opvarmes, i tidsrummet der følger fra vandet er indsamlet til den bliver filtreret, da en temperaturstigning kan medvirke til at nedbryde det indsamlede eDNA (Strickler *et al.* 2015, Tsuji *et al.* 2017). Kan filtrationen ikke finde sted straks efter indsamling, må vandprøven holdes kold (<10°C); f.eks. i et køleskab eller en køleboks med køleelementer, indtil den skal filtreres senest en time efter.

Som minimum skal der filtreres 1,5 L vand fra indsamlingslokaliteten igennem hvert enkelt 'Sterivex'-filter. Men i tilfælde af høje koncentrationer af alger eller andre opslemmede partikler i vandprøven kan 'Sterivex'-filteret blive blokeret selv efter at et mindre vandvolumen er forsøgt filtreret. I så fald noteres det vandvolumen som succesfuldt blev forceret igennem 'Sterivex'-filteret. En vandbeholder på siden af PAF-enheden opsamler det filtrerede vand, og gør det let at aflæse hvor stort et volumen vand der er blevet filtreret.

Med henblik på, at der for hver indsamlingslokalitet skal tages tre separate replikater, skal der altså påregnes at minimum 4,5 liter vand er nødvendig for filtrering gennem tre 'Sterivex'-filtre med 1,5 liter vand per filter.

For at vurdere om der er en lagdeling af vandsøjlen på grund af salinitets- eller temperaturforskelle, henvises der til de gældende tekniske anvisninger i NOVANA-programmet. Teknisk Anvisning M01 (Fossing *et al.* 2019) fastsætter at vandsøjlen betragtes som lagdelt når: '... forskellen i salinitet eller temperatur fra 1 m under overfladen til 1 m over bunden er mere end 1 PSU eller 4 °C'. Indsamlingen af vandprøverne skal ske over lagdelingen som defineret i TA M01 af Fossing *et al.* (2019). Er der lagdeling i vandsøjlen, skal der kun indsamles vand over lagdelingen. Vandprøven indsamles fra den øverste vandfase og i en dybe der samtidig er 1 m under havoverfladen.

Efter endt filtrering med et 'Sterivex'-filter skal det resterende vand i filteret presses ud. Dette kan gøres ved at en tom 60-100 mL håndsprøjte fyldes med luft og derefter kobles på 'Sterivex'-filteret og trykkes i bund, således at det resterende vand presses ud. Indsamlingsprotokollen vedlagt PAF-kittet beskriver denne del af protokollen med billeder og anvisninger. Bemærk, at det er vanskeligt at tømme et 'Sterivex'-filter fuldstændig for restvand - et mindre volumen af restvand i filteret kan derfor ikke undgås. Hvis restvand udgør mindre end en tiendedel af 'Sterivex'-filterets totale volumen, er dette acceptabelt. Filteret må ikke indfryses med restvand, der overstiger 10% af filterets volumen.

De tekniske anvisninger dikterer, at der som udgangspunkt ikke må tilsættes præserverende væske (eller buffer opløsning eller lignende) til filteret efter endt filtrering. Det tømte filter skal altså ifølge disse tekniske anvisninger indfryses uden væske i. Kan det senere hen påvises, at der kan udvindes mere eDNA fra filtrerede vandprøver, ved tilsætning af præserverende væske eller anden buffer til filteret efter filtrering, kan denne del af de tekniske anvisninger efterjusteres. En sådan revision af anvisningerne kan dog kun ske med Miljøstyrelsens godkendelse.

En øjeblikkelig indfrysning af filteret, indenfor en time, med efterfølgende konstant opbevaring på frost kan udgøre et problem for indsamlingslokaliteter hvor indfrysning ikke er mulig. For de indsamlingslokaliteter hvor øjeblikkelig indfrysning ikke er mulig (dvs. indenfor en time efter vandprøven er filtreret), skal filteret i stedet tilføres 720 uL ATL-buffer (se ekstraktionsprotokollens afsnit 2.6) med en P1000-pipette med filterspids monteret. Buffervæsken skal tilsættes øjeblikkeligt efter endt filtre-

ring. Der er kun udført få sammenlignelige forsøg med tilsætning af buffer i stedet for indfrysning, men disse resultater viser at eDNA-udbyttet fra et filter præserveret i buffer er en anelse lavere end fra et øjeblikkeligt indfrosset filter (Spens *et al.* 2016, Majaneva *et al.* 2018). Efter tilsætning af buffer lukkes enderne på 'Sterivex'-filteret med propper. Filteret placeres derpå i en lille plastpose med zip-lock lukning. Hvert enkelt filter skal placeres i sin egen zip-lock pose. Plastic posen med filteret kan nu transporteres ved almindelig stuetemperatur. Så snart det er muligt at lægge filteret med ATL-buffer i en fryser, skal filteret indfryses. Der skal så noteres dato og tidspunkt for indfrysning (UTC tid). Notering af tidspunkt vil gøre det muligt senere at vurdere hvor stor effekt det har, at filterprøven blev bevaret i buffer i stedet for være blevet øjeblikkeligt indfrosset.

Tilsætning af buffer er ikke optimalt og bør kun finde sted, hvis den filtrerede vandprøve ikke kan indfryses direkte.

For filtre der indfryses straks, skal enderne af 'Sterivex'-filteret først lukkes med de skruepropper (herefter: 'caps') der følger med 'Sterivex'-filteret. Det tømte filter med filtrat lukkes i begge ender med de medfølgende caps. Bemærk, at der med PAF-kittet følger 'caps' for hvert eneste 'Sterivex'-filter.

Det lukkede 'Sterivex'-filter lægges derpå i en zip-lock-pose med et unikt indsamlingsnummer noteret på posens hvide skrivefelt. At dette nummer er unikt og ikke genbruges på andre 'Sterivex'-filtre er særdeles vigtigt, idet genbrug af numre kan lede til forveksling af prøver. Kun et enkelt 'Sterivex'-filter placeres i hver zip-lock pose og posen med filteret indfryses herefter straks. Dette kan gøres i en almindelig fryser (< -15°C), ved opbevaring i en flamingo-kasse eller i en køleboks med tøris.

Dato og klokkeslæt for indsamling noteres sammen med tidspunktet for start på filtreringen og endt filtrering, og hvilket tidspunkt den færdig filtrerede prøve blev lagt på is.. Tidspunktet angives i UTC. Tidspunkterne skal noteres for at gøre det muligt at sammenligne hvilken effekt dette tidsrum har på eDNA-niveauerne på tværs af filtrerede vandprøver.

Noter om indsamlingstidspunkt, tidsrum fra vandindsamling til endt filtrering og indfrysning, navn på prøvetager, prøvetagningslokalitet og filterenhed noteres på det notat-ark, der er vedlagt de tekniske anvisninger (se side 31).

En udstyrsliste over hvilke komponenter der er brug for til indsamling af vandprøver er også indsat i de tekniske anvisninger (Tabel 1, side 21). Denne liste kan bruges som tjekliste når feltarbejdet planlægges og udstyr klargøres.

Et rekvisitionsskema (prøvetagningskema) er indsat i de tekniske anvisninger (Tabel 2, side 31). Skemaet kan printes og medbringes i felten til notater og optegnelser. Beregn et styk kopi af rekvisitionsskemaet per indsamlet filter.

Alle noter bør anføres med blyant, da tusch og kuglepenne-blæk let kan løbe ud. Prøvetagningskemaet (Tabel 2, side 31) kan med fordel printes på vandfast papir, hvis meget våde forhold forventes under feltarbejdet. Noter fra prøvetagningskemaet skal overføres til et excel-regneark (eller lignende) efter prøvetagningen er afsluttet.

For at sikre validering af resultatet er gentagen prøvetagning nødvendig. Som minimum skal indsamling og filtrering af vandprøver derfor gentages tre gange lige efter hinanden per lokalitet. Vandindsamling, filtertype og præservering af filter skal standardiseres fra start for at sikre sammenlignelighed på tværs af både prøvetagningstidspunkt samt prøvetagningslokalitet.

Med henblik på at sammenholde eDNA-mængder i prøver opsamlet gennem flere år skal den indsamlede filtrerede vandprøve efter indfrysning til -15°C overflyttes til -80°C . Under overflytningen fra -15°C til -80°C må filterprøven ikke optøes (ikke overstige 0°C). Filteret skal indfryses øjeblikkeligt efter endt filtrering, ved placering i en fryseboks, eller en transportabel beholder eller kasse eller boks med tøris i. Alternativt kan filteret også anbringes i en transportabel fryseboks til indfrysning, hvor temperaturen er sikret at være under -15°C . Eller filteret i plasticposen kan placeres i en helt almindelig fryser hvor temperaturen er under -15°C . Når det frosne filter er indfrosset, kan det bevare eDNA-mængden i op til 2-4 uger (Spens *et al.*, 2017) indtil det overflyttes til -80°C fryser. Da eDNA på et filter ved temperaturer over 0°C nedbrydes eksponentielt med en halveringstid på under 12 timer, er det yderst vigtigt at filterprøven så hurtigt som muligt bringes til under -15°C efter endt filtrering. For 'Sterivex'-filterprøver tilsat buffer, er dette dog underordnet, da buffertiltsatte prøver som udgangspunkt antages at have et lavere niveau af eDNA per filtreret liter vand end hvad et indfrosset filter vil have (Majaneva *et al.* 2018). De filterprøver der er tilsat buffer skal også indfryses, såsnart det er muligt at få disse filterprøver på frost. For senere analyse er det stadig vigtigt at vide hvilke prøver der blev indfrosset direkte efter endt filtrering, og hvilke prøver der først blev tilstet buffer og derefter indfrosset. Det giver kun mening at sammenholde filterede vandprøver der er blevet behandlet og opbevaret på samme facon, da eDNA-niveauerne ellers vil variere ud fra opbevaringsmetoden og ikke nødvendigvis ud fra forekomsten af den eftersøgte art i vandet. Det er uvist om filterprøver med buffer mister DNA over tid og der er ikke detaljerede studier, som viser om filterprøver med buffer taber eDNA over tid ved opbevaring ved forskellige temperaturer. Disse tekniske anvisninger anbefaler derfor, at alle gemte filtrater ekstraheres og opbevares i elueringsbuffer og derefter hurtigst muligt indfryses til under -15°C . For både filtrater med eller uden buffer er det vigtigt at dato og tidspunkt for indfrysning under -15°C noteres, så det senere er muligt at vurdere effekten af buffertiltsætning kontra den direkte indfrysning.

Det er ikke undersøgt hvor lang tid filtreret eDNA i 'Sterivex'-filtre kan bevare deres eDNA, når filtrene bliver opbevaret ved -80°C , men efter forsøg på ekstraktion af DNA fra isborekerner og permafrostjord (Pedersen *et al.* 2015) kan det ikke udelukkes at opbevaring af filtre på -80°C kan bevare DNAet i mere end 1000 år (Willerslev *et al.* 2003, Thomsen & Willerslev 2015). DNA opbevares dog bedst nedfrosset i høje koncentrationer i buffertiltsatte ekstraktioner. Det anbefales derfor, at 'Sterivex'-filtre ekstraheres i elueringsbuffer og at det ekstraherede eDNA opbevares ved temperaturer under -15°C fremfor at filteret med filtrat opbevares igennem flere år.

Som udgangspunkt er 'Sterivex'-filterenheden en lukket og steril enhed, og er vanskelig at kontaminere med udefrakommende eDNA. Når filteret er lukket med 'caps' og opbevaret i zip-lock-pose og indfrosset er risikoen for kontaminering stærkt begrænset. Den største risiko for kontaminering mellem prøver beror på, om vand fra tidligere indsamlingslokaliteter uhensigtsmæssigt bringes i kontakt med en ny prøvetagning. Da alle detekteringssystemerne bygger på artsspecifik sporing af DNA fra hvirvelløse dyr, benfisk og alger, er der minimal risiko for at menneskeligt DNA kan kontaminere prøven.

Derudover er det vigtigt, at den person der foretager filtreringen ikke forinden vandprøvetagningen har håndteret individer af forskellige ikke-hjemmehørende arter. Der medfølger både engangshandsker og instruktioner til PAF-kittet for at minimere denne kontamineringsrisiko. Prøvetageren skal være gjort bekendt med PAF-enheden og delene i kittet inden selve prøvetagningen udføres.

En detaljeret beskrivelse af fremgangsmåden ved vandfiltrering findes i afsnit 2.6.

2.2 Ekstraktion af eDNA fra det indsamlede vand

Al bearbejdning af indsamlede filtrerede vandprøver og ekstraktion fra filtre er planlagt udført af et kvalificeret DNA- og PCR-laboratorium. Denne bearbejdning forudsætter et indgående kendskab til molekylærbiologiske teknikker og laboratorieprotokoller. De efterfølgende afsnit af denne tekniske anvisning er derfor udelukkende henvendt til slutbrugere med erfaring indenfor 'Polymerase Chain Reaction' (PCR) og 'quantitative PCR' samt en grundlæggende forståelse for biokemi og bioinformatik. Derudover forudsættes det, at brugeren er bekendt med protokoller for oprensning af DNA (Casaril *et al.* 2017, Deiner *et al.* 2018, Spens *et al.* 2017) og efterfølgende koncentrationsmåling (Casaril *et al.* 2017, Mardis *et al.* 2017).

Ekstraktion af eDNA fra filtrerede vandprøver kan foretages med et kommercielt produceret DNA-oprensnings-sæt ved navn DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen). Dette 'ekstraktions-kit' har været anvendt i mange studier og forventes generelt at give gode resultater (f.eks. Thomsen *et al.* 2012a,b, Takahara *et al.* 2013, Biggs *et al.* 2014, Tréguier *et al.* 2014, Deiner *et al.* 2015, Sigsgaard *et al.* 2015, 2017). Fremgangsmåden for DNA-ekstraktion findes i protokollen i afsnit 2.6. Ekstraktion med andre 'ekstraktions-kits' for DNA-ekstraktion eller andre DNA-ekstraktionsprotokoller må kun benyttes, såfremt der foreligger sammenlignende studier som sammenholder DNA-udbytte fra filtrerede vandprøver med DNeasy Blood & tissue kit.

En detaljeret protokol for ekstraktion er angivet herunder, og kan tjene som retningslinje for senere bearbejdning af filtrerede vandprøver ved analyse hos et kvalificeret DNA- og PCR-laboratorium. Eventuelle afvigelser og ændringer fra denne protokol skal noteres, da disse detaljer vil være vigtige for hvor lave niveauer, der kan spores eDNA på.

2.3 *In vivo*-detektering af eDNA ved kvantitativ-PCR

En detaljeret arbejdsgang for qPCR-analyse er angivet herunder, og skal bruges som retningslinje for bearbejdning af ekstraktioner ved et kvalificeret DNA- og PCR-laboratorium. Alle artsspecifikke sporingssystemer, der således ønskes benyttet på ekstraherede vandprøver, skal derfor være testet tilfredsstillende til operationelt niveau (se nedenfor) inden de kan bruges for eDNA sporing.

Detektion af eDNA er baseret på Polymerase Chain Reaction (PCR)-analyser. De her anvendte metoder benytter sig af såkaldte 'primer' og 'probe' systemer, der binder specifikt til DNA fra en bestemt fokus-art. Man har derfor ét specifikt PCR-system per art der undersøges for. PCR-metoden undersøger om der forekommer opformering ('amplifikation') af DNA'et fra én specifik art ad gangen. Hvis dette er tilfældet konkluderes det, at arten har leveret eDNA til prøven, og således forekommer på lokaliteten. Tilsvarende, hvis det artsspecifikke system ikke kan amplificere DNA, og en positiv kontrolprøve samtidig godt kan amplificere DNA, konkluderes det, at artens eDNA ikke var forekommende i prøven.

Grundlaget for en robust og kvantitativ detektion af eDNA er forudgående grundig afprøvning (*in silico*- og *in vitro*-tests) af de molekylære systemer, der anvendes til at bedømme eDNA-mængderne i en given prøve. Dette sikrer, at metoderne ikke giver falske positive signaler (dvs. giver signal for en art, selvom dens DNA ikke forefindes i prøven, som kan hænde f.eks. hvis metoden giver uønsket amplifikation af eDNA fra tætbeslægtede arter). Detaljeret *in silico*-design kan ikke udelukke uspecifik uønsket amplifikation. Kun en detaljeret og grundig *in vitro*-test kan sikre at fejlagtige konklusioner ikke drages på grundlag af falsk positiv amplifikation. Se også studierne af Taberlet *et al.* (2012), Wilcox *et al.* (2013) og Thomsen & Willerslev (2015).

Detektion af eDNA er baseret på PCR-analyser med et højt antal amplifikationscykler (>40 cykler) med 'annealing' og 'extension', og primer- og probe-systemet kan detektere meget lave eDNA-koncentrationer. Man anvender typisk op til 40 amplifikationscykler for at minimere risikoen for at få uønsket amplifikation fra tæt-beslægtede arter, der måtte forekomme i samme habitat som den eftersøgte art (Wilcox *et al.* 2013). Det er ikke nødvendigvis muligt at udlede fra et falsk positivt resultat fra qPCR, hvilken anden tætbeslægtet art der har resulteret i uønsket amplifikation. Amplifikation af fokus-arten kan således ikke skelnes fra uønsket amplifikation af søster-arter på grundlag af PCR-metoden. Dette betyder også, at hvis den forudgående design-proces af primer- og probe-systemet er baseret på ufuldstændig sammenholdning af nukleotidsekvens data for beslægtede arter (f. eks. fra 'the National Center for Biotechnology Information' (NCBI) GenBank), kan det ikke udelukkes at metoden giver falsk positiv amplifikation på grund af andre ukendte søsterarters ukendte DNA (se Wilcox *et al.* 2013).

For at bedømme præcisionen af PCR-metoden anvender man en fortyndingsrække baseret på DNA ekstraheret fra væv eller en fortyndingsrække baseret på præcis det dobbeltstrengede-PCR (dsPCR) DNA-molekyle, der efterspores med det arts-specifikke primer-probe-system.

Er en kvantificering af de eftersøgte eDNA-molekyler i vandprøven ikke ønsket, vil en fortyndingsrække baseret på DNA ekstraheret fra væv være tilstrækkeligt.

En fortyndingsrække baseret på DNA ekstraheret fra væv vil gøre det muligt at fastslå de laveste niveauer, der kan spores eDNA på for hver vandprøve, og vil være påkrævet i hver qPCR-opsætning med mindre en standard fortyndingsrække baseret på et ds (dobbeltstrengt)-PCR DNA-molekyle i stedet inkluderes.

Hvis en standard fortyndingsrække, baseret på det ds-PCR DNA-molekyle der efterspores, inkluderes kan niveauet af eDNA i ekstraktionen fra filtrervandprøven kvantificeres (Ellison *et al.* 2006, Bustin *et al.* 2009, Turner *et al.* 2015) og sikre at også en nedre detektionsgrænse kan fastslås for primer-probe-systemet, når det benyttes på vandprøven. En standard-fortyndingsrække klargøres ved en indledende PCR udført på DNA ekstraheret fra væv fra den pågældende mål-art sammen med de artsspecifikke primere, der senere hen skal bruges for det efterfølgende qPCR-setup sammen med DNA fra arten. Det resulterende PCR-produkt kan derpå oprenses og koncentrationen på det oprensede PCR-produkt kan estimeres ved hjælp af spektrofotometri, Nanodrop, Qubit eller lignende.

Eftersom nukleotid-sekvensen på PCR-produktet er kendt (se tabel 3.2 med listen over primere, prober og target-sekvenser i Andersen *et al.* (2017)), kan molekylvægten beregnes – fx. ved hjælp af 'Oligocalc' (Kibbe 2007) og antallet af PCR-produkter bestemmes som antal kopier per volumen. Dette oprensede PCR-produkt kan derpå fortyndes til en standard-fortyndingsrække indledningsvis med 10^8 kopier per μL og i ti-fold fortyndinger (dvs. 10^7 kopier/ μL , 10^6 kopier/ μL osv. ned til 1 kopi/ μL). Bemærk, at tilsættes der 5 μL af en koncentration på 10^6 kopier/ μL til en 25 μL reaktion, så vil der effektivt være 5 millioner kopier i reaktionsbrønden. For at kunne beregne en detektionsgrænse (limit of detection, LOD) og en kvantificeringsgrænse (limit of quantification, LOQ), skal antallet af kopier beregnes som antal kopier per reaktion. For mere detaljerede vejledninger for udregning af begge grænser og for forberedelse af dsPCR produkter for standardrække fortyndinger henvises her til tidligere studier med artsspecifik sporing af eDNA (Agersnap *et al.* 2017, Knudsen *et al.* 2019).

Hver enkelt qPCR-setup kan have mindre afvigelser i detektionsgrænse, og der skal derfor altid inkluderes en fortyndingsrække med hver qPCR-test på filtrerede vandprøver - enten baseret på fortyndinger af ekstraheret DNA eller på fortyndinger af oprenset ds-PCR-DNA.

Klargøres fortyndingsrækken af ekstraheret DNA, skal denne fortyndingsrække være en ti-fold fortynding fra 10000 gange og ned til 100 millioner gange fortynding af DNA ekstraheret fra væv, og skal være inkluderet i minimum tre qPCR-replikater. Således vil hver qPCR-kørsel på filtrerede prøver være baseret på en vævsekstraktion fra den eftersøgte art, der så fortyndes indtil qPCR-signalet udebliver. Dette hjælper til at afgøre ved hvilken en koncentration en vandprøve vurderes som værende enten positiv eller negativ. Fortyndingsrækken tjener så samtidig som positiv kontrol.

Udover en fortyndingsrække der tjener som positiv kontrol skal der også inkluderes minimum tre tekniske qPCR-replikater der kun indeholder reagenser og rent vand. Disse er negative kontroller, og hjælper til at afgøre om reagenserne benyttet i opsætningen ved et uheld er blevet kontamineret.

Alle qPCR-set ups udført ved afdelingen for Evolutionary Genomics ved Statens Naturhistoriske Museum over perioden 2012-2017 er baseret på TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies), som også er foretrukket i mange studier på eDNA (Thomsen *et al.* 2012a,b, Tréguier *et al.* 2014, Sigsgaard *et al.* 2015, Turner *et al.* 2015, Agersnap *et al.* 2017, Knudsen *et al.* 2019). Derfor er disse tekniske anvisninger også baseret på TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies).

Kontaminering mellem forskellige qPCR kan forebygges ved brug af dUTP i alle qPCR-produkter og addering af uracil-DNA-glycosylase (UDGase) til qPCR-mix - med et indledende opvarmningstrin i qPCR-programmet, som inaktiverer UDGase (Sigma Aldrich 2020, Zharkarov *et al.* 2010). TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies) indeholder ikke UDGase, og det må derfor tilsættes. Tilsættes UDGase skal mængden af dobbeltdestileret vand (ddH₂O) per reaktion justeres tilsvarende så total volumen forbliver 25 µL per reaktion.

Reaktioner til qPCR forberedes i volumen mellem 25 µL til 100 µL. I de tekniske anvisninger er alle reaktioner sat som 25 µL total volumen qPCR-reaktioner.

Reaktioner for qPCR sættes op så de indeholder 5 µL ekstraheret-DNA (hvor DNA'et i dette ekstrakt således stammer fra den filtrerede vandprøve), plus 10 µL 'TaqMan Environmental-MasterMix 2.0' (Life Technologies), plus 2 µL af hver primere og plus 1 µL probe. Primer og probe tilsættes i koncentrationer i henhold til de individuelt optimerede koncentrationer for hvert sporingssystem. Volumen af UV-behandlet ddH₂O tilføres til sidst, således at det totale volumen per qPCR reaktion bliver 25 µL.

Det anbefales, at inkludere to til fire interne 'positiv kontrol'-reaktioner (Internal Amplification Control, IAC) for qPCR-opsætningen, hvis der er formodning om at der kan være hæmning af PCR-effektiviteten fra oprensede elementer i ekstraktion af vandprøven. Hæmmende elementer kan være til stede i ekstraktionen fra den filtrerede vandprøve, hvis ekstraktionen er misfarvet eller uklar. Hæmmende elementer kan også antages at være til stede i ekstraktionen, hvis der under vandprøveindsamlingen var algeopblomstring i vandet.

Primer, prober og EM Master-mix skal opbevares adskilt i et laboratorium, hvor der ikke finder PCR-amplifikation sted.

Klargøring af master-mix og opsætning af reagenser til qPCR skal ligeledes finde sted i et laboratorium, hvor der ikke finder PCR-amplifikation sted, dette kan med fordel være samme sted som hvor reagenserne opbevares.

Tilsætning af ekstraktionerne fra de filtrerede prøver til qPCR-brøndene med blandede reagenser skal ske i et negativt flowhood, og skal ske efter alle reagenser er blandet. Tilsætning af ekstrak-

tionerne fra de filtrerede prøver til qPCR-brøndene må ikke finde sted i samme lokale, som hvor klargøring af master-mix og opsætning af reagenser til qPCR finder sted. Dette skal ske enten i et adskilt laboratorium eller i et adskilt flow hood.

Der henvises til god laboratorie-praksis (GLP) for hvad angår håndtering af reagenser og rengøring af overflader og udstyr. Se også anvisninger angivet af Spens *et al.* (2016) for ekstraktion af eDNA.

Opblandet master mix bestående af primere, prober, EM Master Mix og dobbeltdestilleret vand (ddH₂O) tilføres til plastrør i '8-strips' der passer til qPCR-maskinen, og lukkes med tilhørende optiske låg. For denne tekniske anvisning hvor qPCR udføres på en MxPro3005-maskine (AH Diagnostics) benyttes qPCR plastrør i '8-strips' af typen: 'Optical wide area 8-cap strips (BIOplastics produkt kode: B57801)'. Man kan benytte andre typer af rør, men i såfald skal der konsekvent og for alle analyser benyttes samme typer af plastrør, da forskelligt plastik har forskellig tilbøjelighed til at binde mindre portioner af DNA i en PCR-reaktion.

Disse plastrør i 8-strips spindes kort (5 sekunder) i en bord-centrifuge inden de senere hen åbnes igen i et adskilt laboratorium eller eventuelt i et andet flow hood, hvor der skal tilsættes DNA fra fortyndingsrækker og DNA ekstraheret fra filtre.

DNA fra fortyndingsrækker og positive kontroller skal også tøres og mixes kort (5 sekunder) på laboratorie bord-vortexer og spindes ned kort (5 sekunder) i en bord-centrifuge, i nævnte rækkefølge, inden de kan benyttes og tilsættes reaktionerne i de klargjorte plastrør i 8-strips. Først tilsættes DNA ekstraheret fra filter og disse plastrør i 8-strips lukkes med plastlåg. Til allersidst tilsættes så DNA fra fortyndingsrækker, som også tjener som positive kontroller. Tilsætning af disse positive DNA-prøver til sidst minimerer risikoen for at der sker kontaminering mellem reaktioner og brønde.

Reaktionerne køres på en 'Stratagene Mx3005P quantitative PCR'-maskine eller på en tilsvarende 'real-time' qPCR-maskine, som er i stand til at detektere de fluorescerende prober, der benyttes.

Følgende termiske profil benyttes i qPCR-maskinen for sporing af eDNA fra de filtrerede vandprøver: 1) Indledende opvarmning til 50°C i 5 minutter, 2) efterfulgt af 95°C i 10 minutter, og 3) med 40 cyklusser, der hver især er gentagelser af et trin der består af: 95°C i 30 sekunder og 60°C i 1 minut). qPCR-maskinen sættes til at indsamle fluorescence med 'end-point-collection' under den afsluttende fase af 60°C-trinnet.

Skal forekomsten af eDNA vurderes på et 95% konfidens-niveau, vil det være påkrævet at analysere minimum 19 positive qPCR-replikat-prøver ud af 20 qPCR-replikat-prøver per filtreret vandprøve, da $19/20 \times 100\%$ er lig med 95%. Dette kan hurtigt resultere i uforholdsmæssigt mange replikater, hvorfor en 'presence/absence'-detektering uden mulighed for fastsættelse af konfidens-niveau umiddelbart kan anbefales (se også Takahara *et al.* (2013) for flere detaljer om eDNA-detektering af akvatiske ikke-hjemmehørende arter). Ønskes alene 'presence/absence'-detektering, skal minimum tre qPCR-replikater analyseres per filter-vandprøve, men det skal dog anbefales at analysere flere end blot tre qPCR-replikat-prøver per filtreret vandprøve. Denne tekniske anvisning dikterer minimum tre tekniske qPCR replikater. Et højere niveau af præcision for sporing af eDNA er muligt med 4, 8 eller 12 tekniske replikater (Ficotela *et al.* 2015). Men flere tekniske replikater vil også øge omkostningerne forbundet med sporing af eDNA. Meget sjældne organismer vil være vanskelige at spore med eDNA, og det vil nødvendiggøre flere tekniske replikater. Det er for nuværende ikke muligt at vurdere hvor mange replikater det er tilstrækkeligt med for at kunne spore meget sjældne organismer, og det må overlades til vurdering for hver enkelt organisme og til vurdering af klienten der betaler for analysen hvor mange tekniske replikater der skal forsøges per biologisk filter. Af de tre biologiske 'Sterivex'-filter-replikater der indsamles per lokalitet per dato, skal minimum et filter

analyseres i minimum tre tekniske qPCR-replikater per eftersøgt art. Det anbefales, at også det andet biologiske 'Sterivex'-filter-replikater per lokalitet per dato, analyseres i minimum tre tekniske qPCR-replikater per eftersøgt art. Derudover anbefales det at det tredje biologiske 'Sterivex'-filter replikat indsamlet per lokalitet per dato ekstraheres og opbevares under -15° C, og kan så analyseres efter behov, og om uheld forhindrer qPCR-analyse kan gennemføres for de første to biologiske 'Sterivex'-filter replikater.

Ønskes alene en 'presence/absence'-detektering, skal der inkluderes en fortyndingsrække af ekstraheret DNA. Denne fortyndingsrække skal være en ti-fold fortynding fra 10000 gange og ned til 100 millioner gange fortynding af DNA ekstraheret fra væv, og skal være inkluderet i minimum tre qPCR-replikater per fortyndingsniveau.

Definition af 'Operationelt Niveau'

De artsspecifikke sporingsystemer, der benyttes for at spore eDNA i vandprøverne, skal forinden være testet tilfredsstillende gennem to udviklingsfaser: *in silico*-udvikling og *in vitro*-udvikling. *In silico*-udvikling indbefatter at artsspecifikke qPCR-detektionssystemer er udviklet på computer ud fra DNA-databaser med sekvensoplysninger fra den eftersøgte art ('target') dvs. 'fokusarten' og sameksisterende ikke-eftersøgte arter ('non-target'). For de arter hvor det vurderes, at de tilgængelige sekvensoplysninger er utilstrækkelige, udføres supplerende *de novo*-DNA-sekventering af relevante 'target'- og 'non-target'-arter. Dette forudsætter adgang til væv for de arter, hvor der mangler sekvensoplysninger i databaserne ('target'-arter og nært beslægtede 'non-target'-arter). Som udgangspunkt er Statens Naturhistoriske Museum (SNM) i København leveringsdygtig i vævsprøver fra de fleste 'target'- og 'non-target'-arter via den kuraterede museumssamling.

In vitro-udvikling: *In silico*-testede qPCR-detektionssystemer afprøves i laboratoriet på DNA ekstraheret fra væv af både 'target'-art og evolutionært nærtstående og sameksisterende 'non-target'-arter. Som minimum inkluderes *in vitro*-test af evolutionært nærtstående 'non-target'-arter, som vides at forekomme i danske farvande, og som vurderes at kunne give anledning til falske positive. Det kan f.eks. være arter som har mindre end ca. 5 basepar-forskelle med de *in silico*-udviklede detektionssystemer. Vævsprøver fra 'target'- og 'non-target'-arter hentes så vidt muligt fra kuraterede museumssamlinger. Hvis ikke der er adgang til vævsmateriale fra museum, så skal der indsamles individer af de manglende arter til *in vitro*-test. Indsamlede prøver skal artsbestemmes, og så vidt muligt efterfølgende indgå i museumssamlinger, med henblik på morfologisk konservering af de organismer, som er anvendt i *in vitro*-testen. Der tages generelt forbehold for DNA-sekvenser fra organismer, som var ukendte i de offentlige databaser på tidspunktet hvor hvert enkelt primer-probe system blev designet og testet.

Når *in vitro*-testen er afsluttet med positivt resultat, så er der udviklet et artsspecifikt qPCR-baseret detektionssystem, som virker ved identifikation af DNA fra vævsrester fra 'target'-arten. Dette stadium defineres som 'Operationelt Niveau' (ON). Det skal bemærkes, at efter ON er der fortsat behov for *in vivo*-test med efterfølgende ampliconsekvensering og storskala validering. Disse opgaver indgår i MONIS 4-projektet, som slutrapporteres primo 2020. Inden det artsspecifikke detektionssystem kan tages i brug på filtrerede vandprøver skal det også testes ved hvilke koncentrationer af primer og probe i qPCR-reaktionerne det er optimalt at spore DNA. De optimale koncentrationer vil være forskellige for hvert artsspecifikke detektionssystem. Protokoller for test af hvilke koncentrationer af primer og prober der giver mest optimal detektion af eDNA er beskrevet i tidligere studier (Agersnap *et al.* 2017, Knudsen *et al.* 2019).

For positiv kontrol og standardrække fortyndinger i opsætning af qPCR som beskrevet i afsnit 2.3 og 2.6.3, er det nødvendigt først at indhente oprensede dobbeltstrengede PCR-produkter af præcis det

DNA-fragment, der skal spores for den pågældende 'target'-art. Sektionen for Evolutionary Genomics ved SNM er sammen med NIVA Danmark og DTU Aqua leveringsdygtig i sådanne oprensede dobbeltstrengede PCR-produkter for klargøring af både positiv kontroller og standarddrække fortyndinger for de 21 eftersøgte arter listet i MONIS 3-rapporten (Andersen *et al.* 2017). For bearbejdning af ekstraktioner specificeret i afsnit 2.2, 2.3, 2.6.2 og 2.6.3, påtænkes det derfor at laboratoriet ansvarlig disse dele af protokollen indhenter disse oprensede dobbeltstrengede PCR-produkter, som er afgørende for gennemførelse af qPCR-opsætning med sporing af eDNA fra de relevante arter.

2.4 Tid, sted og periode

Indsamling af vandprøver skal koordineres, så de er sammenfaldende med de tidsperioder på året, hvor der kan forventes de største forekomster af de eftersøgte ikke-hjemmehørende arter, eller hvor der kan forventes høje eDNA-koncentrationerne fra de eftersøgte, f.eks. under gydning eller migration. Det er dog ikke muligt inden for rammerne af NOVANA-programmet at lave enkeltvis indsamlinger, og særskilte indsamlinger for enkelte arter. For at tilpasse indsamlingen til den allerede eksisterende prøvetagning er det derfor mest hensigtsmæssigt, at der samles vandprøver ind to gange om året per lokalitet, hvor den første indsamling er tilrettelagt i foråret og tidlig sommer, og den anden indsamling er tilrettelagt i sensommer og efteråret. Alle vandprøve-indsamlinger kan derfor tilrettelægges således at de sker i de tidsperioder, hvor der allerede er planlagt indsamling af andre prøver dvs. fytoplankton-, zooplankton-, makroalge- og bundfaunaprøver. Indsamles der også individer af de ikke-hjemmehørende arter bør datoen for indsamling af vandprøve fastlægges, så der er så lille et tidsrum mellem vandprøvetagning og indsamling af de ikke-hjemmehørende arter. Der må højst være en uge mellem disse indsamlingstidspunkter. Et kort tidsrum mellem indsamling af vandprøve og den ikke-hjemmehørende art, sikrer bedre mulighed for at sammenholde eDNA data senere hen.

Ved transekter udgående fra kysten skal der indsamles fra den dybeste del af transektet. Dog må der ikke samles ind fra dybder, som er mindre end 1 m fra bunden. Det betyder at såfremt den dybeste del af et transekt er under 1 m, skal der ikke samles vandprøve.

Indsamlingslokaliteter skal tilrettelægges sådan at der er så lille afstand som muligt mellem lokaliteten, hvor vandprøven er indsamlet og lokaliteten der er undersøgt for forekomst af ikke-hjemmehørende arter. Der må højst være 1000 m afstand mellem disse to lokaliteter. Dette indebærer også at der er mulighed for at flytte en vandindsamlingslokalitet op imod 1000 m væk (se ovenstående bemærkninger i afsnit 2.1).

2.5 Udstyr

Følgende udstyr skal bruges i forbindelse med vandprøvetagningen:

- Vandhenter. For eksempel en spand eller en (eller flere) vandbeholder(e) i en Rosette-vandhenter. Indsamles vand med vandslange skal vandslangen gennemskyllles med minimum 6 gange det vand-volumen som vandslangen kan indeholde. Man gennemskyller med vand fra den lokalitet, der skal samles ind fra. Indsamles der vand med Rosette-vandhenter, vil vandhenteren automatisk blive behørigt skyllet når den i åben tilstand nedsænkes til den dybde hvorfra vandprøven skal indsamles.
- Sterile inerte filterenheder med effektiv porestørrelse på 0,2-0,5 µm. Et 'Sterivex'-filter benyttes for disse tekniske anvisninger. 'Sterivex'-filteret er vedlagt PAF-kittet. Der skal påregnes minimum 3 filtre per indsamlingslokalitet.

- Filterholder, som tillader læk-tæt samling med tryksat filtreringsenhed. For disse tekniske anvisninger benyttes en PAF-enhed med medfølgende en-gangsplastik. Se også instruktioner og vejledningen vedlagt kittet.
- Termometer. Skal overskylls med vand fra den pågældende indsamlingslokalitet inden brug for at forhindre kontaminering mellem prøvetagningslokaliteter.
- Notat-ark for optegnelser om prøvetagning, indsamlingslokalitet. Tabel 2 i disse tekniske anvisninger kan benyttes for notater.
- Blyant til notater.
- 'MoBio Caps' til at lukke ender på 'Sterivex'-filter efter endt filtrering – er allerede vedlagt indsamlingsskittet. Beregn to caps per filter.
- Zip-lock-posere (100 mm x 150 mm) med hvide skrivefelter for efterfølgende opbevaring af 'Sterivex'-filter. Beregn minimum en pose per 'Sterivex'-filter.
- Vandfast tuschpen til at skrive på zip-lock-plastikposer.
- Engangsprøjte 60-100 mL. For hvert indsamlingskit er der en medfølgende engangssprøjte. Beregn en sprøjte per filter.
- Engangs latex-handsker for at undgå kontaminering af vandprøver. Der medfølger handsker til kittet. Beregn et par handsker per vandprøve. Medbring eventuelt ekstra latex-handsker i andre størrelser.
- Mulighed for øjeblikkelig indfrysning (< -15°C) af indsamlet 'Sterivex'-filter - enten ved i) opbevaring af 'Sterivex'-filter i en almindelige fryser eller ii) ved opbevaring i en isolerende kasse med tøris. Skal der indfryses med tøris, skal is bestilles i forvejen. Tøris holder sig flere dage, så længe låget på kassen er tætsluttende.
- Pumpe eller kompressor, der kan kobles til PAF-enheden jf. PAF-manualen. Beregn en pumpe og/eller en kompressor per PAF-filtreringsenhed.
- Mulighed for køling af den indsamlede vandprøve såfremt øjeblikkelig filtrering af vand ikke er muligt, og der er risiko for at den indsamlede vandprøve vil blive opvarmet i det 1 times tidsrum, der maksimalt må gå fra vandet er indsamlet til prøven kan filtreres. Et almindeligt køleskab eller en køleboks kan bruges til dette formål.
- Eventuel ATL-buffer i afmålt volumen. Der kan med fordel tilføres 720 µL til et 1,5 mL Eppendorfrør inden feltarbejdet indledes. Beregn et 1,5 mL Eppendorfrør med hvert tilsat 720 µL ATL-buffer. Der skal bruges 720 µL per hvert enkelt filter der ønskes indsamlet og opbevaret med buffer-tilsætning. Tilsætning af buffer skal kun benyttes for 'Sterivex'-filterprøver det ikke er muligt at indfryse og transportere efterfølgende i nedfrosset tilstand. Filterprøver med buffer tilsat skal også indfryses senere hen.
- Skal der tilsættes ATL-buffer til filteret, skal en P1000 pipette også medbringes, herunder pipettespidser med filter som der passer til pipetten. Det skal forlods sikres, at spidsen på P1000-pipettespidserne passer ind i 'Sterivex'-filterets åbning. Hvis pipettespidserne ikke passer, kan P200-pipettespidser uden filter også medbringes. Når buffer så skal tilsættes, kan de 720 µL suges op med P1000-pipetten. Derpå monteres en P200-pipettespid uden filter på spidsen af den fyldte P1000-pipettespid, og de 720 µL kan så tilsættes 'Sterivex'-filteret.

Nedenstående tabel (tabel 1, side 19), er en udstyrsliste, der kan printes og benyttes som tjekliste samtidig med andet feltudstyr klargøres inden feltarbejde.

Følgende udstyr skal anvendes til ekstraktionen (beskrevet i afsnit 2.6.2):

- DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen) for 'spin columns'.
- Rotor eller mixer, der kan modstå opvarmning til mellem 50° til 80°C i varmeskab.
- Varmeskab for inkubation ved temperaturer mellem 20° til 80°C.

- Pipetter, i følgende størrelser: P10, P20, P200 og P1000.
- Sterile pipettespidser med filterbarriere. Spidserne skal matche størrelsesklasserne på pipetterne.
- Bord-centrifuge, eller mini-centrifuge med maksimal hastighed på minimum 2000 rpm. Med plads til Eppendorf-rør i 1,5 og 2,0 mL volumen.
- Mixer, vortexer for at mixe Eppendorfrør.
- Ethanol, 96%.
- Eppendorfrør, 1,5 mL; 2,0 mL og 5,0 mL i volumen.
- Falcon-rør, 15 mL volumen.
- Parafilm.
- Sprøjter med 'luer-lock', 2-5 mL volumen, for at trække lyseret filtrat ud af 'Sterivex'-filter efter endt inkubation. Beregn én sprøjte per 'Sterivex'-filter.
- Negativ flowhood kabinet.
- Centrifuge for 1,5 mL til 2,0 mL Eppendorfrør. Centrifugen skal kunne opnå en maksimal hastighed der er over 14000 rpm. Jævnfør også med krav til udstyr protokollen vedlagt DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen).
- Buffer-opløsninger som angivet i protokol for brug af 'spin-columns' i DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen).

Følgende udstyr skal anvendes til selve *in vivo* detektering af eDNA ved kvantitativ PCR (afsnit 2.6.3):

- Spektrofotometer, Nanodrop, Qubit e.l. for måling af koncentration af ekstraheret DNA.
- TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies).
- dUTP (komponent i TaqMan Environmental Master Mix 2.0).
- Uracil DNA-glycosylase (UDGasa).
- Stratagene Mx3005P quantitative PCR eller tilsvarende "real-time" qPCR-maskine, der kan detektere FAM- og ROX-farve.
- Bord-centrifuge, eller mini-centrifuge der kan opnå en maksimal hastighed der er over 2000 rpm. Med plads til Eppendorf-rør i 1,5-2,0 mL volumen.
- Stor centrifuge der kan opnå en maksimal hastighed, der er over 14000 rpm. Med plads til Eppendorf-rør i 1,5-2,0 mL volumen.
- MX pro software for stratagene Mx3005P qPCR-maskine. Eller anden software i fald en anden qPCR-maskine benyttes.
- Plastrør for qPCR med plads til 100 µL reaktioner. Plastrør skal være 'plastic tubes for PCR in strips of eight', I denne tekniske anvisning for MxPro maskinen benyttes: <https://www.bioplastics.com/>. Produkt: Optical wide area 8-cap strips (BIOplastics produkt kode: B57801).
- Klare plastlåg der passer til 'plastic tubes for PCR in strips of eight'. Plastlågene skal være flade, og tilpasset fluorescens detektering i qPCR. I denne tekniske anvisning for MxPro maskinen benyttes: <https://www.bioplastics.com>. Produkt: 0.1 mL 8-tube strips (BIOplastics produkt kode: B72711).
- Dobbelt-destilleret Rnase- og DNase-frit vand.
- Sterile, Rnase- og Dnase-fri Eppendorf-rør i volumen 1,5-2,0 mL.
- Primere og prober som angivet for de pågældende systemer. Primere og prober skal være fortyndet på forhånd i de korrekte koncentrationer nødvendige for opsætning i qPCR.
- En intern positiv kontrol (Internal Amplification Control) der kan tilsættes til qPCR-opsætningen i fald der er formodning om at der kan være hæmmende elementer i ekstraktionen fra filteret, som kan influere på det art-specifikke systems evne til at spore eDNA i prøven.

2.6 Procedure

I de følgende tre afsnit gennemgås proceduren for indsamling og filtrering af vand, ekstraktion af eDNA fra filtreret vandprøve, samt detektering af eDNA via en qPCR-maskine og bearbejdning og analyse af detekteret eDNA-data. Bemærk at analyse af data forudsætter kendskab til både metoder i kvantitativ-PCR, samt begrænsninger for detektering af eDNA som blandt andet er beskrevet af Wilcox *et al.* (2013) og Agersnap *et al.* (2017).

2.6.1 Protokol for indsamling af vand

Vand indsamles fra midten af vandsøjlen med en vandhenter eller en spand, som er fri for rester af DNA, der potentielt kan være grundlag for kontaminering. En pumpe kan også bruges, men skal i så fald kunne renses ved gennemskylning (se afsnit 2.1) for rester af DNA fra tidligere indsamlingslokaliteter, så en eventuel kontaminering mellem indsamlingslokaliteter undgås. Indsamlet vand filtreres derpå gennem en steril filtreringsenhed. I disse tekniske anvisninger benyttes et 'Sterivex'-filter som steril filtreringsenhed.

- 1) Benyt et sterilt filter med en effektiv porestørrelse på 0,2-0,5 μm som tillader filtration ved overtryk og stort filtreringsvolumen. Filtrér op imod 1,5 L vand. Mere end 1,5 L vand kan også filtreres så længe filteret ikke tilstoppes. Blokeres filteret inden 1,5 L vand er filtreret, noteres i stedet det filtrerede volumen. Følg instruktionerne for den pågældende filterenhed. Man kan med fordel benytte udstyr, der integrerer både overtryk og filterenhed for at optimere filtrering i felten og laboratoriet (f.eks. en PAF-enhed).
- 2) Før vandprøven kan indsamles, skal vandprøvehenteren være behørigt gennemskyllet med vand fra den forestående indsamlingslokalitet for at fjerne eventuelle rester af eDNA fra tidligere indsamlingslokaliteter. Benyttes en vandslange for indsamling skal vandslangen gennemskylles med minimum 6 gange det volumen vand som slangen kan indeholde. For at tilsvare kravene i TA M01 (Fossing *et al.* 2019) skal indsugningsstudsens på en vandslange 'parkeres' i prøvetagningsdybden, inden vandet skal pumpes op. Vand pumpes derpå gennem systemet svarende til minimum 6 gange slange- og pumpesystemets volumen, der kan være i slangen. Benyttes en vandhenter i stedet for en vandslange med indpumpning, så skal vandhenteren nedsænkes åben. Nedsækning af en vandhenter i åben tilstand, f.eks. monteret i en Rosette-vandhenter, vil automatisk bevirke at vandhenteren bliver skyllet tilstrækkeligt, inden vandprøven indsamles.
- 3) Efter behørig skylning indsamles vandprøven fra midten af vandsøjlen, hvor fordelingen af eDNA antages som værende ensartet. Undgå vandindsamling nær bunden eller i sedimentet (Treguier *et al.* 2014, Turner *et al.* 2015). Indsamling skal ske i en afstand af 1 m over bunden, eller højere oppe i vandsøjlen, men stadig 1 m under havoverfladen.
- 4) Notér temperatur på det indsamlede vand og datoen for indsamling samt hvem der har indsamlet vandprøven. Notér også tidsrummet for hvornår vandprøven blev indsamlet fra dybden til den blev filtreret. Tiden angives i UTC. Skyl derefter termometeret med ferskvand.
- 5) Notér det filtrerede vandvolumen. Såfremt filteret blokeres og forhindrer at alle 1,5 L bliver filtreret, evt. på grund af opslemmede partikler i vandprøven, indstilles filteringen, og det filtrerede volumen noteres. Opsamlingsbeholderen på siden af PAF-enheden kan aflæses og det filtrerede vandvolumen noteres.
- 6) Tøm filterenheden for en eventuel rest af vand, så filterenheden er så tør som mulig. Benyt en engangssprøjte fyldt med luft for at tømme 'Sterivex'-filteret for det resterende vand. Luk så enderne på 'Sterivex'-filteret med de 'caps', der følger med PAF-kiittet. Bemærk at ikke alt restvand kan presses ud med engangssprøjte. En rest af vand på ca. en tiendedel af 'Sterivex'-filtrets volumen er forventeligt og acceptabelt.

- 7) Mærk filterprøven med unik nummerkode, for senere korrekt identifikation.
- 8) Placér det tillukkede filter i en zip-lock-pose, hvor det unikke indsamlingsnummer er noteret .
- 9) Indfrys zip-lock-posen med filter, og notér tidspunktet for hvornår det endelige filtrat blev indfrosset (< -15°C). Tidspunktet angives i UTC. Prøven skal forblive frossen. Når prøven er opbevaret ved -15°C kan prøven opbevares op til 2 uger ved -15°C. Inden der er gået 2 uger skal filterprøven overflyttes til -80°C fryser.
- 10) Overvej indsamling af flere replikater. Der skal minimum indsamles tre filtre per lokalitet, og hvert filter skal have sit eget unikke nummer.
- 11) Efter al vandprøvetagning er afsluttet for dagens feltarbejde skal vandprøvehenteren (vand-slange eller vandbeholder) skylles med ferskvand jf. afsnittet om vedligeholdelse af udstyr i sektion 2.5 af disse tekniske anvisninger.

Metoden for fiksering af prøven på tøris i felten kan, i tilfælde hvor indfrysning ikke er mulig, afviges ved i stedet at tilføje 'Sterivex'-filteret ATL-buffer (Majaneva *et al.* 2018). Afgivelse fra indfrysning skal på forhånd godkendes af Miljøstyrelsen samt give anledning til et notat om at 'Sterivex-filter-prøven i stedet er blevet tilsat ATL-buffer'. Skal prøven tilføres ATL-buffer erstattes punkt 6-11 herover med punkt 6A-11A herunder:

- 6A) Tøm filterenheden for en evtentuel rest af vand, så filterenheden er så tør som mulig. Benyt en engangssprøjte fyldt med luft for at tømme 'Sterivex'-filteret for resterende vand. Bemærk at ikke alt restvand kan presses ud med engangssprøjte. En rest af vand på ca. en tiendedel af 'Sterivex'-filterets volumen er forventeligt og acceptabelt. Sæt 'cap' på gevindenden af filteret.
- 7A) Mærk filterprøven med unik nummerkode, for senere korrekt identifikation.
- 8A) Med en P1000-pipette og en P1000-filterpipettespids suges de 720 µL ATL buffer op i pipettespidsen. Monter nu en P200-pipettespids uden filter på P1000-filterpipettespidsen. Sørg for den sidder godt fast. Fordi P200-pipettespidsen er mere spids end P1000 spidsen er det nu muligt at indføre P200-spidsen i 'Sterivex'-filteret. ATL-buffere kan derfor nu tilføres filteret. Luk nu filteret med 'cap'. Placér det tillukkede filter i en zip-lock pose. Det unikke indsamlingsnummer skal være noteret på ziplock posen forinden. Kun et filter per pose.
- 9A) Opbevar zip-lock posen med filter og silica gel ved stuetemperatur. Når det på et senere tidspunkt er muligt at lægge zip-lock-posen med filter på frost (under -15° C), skal tidspunkt og dato for indfrysning noteres. Tidspunktet og dato angives i UTC i notatarket.
- 10A) Overvej indsamling af flere replikater. Der skal minimum indsamles tre filtre per lokalitet, og hvert filter skal have sit eget unikke nummer.
- 11A) Efter al vandprøvetagning er afsluttet for dagens feltarbejde skal vandprøvehenteren (vandslange eller vandbeholder) skylles med ferskvand jf. afsnittet om vedligeholdelse af udstyr i sektion 2.5 af disse tekniske anvisninger.

2.6.2 Protokol for ekstraktion fra direkte indfrosne filtrerede vandprøver ved brug af DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen)

Protokollen herunder forudsætter et forudgående kendskab til DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen) med 'spin-columns'. Ekstraktion fra filterenheden er baseret på protokollen fra Spens *et al.* (2017) for prøver angivet som 'SX No buffer frozen or refrigerated' (Spens *et al.* 2017). Et indgående kendskab til metoden i denne reference er derfor en forudsætning for korrekt håndtering af DNA-ekstraktion.

Ekstraktion fra filterenheden skal gøres over to dage, idet der for trin 7 påregnes mellem minimum 4 timers og maksimum 24 timers inkubation i varmeskab. Ekstraktion af eDNA fra filterenheden skal ske i et laboratorium adskilt fra al PCR-teknik. Den største risiko for kontaminering af filterenheden i

laboratoriet er gennem kontaminering fra PCR-produkter. Der skal benyttes engangshandsker af latex eller nitril ved al håndtering af filtre og prøver. Der skal benyttes rene laboratoriekittler, der ikke har været i nærheden PCR-amplifikation. Inden ekstraktionen påbegyndes skal det negative flow-hood være indvendigt belyst med UV i mindst 2 timer.

Tabel 1 Udstyrsliste. Benyttes ved klargøring af udstyr for feltarbejde.

Kryds	Udstyr
-	Vandhenter. F.eks. en spand eller en (eller flere) vandbeholder(e) i en Rosette-vandhenter. Gennemskyllet med behørigt med vand fra den lokalitet, der skal samles ind fra. En vandslange skal gennemskylles med minimum 6 gange det volumen vand den kan indeholde. En Rosette-vandhenter vil blive tilstrækkeligt gennemskyllet når den i åben tilstand nedsænkes til dybden hvor vandprøven skal indsamles fra.
-	Sterile inerte filterenheder med effektiv porestørrelse på 0,2-0,5 µm. Et 'Sterivex'-filter benyttes for disse tekniske anvisninger. 'Sterivex'-filteret er vedlagt PAF-kittet. Der skal påregnes minimum 3 filtre per indsamlingslokalitet.
-	Filterholder, som tillader læk-tæt samling med tryksat filtreringsenhed. For disse tekniske anvisninger benyttes en PAF-enhed, med medfølgende en-gangsplastic. Se også instruktion og vejledning vedlagt PAF-kittet.
-	Termometer. Skal overskylles med vand fra den pågældende indsamlingslokalitet, inden brug, for at forhindre kontaminering mellem prøvetagningslokaliteter.
-	Notat-ark for optegnelser om prøvetagning, indsamlingslokalitet. Tabel 2 i disse tekniske anvisninger kan benyttes for notater.
-	Blyant for at gøre notater.
-	'MoBio Caps' til at lukke ender på 'Sterivex'-filter efter endt filtrering – er allerede vedlagt PAF-indsamlingskittet. Beregn 2 caps per filter.
-	Zip-lock-posere (100 mm x 150 mm) med hvide skrivefelter for efter-følgende opbevaring af 'Sterivex'-filter. Beregn minimum en pose per 'Sterivex'-filter.
-	Vandfast tuschpen til at skrive på zip-lock-plastikposere.
-	Engangsprøjte 60-100 mL. Én sprøjte per 'Sterivex'-filter. For hver PAF-enheds indsamlingskit er der en medfølgende engangssprøjte. Beregn en sprøjte per filter.
-	Engangs latex-handsker, for brug ved håndtering af vandprøver. Der medfølger handsker til PAF-enheds indsamlingskit. Beregn et par handsker per vandprøve.
-	Mulighed for øjeblikkelig indfrysning (< -15°C) af indsamlet 'Sterivex'-filter. Enten ved opbevaring af 'Sterivex'-filter i en almindelige fryser – alternativt ved opbevaring i frysekasse eller en fryseboks med tøris. Kasse med tøris kan bestilles i forvejen, og kan sagtens holde flere dage, så længe låget på kassen er tætsluttende.
-	Pumpe eller kompressor der kan kobles til PAF-enheden jvf. PAF-manualen. Beregn en pumpe og/eller en kompressor per PAF-enhed.
-	Mulighed for køling af den indsamlede vandprøve såfremt øjeblikkelig filtrering efter vand er indsamlet ikke er muligt, og der er risiko for at den indsamlede vandprøve vil blive opvarmet i det 1 times tidsrum, der maksimalt må gå fra vandet er indsamlet til prøven kan filtreres. Et almindeligt køleskab eller en køleboks kan sagtens bruges til dette formål.
-	Hvis 'Sterivex'-filter prøven skal tilføres ATL-buffer, i stedet for indfrysning (se ovenfor), skal der være 1,5 mL Eppendorfrør klargjort med afmålt volumen ATL-buffer i.

Metoden for DNA-ekstraktion kan ændres, hvis det udførende laboratorium kan dokumentere, at ekstraktionsprotokollen giver tilsvarende eller bedre resultater. Dokumentation for dette skal på forhånd godkendes af Miljøstyrelsen, inden ekstraktion påbegyndes.

For filtrerede vandprøver tilsat ATL-buffer er punkt 4 i protokollen herunder ændret til: "4) For hvert filter der skal ekstraheres eDNA fra, tilføres kun 80 µL proteinase K til filteret, som allerede i felten har fået tilsat 720 µL ATL-bufer. Hvis den ATL buffer der blev tilsat i felten er fordampet, skal der tilsættes 720 µL ATL buffer inden de 80 µL proteinase K tilføres." Derudover følges protokollen uden ændringer.

Første dag:

- 1) Alle overflader i det negative flowhood aftørres først med køkkenrulle vædet med vand, dernæst aftørres med et stykke køkkenrulle vædet med klor-opløsning (0,05-0,50%), og til sidst med køkkenrulle vædet i 70-96% ethanol. Holdere, racks og stativer, som skal holde Eppendorfrør, aftørres på samme facon.
- 2) Filtret aftørres også på samme facon med klor-opløsning og ethanol.
- 3) Filtret åbnes under sterile forhold, i et 'negative flow-hood'. Kun den ene ende åbnes.
- 4) For hvert filter der skal ekstraheres eDNA fra klargøres en blanding af 720 µL ATL-buffer og 80 µL proteinase K.
- 5) Hvert filter tilsættes 800 µL af blandingen af ATL-buffer og proteinase K – jævnfør også med protokollen for DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen). Pipettespiden til en P1000 er i nogle tilfælde for bred til at kunne indføres i den smalle åbning i et 'Sterivex'-filter. For sådanne brede P1000-spidses kan man med fordel først montere en tynd P10-pipettespids uden filter først yderst på P1000-spidsen inden de 800 µL tilsættes.
- 6) 'Sterivex'-filteret lukkes derpå igen med den oprindeligt benyttede 'cap', og begge ender forsegles med parafilm.
- 7) Filteret med ATL og proteinase K inkuberes på rotor eller mixer i varmeskab ved 55°C (± 1°C) i 4 til 24 timer så filtratet lyseres fuldstændigt.

Anden dag:

- 8) Et falcon-rør med 96% ethanol lægges på frost (-15°C) for senere brug i trin 15 i ekstraktionsprotokollen for DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen). Beregn minimum 800 µL ethanol per filter-enhed.
- 9) Flowhood behandles som beskrevet i trin 1.
- 10) Hvert inkuberet filter, med lyseret filtrat i, blandes godt ved grundig omrystning.
- 11) Parafilm fjernes. 'Sterivex'-filtret åbnes i den ende, der passer med 2-5 mL sprøjten med Luer-lock.
- 12) Væsken med lyseret filtrat kan så suges ud med 2-5 mL sprøjte (luerlock) og overføres til et 5 mL Eppendorfrør. En ny ren steril sprøjte benyttes for hvert filter. Notér hvor meget lyseret filtrat der trækkes ud med sprøjten for senere at kunne tilsætte AL-buffer (DNeasy Blood & tissue kit; Qiagen) og kold 96%-ethanol i samme volumen. Volumen af lyseret filtrat vil være omtrent på 800 µL. Det skal derfor påregnes at der per ekstraktion fra et filter skal bruges omkring 800 µL AL buffer og 800 µL kold 96% ethanol. Da AL-buffer og kold 96% ethanol tilsættes i forholdet AL-buffer:ethanol:lyseret filtrat i forholdet 1:1:1. Det betyder også at det totale volumen vil overstige 2400 µL. 'Sterivex'-filteret kan maksimalt rumme 2 mL, hvorfor det altså her anbefales at trække lyseret filtrat ud med 2-5 mL sprøjte (luerlock) og overføre lyseret filtrat til et 5 mL Eppendorfrør.

- 13) Til de 5 mL Eppendorfrør, med lyseret filtrat i, tilsættes så først AL-buffer (DNeasy Blood & tissue kit; Qiagen) og omrystes derefter. AL-buffer og kold 96%-ethanol tilsættes i forholdet AL-buffer:ethanol:lyseret filtrat i forholdet 1:1:1 (se Spens *et al.* 2016).
- 14) Rør med lyseret filtrat og AL-buffer inkuberes derpå ved 56°C i varmeskab i 10 minutter (se også protokol for DNeasy Blood & tissue kit; Qiagen).
- 15) Derefter tilsættes 96% kold ethanol, og omryst.
- 16) Lyseret filtrat med AL-buffer og ethanol overføres derpå til oprensningskolonne ('spin columns') der følger med DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen). Efterfølgende oprensning sker så ifølge protokollen for DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen). Overførslen af lyseret filtrat med AL-buffer og alkohol skal ske over flere omgange, hvor først 600 µL centrifugeres igennem oprensningskolonnen, og opsamlet væske smides væk. Derpå centrifugeres yderligere 600 µL, og opsamlet væske smides igen bort. De oprensningskolonner der medfølger med Qiagen-kittet kan maksimalt indeholde 600 µL, hvorfor det er nødvendigt at centrifugere over fire-fem omgange. Alle gange smides den opsamlede væske bort. Oprensningskolonnen kan derpå tilsættes AW1-buffer (500 µL) og centrifugeres, og AW2-buffer (500 µL) og centrifugeres som beskrevet i protokollen for DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen).
- 17) For at sikre relativt høje koncentrationer af eDNA skal den sidste eluering ske i maksimalt 350 µL elueringsbuffer. Dette volumen kan justeres alt efter hvor mange arter der forventes eftersøgt per filtrat, og for hvor mange tekniske qPCR-replikater det forventes at der skal analyseres. Et elueringsvolumen på 350 µL giver mulighed for sporing af 20 arter i tre tekniske qPCR-replikater med 5 µL template per qPCR-brønd. Ønskes flere arter sporet eller forøget chance for sporing af eDNA må der tages højde for at et elueringsvolumen større end 350 µL også vil resultere i en fortynding af i forvejen sjældne eDNA-molekyler der måtte være i prøven. Et elueringsvolumen på 100 µL giver mere koncentreret eDNA og forøget chance for at spore sjældne eDNA-molekyler, men formindsker antallet af tekniske replikater, eller reducere det volumen der er mulighed for at bruge som template per qPCR-brønd.
- 18) For langvarig opbevaring bør koncentrationen på det oprensede eDNA måles ved hjælp af spektrofotometri, Nanodrop, Qubit eller lignende. Det anbefales at måle på mindre end 5 µL ekstraheret filtrat for at sikre at der er tilstrækkeligt med ekstraheret filtrat til de efterfølgende qPCR-analyser.
- 19) Ekstraheret eDNA opbevares på på frost (under -15°C) til alle tider, bortset fra når det skal bruges i qPCR-opsætning.

2.6.3 Protokol for detektering af artsspecifik eDNA vha. qPCR

Protokollen forudsætter et solidt kendskab til kvantitativ-PCR og 'real-time PCR', det anbefales at brugeren derfor har sat sig godt ind i både brug af maskinen samt hvorledes teknikken virker. Endvidere anbefales det at brugeren konsultere den protokol der er præsenteret af Agersnap *et al.* (2017) da denne giver et detaljeret indblik i opsætning og forberedelser.

- 1) Alle overflader i det negative flowhood aftørres først med køkkenrulle vædet med klor-opløsning (0,05-0,50%), og derefter med køkkenrulle vædet i 96%-ethanol. Holdere, racks og stativer der skal holde Eppendorfrør aftørres på samme facon.
- 2) Minimum tre tekniske qPCR replikater skal analyseres for hver ekstraheret filtreret vandprøve og testes for 'presence/absence'-detektering. Optimalt bør minimum fire tekniske qPCR replikater analyseres. Dette giver dog ikke mulighed for fastsættelse af konfidensniveau. Bemærk at det kræver minimum 19 positive replikater ud af 20 replikater for at sikre 95% konfidensniveau for tilstedeværelse af det eftersøgte eDNA.
- 3) Individuelle reaktioner klargøres til 25 µL total volumen. Disse kan bestå af 10 µL of TaqMan, Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies) (eller tilsvarende ligestående mastermix), 7

μL ddH₂O, 5 μL ekstraheret DNA, plus et afstemt volumen af primer og probe justeret efter koncentration og individuelle optimale koncentrationer forinden bestemt for hvert primer-probe-system. Mere end 5 μL ekstraheret DNA kan med fordel tilsættes for forøget chance for eDNA detektion, i så fald skal mængden af ddH₂O nedjusteres tilsvarende per reaktion. Hvis der for eksempel i stedet benyttes 7 μL ekstraheret DNA, skal der kun tilføres 5 μL af ddH₂O per reaktion. Som ved ordinær PCR-set up, bør alle reagenser mixes på en laboratorie bord-vortexer og spindes efter optøning (omkring 5-10 s ved 1000 rpm) i en lille bord-centrifuge, for at sikre at alle reagenser der tilføres er i de tiltænkte koncentrationer. I fald der er mistanke om at ekstraktionen indeholder hæmmende elementer, bør der også inkluderes interne positive kontrol-reaktioner (Internal Amplification Control, IAC) for at vurdere om det arts-specifikke systems evne til at spore eDNA er reduceret på grund af hæmmende elementer som er blevet oprenset samtidigt med ekstraktionen af eDNA fra filterprøven. Hæmmende elementer i en ekstraktion kan tænkes at være tilstede enten hvis ekstraktionen er misfarvet, eller der er gjort optegnelser under vandprøvetagning om at der var opblomstring af alger på samme tidspunkt som prøvetagningen.

- 4) Minimum tre reaktioner tilsidesættes for 'non-target control' (NTC) test, for at sikre at alle reagenser er fri for kontaminering.
- 5) 'Positive target control' (PTC) skal inkluderes i to til fire reaktioner. Idet der inkluderes en standard fortyndingsrække vil den samtidig tjene som PTC.
- 6) En standard-fortyndingsrække forberedes i ti-fold fortyndinger af DNA ekstraheret fra en vævsprøve. For at sikre at det laveste niveau af DNA kan spores skal den laveste fortynding tilsvare en 100 millioner gange fortynding af DNA ekstraheret fra væv. Kun de laveste niveauer af fortyndinger benyttes som standardrække. Standard-fortyndingsrækken skal således indeholde følgende koncentrationer: En fortynding af vævsekstraktionen i 100 millioner, 10 millioner, 1 million, 100.000 og 10.000. Hver ti-fold fortynding skal testes i minimum tre replikater. Ønskes en kvantificering af det eftersøgte eDNA-molekyle, skal standard-fortyndingsrækken baseres på et kvantificeret oprenset dsPCR DNA-molekyle fra en forudgående PCR-reaktion med væv ekstraheret fra den eftersøgte art. Sådan en PCR-reaktion udføres forinden med de specifikke primere og en proof-reading polymerase. Det resulterende ds-PCR-produkt skal oprenses, og koncentrationen på det oprensede produkt skal måles, før et kopi-tal kan beregnes. Derefter forberedes en standard-fortyndingsrække i ti-fold fortyndinger indeholdende følgende koncentrationer: 10^4 kopier/ μL , 10^3 kopier/ μL , 10^2 kopier/ μL , 10^1 kopier/ μL og 10^0 kopier/ μL . Hver ti-fold fortynding skal testes i minimum tre replikater. For fremstilling af standard fortyndingsrækker henvises der også til manualen for MxPro softwaren for Stratagene Mx3005P qPCR-maskinen, og det supplementære materiale i studierne af Agersnap *et al.* (2017) og Knudsen *et al.* (2019). Bemærk at en standard-fortyndingsrække betragtes som unik per qPCR-set up, og ikke kan overføres til lignende eller andre qPCR-set ups. I øvrigt henvises til anbefalingerne i Bustin *et al.* (2009) og Turner *et al.* (2015).
- 7) Programmet for qPCR skal være: 5 minutter ved 50°C, 10 minutter ved 95°C, og derpå 40 cyklusser som hver består af: 95°C i 30 sekunder og 60°C for 1 minut, med 'end-point collection' af fluorescerens-data på det sidste 60°C trin. For detektion af probens FAM-farve skal det sikres at 'gain settings' for FAM er sat til 'x8'.
- 8) Da proberne er forsynet med BHQ1 i 3'-enden og FAM i 5'-enden og fordi TaqMan, Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies) indeholder ROX-farve, sættes qPCR-maskinen til at detektere FAM med ROX som reference. Bemærk at disse indstillinger omkring ROX, FAM og reference-farve skal sættes korrekt inden maskinen startes. Benyttes andre fluorescensfarver skal indstillingerne tage højde for dette. Der er ikke gjort test for multiplex qPCR i denne protokol, men muligheden foreligger - dette vil dog kræve at indledende test gennemføres af hvordan flere specifikke artssystemer opfører sig i samme reaktion.

- 9) Hvis standard-fortyndingsrække i qPCR-opsætningen er baseret på et oprenset ds-PCR-produkt, kan vandprøvernes koncentration af det eftersøgte eDNA-molekyle bestemmes efter qPCR data er indsamlet. Hvis ikke, er der kun mulighed for at eftertjekke om sporingsniveauet er over den nedre detektionsgrænse (limit of detection, LOD).
- 10) For at sikre at det eftersøgte eDNA er over den nedre detektionsgrænse (limit of detection, LOD), fastslås først den nedre detektionsgrænse (LOD) ved at vurdere ved hvor lav en fortynding af ekstraherede DNA, der stadig returnerer en positiv amplifikation. Den laveste koncentration af tilsat ekstraheret DNA der stadig giver positiv amplifikation i blot én af de tekniske replikater vil definere LOD. Kun de vandprøver der giver positiv amplifikation over dette niveau, kan betragtes som positive i en 'presence/absence'-vurdering.

De næste trin i afsnit 2.6.3 af denne protokol er kun nødvendig såfremt en kvantificering af eDNA-molekyler per filteret volumen vandprøve er påkrævet:

- 11) Såfremt standard-fortyndingsrækken er baseret et oprenset ds-PCR-produkt, kan resultatet fra qPCR-kørslen kvantificeres ved brug standard-kurven udregnet fra standard-fortyndingsrækken. Eftersom det oprindeligt filtrerede vandvolumen er kendt, og volumen af tilsat elueringsbuffer er kendt, og volumen ekstraheret eDNA i den efterfølgende qPCR er kendt, kan mængden af eftersøgt eDNA i den oprindelige vandprøve beregnes, og i sidste ende benyttes som et vejledende mål for den relative forekomst af den eftersøgte organisme på den pågældende lokalitet. At benytte forekomsten af eDNA i den filtrerede vandprøve som mål for forekomsten af den eftersøgte organisme vil kræve, at der er indsamlet bestandsstørrelsesvurderinger for den eftersøgte art med konventionelle metoder samtidig med filtervandprøve er blevet indsamlet, og at disse samtidige indsamlinger af filtre og bestandstørrelsesvurderinger er blevet gjort løbende igennem en længere årrække. Da organismer må forventes at udskille eDNA med forskellig rate (se også Thomsen *et al.* 2012a,b), og få deres eDNA nedbrudt med forskellig rate med variation indenfor både arter, populationer, indsamlingstidspunkt og indsamlingslokalitet, er det ikke muligt at bestemme bestandsstørrelsen ud fra eDNA-mængden.
- 12) For kvantificering af kopier af det eftersøgte eDNA i den ekstraherede filtrerede vandprøve er det nødvendigt at skelne mellem 'Limit of Detection' (LOD) og 'Level of Quantification' (LOQ). For at fastslå LOD og LOQ, må negative replikater i standard-fortyndingsrækken først fjernes, da de ellers kan påvirke beregning af standardkurven. Dette kaldes også 'exclusion by sample', jf. studiet af Ellison *et al.* (2006) og Agersnap *et al.* (2017). LOD er defineret som den laveste standard med positiv Cq-værdi (Cycle threshold of quantification) (se Bustin *et al.* 2009), hvor minimum én ud af flere qPCR-replikater returnerer positiv amplifikation – dette er som regel omkring den laveste koncentration af standard-fortyndingsrækken, med kun én kopi per reaktion. Prøver med Cq-værdier over LOD bør betragtes som værende negative.
- 13) LOQ er defineret som laveste reproducerbare standard med positiv Cq-værdi, dvs. der hvor hver qPCR-replikat for den samme reaktion resulterer i positiv amplifikation – dette er som regel omkring 5-10 kopier per reaktion. Prøver med Cq-værdier over LOQ kan betragtes som værende positive (dvs. indenfor LOD), men samtidigt med mulighed for at kvantificere antallet kopier per reaktion.
- 14) Efter LOD og LOQ er fastsat, kan mængden af eftersøgt eDNA per replikat i qPCR-reaktionerne fra de ekstraherede filtrerede vandprøver kvantificeres hvis Cq-værdier er under LOQ.
- 15) Koncentration af eftersøgt eDNA i den oprindelige filtervandprøve kan derfor beregnes ved hjælp af følgende formel: $A_e = C_{qpcr} \times F_e \times V_{wf}$, hvor A_e er antallet af eDNA-kopier per volumen filtreret vand, C_{qpcr} er koncentrationen af kopier af det eftersøgte eDNA i qPCR-reaktionen, F_e er brøkdelen af det eluerede ekstraherede filtrat benyttet i qPCR-reaktionen og V_{wf} er volumen af vand filtreret.

2.7 Tjekliste

Ved vandindsamling (afsnit 2.1 og 2.6.1):

- Vandhenter rengjort forinden, ved gennemskylning med vand fra den nye indsamlings-lokalitet. En vandslange skal gennemskylles med mere end 6 gange vandslangens volumen. For indsamling med vandslange skal det sikres, at indsugningsstudsens er 'parkeret' i prøve-tagningsdybden, inden vandet er pumpet op. Vand skal pumpes igennem systemet svarende til minimum 6 gange slange- og pumpesystemets volumen, der kan være i slangen. Ved indsamling med en Rosette-vandhenter skal vandhenteren være nedsænket i åben tilstand til dybden hvorfra vandprøven skal indsamles fra.
- Udstyr for vandindsamling klargjort.
- Minimum 1,5 L vand er filtreret per filterenhed, eller til filteret blokerer.
- Notater omkring vandprøve er optegnet. Tidspunkter er i UTC.
- Filteret er tømt for rest-vand med en engangssprøjte.
- Filteret er lukket med 'caps' og blevet lagt i zip-lock-pose.
- Slut-filtrat er opbevaret ved $< -15^{\circ}\text{C}$.
- Hver zip-lock-pose med filterprøve er mærket med unik nummerkode.
- Hvis filteret er tilsat buffer i stedet for at blive indfrossent, skal det sikres at prøven på et senere tidspunkt bliver overført til frost (under -15°C), og at indfrysningsdato og -tidspunkt er noteret i UTC.

Ved ekstraktion (afsnit 2.2 og 2.6.2):

- Ekstraktions-kit er klargjort før ekstraktion påbegyndes.
- Yderligere remedier for ekstraktion er klargjort inden ekstraktionerne begyndes.
- Notater for detaljer om ekstraktionerne er optegnet.
- Hver ekstraktion er mærket med unik nummerkode.
- Ekstraheret filterprøve er opbevaret ved $< -15^{\circ}\text{C}$.

Ved qPCR analyse (afsnit 2.3 og 2.6.3):

- Alle remedier og reagenser er klargjort.
- Standard-fortyndingsrække af ekstraheret genomisk DNA fra væv er klargjort forinden. Eller hvis en kvantificering af kopier af det sporede eDNA-molekyle i vandprøven ønskes, skal en fortyndingsrække på et oprenset dsPCR-DNA-molekyle være klargjort forinden.
- Primere og prober er fortyndet til de korrekt 'working solutions' inden qPCR-reaktionen sættes op.
- Tilfredsstillende *in silico*-test og tilfredsstillende *in vitro*-test er blevet gennemført inden test bliver forsøgt på filtrerede vandprøver for at minimere risiko for detektering af falske positive.
- Notater er optegnet omkring indstillinger for qPCR-opsætningen og for hvilke vandprøver der analyseres.
- qPCR-analyse er kørt, og resulterende data-fil gemt under unikt filnavn.
- Ved 'presence/absence'-studier er tilstedeværelse/fravær af den eftersøgt organisme noteret, og ved eDNA-koncentrations-kvantificerings-forsøg er eDNA-koncentrationer målt for hvert replikat i qPCR-analysen for hver filterenhed.

2.8 Vedligehold af instrumenter

De fleste komponenter såsom plasticrør, Qiagen-ekstraktionkit, filter og pipettespidser m.v. er engangsbrug. Benyttes en PAF-enhed for vandindsamling bør denne vedligeholdes som specificeret i manual og protokol. Pipetter bør vedligeholdes, kalibreres og renses i henhold til vejledninger for disse.

For vandhenteren anbefales det at skylle den del af vandbeholderen, der er i kontakt med vandprøven, behørigt med ferskvand, når al prøvetagning er overstået for dagens feltarbejde. Disse reviderede tekniske anvisninger går på indsamling af marine vandprøver, og derfor er det klogt at skylle rester af saltvand bort, så salt ikke aflejres.

Er det en vandhenter eller vandbeholder, skal den indvendige side (der er i kontakt med vandprøven) skylles behørigt med ferskvand. Er det en vandslange, skal vandslangens indvendige del skylles med minimum 6 gange det volumen vand vandslangen kan indeholde. Slangen skal skylles svarende til minimum 6 gange slange- og pumpesystemets volumen, der kan være i slangen.

For gennemskylning med havvand fra den nye indsamlingslokalitet før vandprøven indsamles henvises der til afsnit 2.1 om metoden og afsnit 2.6.1.

For vedligeholdelse af qPCR-maskinen henvises også til manualen og softwaren for dette apparat.

Primere og prober, samt ekstraktioner fra filtre, og forberedte fortyndingsrækker bør opbevares ved temperaturer under -15°C, for at sikre lang holdbarhed.

For brug og opbevaring af TaqMan EM Master Mix 2.0 henvises til vejledningen for dette produkt.

2.9 Særlige forholdsregler - faldgruber

For at kunne reproducere resultater og sammenholde mål for eDNA er det yderst vigtigt, at både indsamling, opbevaring, ekstraktion og metoden for qPCR-kvantificering besluttet og fastsættes fra start. Afvigelser eller ændringer i protokollen kan influere mængden af eDNA kraftigt, og gøre sammenligninger umulige.

For at sikre senere korrekt identifikation af prøver, er det yderst vigtigt at hvert filter tildeles et unikt nummer. Nummert må ikke genbruges. Det er tilsvarende vigtigt at vandvolumen, dato, lokalitet og opbevaring (indfrysning/udtørring) noteres for hvert unikke nummer.

For sikker detektering forudsættes kendskab til litteraturen omkring sporing ved hjælp af eDNA og til taxonomien for den eftersøgte organisme såfremt *in silico*-designet ikke er baseret på alle tætbeslægtede arter til den eftersøgte art. Derudover forudsættes det også, at brugeren har en god forståelse for både det forudgående *in silico*-design, og *in vitro*-test samt et kendskab til hvordan en real-time PCR-maskine fungerer og aflæses korrekt.

Falske positive signaler kan ikke umiddelbart skelnes fra sande positive. Der gives derfor ingen umiddelbar protokol for sikker eDNA-detektering af arter, men i stedet en række af vejledende retningslinjer som kan sikre korrekt detektering af eDNA.

3 Databehandling

3.1 Beregninger

Beregning og håndtering af data er delt i to, der knytter sig til henholdsvis afsnit 2.1 og 2.6.1 og afsnit 2.3 og 2.6.3 i denne protokol. For afsnit 2.1 og 2.6.1 er der ingen umiddelbar beregning, men data der er indsamlet i forbindelse med hver filterprøve skal indføres i et excel-regneark (eller tilsvarende digitalt format). Det er yderst vigtigt for senere data beregning, og håndtering af data i afsnit 2.3 og 2.6.3, at der er gjort så gode optegnelser og notater under afsnit 2.1 og 2.6.1, som muligt. Jævnfør med tabel 2 herunder. For afsnit 2.3 og 2.6.3 skal det opgøres hvor stor en andel af de tekniske qPCR-replikater, der returnerer positiv amflikation per filter.

Inkorporeres en standard-fortyndingsrække i qPCR-setuppet er det endvidere muligt at kvantificere koncentrationen af eDNA-target-kopier (i kopier per L vand) som udtryk for tæthed og distribution af arten.

Beregningerne knyttet til afsnit 2.3 og 2.6.3 er mere tekniske, og bør udføres i samråd med forskere (fx. ved Københavns Universitet, DTU Aqua, NIVA Danmark eller Aarhus Universitet), der til daglig beskæftiger sig med eDNA.

Som udgangspunkt vil hvert qPCR-setup i en MxPro-maskine generere en tekst-rapport, der let kan eksporteres til excel-regneark eller en komma-separeret fil. For at facilitere den efterfølgende databearbejdning og beregning af eDNA-koncentrationer, skal hvert qPCR-setup indeholde de nødvendige detaljer om unik prøvenummer og primer-probe-system benyttet, som er specificeret under afsnit 2.6.3 omkring qPCR-setup. Et standardiseret setup skal benyttes for alle qPCR-analyser i den efterfølgende databehandling.

3.2 Data og koder

For indsamling af vandprøve i henhold til protokol beskrevet i afsnit 2.1 og 2.6.1 i disse tekniske anvisninger, skal der for hvert filter noteres følgende detaljer (Forkortelseskoder for disse detaljer er angivet i parentes):

Indsamlingslokalitet, breddegrad og længdegrad (lok_pos):

- Temperatur på vandprøve inden filtrering (Temp_Inds).
- Dato for indsamling (Dato_inds).
- Navn på hvem der har indsamlet prøven (Navn_Inds).
- Dybdestrata for den indsamlede prøve (Dyb_Str).
- Volumen vand filtreret (Vwf).
- Unikt nummer for den pågældende prøve, for at sikre at replikat-prøver kan skelnes fra hinanden (U_Pr_Nr).

Ved indsamling og notering af disse informationer kan tabellen herunder (tabel 2) bruges som rekvisitions- eller prøvetagningsskema, der udfyldes for hvert enkelt filter. Tabellen kan printes ud separat, og kopieres, og benyttes i felten og vedlægges ved filterprøven der lægges i zip-lock-posen. Optegnelser og notater gøres med blyant, da blæk og tusch let kan forsvinde ved opbevaring i fryser og på køl.

Tabel 2: Prøvetagnings-skema.

Aktivitet	Notat
Vandprøvenummer (unikt nummer) (U_Pr_Nr)	
Ansvarlig prøvetager, navn (Navn_Inds)	
Skib (skib)	
Institution (Inst)	
Dato (Dato_inds)	
lokaltet, navn/område (Lok_omr)	
position, længde- og breddegrad (lok_pos)	
Max vanddybde på lokalitet (max_Dyb)	
Dybde hvor vandprøve er indhentet fra (Dyb_Str)	
Volumen vand filtreret (Vwf)	
Er vandsøjlen lagdelt, (ja/nej)	
Dybde for lagdelingen (Dyb_lagd)	
Tidspunkt hvor vandprøve er indsamlet (tdspkt_inds)	
Tidspunkt hvor vandprøve er filtreret (tdspkt_filt)	
Tidspunkt hvor vandprøve er indfrosset (<-15°C) (tdspkt_indfr)	
Dato hvor vandprøve er overført fra -15°C til -80°C (dato_80C)	
Temperatur på vandprøve ved indsamling (Temp_Inds)	
Er vandhenter gennemskyllet inden vandprøven blev indsamlet (ja/nej)	
Er pose og filter udskiftet i PAF-enhed inden prøven blev filtreret (ja/nej)	
Vandprøven blev indsamlet samtidigt med (bundfauna/makroalge/zooplankton/fytoplankton /fiskeri)	
Restvand er presset ud af filteret inden indfrysning (ja/nej)	
Zip-lock-pose med filter er markeret med dato, unikt nummer og lokalitet (ja/nej)	
Vandprøven er indfrosset (Frys) eller tilsat buffer (Buff)	
Andre noter	

For hver ekstraktion af filtre, skal følgende noteres (forkortelseskoder for disse detaljer er angivet i parentes):

- Unikt nummer for den pågældende prøve, skal være identisk med nummeret tildelt under filtrering (U_Pr_Nr).
- Dato for ekstraktion (Dato_eks).
- Ekstraktionskit benyttet (Eks_Kit).
- Volumen elueringsbuffer benyttet under ekstraktionen (Vol_EB).
- Temperatur hvorunder det ekstraherede filtrat opbevares (Temp_Ex_Opb).
- Målt koncentration på det ekstraherede eDNA (Cex_eDNA).

For hver kvantitativ PCR-setup skal følgende data noteres (forkortelseskoder for disse detaljer er angivet i parentes):

- Unikt fortløbende nummer tildelt pladen med alle qPCR-reaktioner (Q_Nr).
- Filnavn tildelt pladen med qPCR-reaktionerne. Et unikt nummer der også skal indeholde det unikke fortløbende nummer tildelt pladen med qPCR-reaktionerne (QPI_No).
- Dato for qPCR (Dato_qpcr).
- Total volumen på qPCR-reaktioner (vol_qpcr_rxn).
- Eftersøgt art (Eft_art).
- Primer- og probe-system benyttet (prim_prob_sys).
- Antallet af reaktioner (Nr_rxn).
- Antallet af NTC-reaktioner (NTC_rxn).
- Antallet af replikater for hver filtrat-ekstraktion (Repl_unk_rxn).
- Antallet af replikater for hver standard-fortyndingsrække (Repl_SD_rxn).
- Hvilke ekstraktioner af hvilke filtrater der er forsøgt analyseret i den pågældende qPCR, dvs. hvilke 'U_Pr_Nr' der er testet.
- Volumen af ekstraheret filtrat ('template') fra hver 'U_Pr_Nr'-ekstraktion der er forsøgt testet per reaktionsrør (Vol_EksFil).
- Hvilken type real-time kvantitativ PCR-maskine der er benyttet (Type_qpcr_mask).
- Hvem der har foretaget qPCR-analysen (Resp_qPCR).

4 Kvalitetssikring

Den måske vigtigst forudsætning for en grundig kvalitetssikring er en faglig forståelse og systematisk tilgang til de potentielle kilder til usikkerheder i forbindelse med prøvetagningen, transporten, konserveringen og analyserne i laboratorium.

Disse tekniske anvisninger for eDNA-baseret overvågning af ikke-hjemmehørende marine arter indeholder – i modsætning til de under NOVANA-programmet gældende tekniske anvisninger (se <http://bios.au.dk/raadgivning/fagdatacentre/fdcmarintny/gældendetekniskeanvisninger/#c236812>) – et bilag som systematisk gennemgår de mulige kilder til usikkerhed (se bilag 1).

4.1 Kvalitetssikring af metode

Der er p.t. ikke knyttet nogen kvalitetssikring til disse tekniske anvisninger. Såfremt optegnelser er gjort som anført i tabel 2, og forholdsregler er gjort som beskrevet under metode afsnittet, kan det antages at de filtrerede vandprøver er af behørig kvalitet.

Vandprøvefiltrering kan kvalitetssikres yderligere ved at en steril vandprøve, medbragt forinden, filtreres på indsamlingslokaliteten. En sådan blank filtreringsprøve kan derpå analyseres i afsnit 2.2 og 2.6.2 og afsnit 2.3 og 2.6.3.

4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering

Der er p.t. ikke knyttet nogen kvalitetssikring til disse tekniske anvisninger. Såfremt analyser beskrevet i afsnit 2.2 og 2.6.2 og afsnit 2.3 og 2.6.3 er foretaget med inklusion af negative kontroller, antages det at de indsamlede data er troværdige og kvalitetssikrede.

5 Referencer

- Agersnap, S., Larsen, W.B., Knudsen, S.W., Strand, D., Thomsen, P.F., Hesselsøe, M., Mortensen, P.B., Vrålstad, T. & Møller, P.R. (2017): Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS One* 12, e0179261.
- Andersen, J.H., Pedersen, S.A., Thaulow, J., Stuer-Lauridsen, F., Kristensen, D. & Cochrane, S. (2014): Monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters: Background and proposal for a monitoring strategy and a monitoring network. *Rapport fra Naturstyrelsen*, 54 pp.
- Andersen, J.H., Kallenbach, E., Hesselsøe, M., Møller, P.R., Bekkevold, D., Hansen, B.K. & Thaulow, J. (2016): Steps toward nation-wide monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters under the Marine Strategy Framework Directive. *NIVA Denmark report*, 122 pp.
- Andersen, J.H., Kallenbach, E., Thaulow, J., Hesselsøe, M., Bekkevold, D., Hansen, B.K., Jacobsen, L.M.W., Olesen, C.Aa., Møller, P.R. & Knudsen, S.W. (2017): Development of species-specific eDNA-based test systems for monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters. *NIVA Denmark report*, 77 pp.
- Andersen, J.H., Kallenbach, E., Kjeldgaard, M.B., Knudsen, S.W., Eikrem, W., Fagerli, C., Oug, E., Dahle, T., Thaulow, J., Gitmark, J., Hobæk, A., Green, N., Hesselsøe, M., Støtterup, J., Kuhn, J., Bekkevold, D., Jacobsen, L.M.W., Møller, P.R., Olesen, C.Aa., Carl, H. & Stuer-Lauridsen, F. (2019): A baseline study of the occurrence of non-indigenous species in Danish harbours. *NIVA Denmark Report*, 161 pp.
- Andruszkiewicz, E.A., Sassoubre, L.M. & Boehm, A.B. (2017): Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight. *PLoS ONE* 12(9): e0185043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185043>
- Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R.A., Foster, J., Wilkinson, J.W., Arnell, A., Brotherton, P., Williams, P., Dunn, F., (2015): Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183: 19-28.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. & Wittwer, C.T. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55:611-622.
- Casariil AE, de Oliveira LP, Alonso DP, de Oliveira EF, Gomes Barrios SP, de Oliveira Moura Infran J, Fernandes WS, Oshiro ET, Ferreira AMT, Ribolla PEM, de Oliveira AG. (2017): Standardization of DNA extraction from sand flies: Application to genotyping by next generation sequencing. *Exp Parasitol*. 177: 66-72. doi: 10.1016/j.exppara.2017.04.010.
- Collins, R.A., Wangenstein, O.S., O'Gorman, E.J., Mariani, S., Sims, D.W., & Genner, M.J. (2018): Persistence of environmental DNA in marine systems. *Commun. Biol.* 1:185. doi: 10.1038/s42003-018-0192-6.
- Deiner, K., Walser, J.-C., Mächler, E. & Altermatt, F. (2015): Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biol. Conserv.* 183:53-63.
- Deiner, K., Lopez, J., Bourne, S., Holman, L.E., Seymour, M., Grey, E.K., Lacoursière-Roussel, A., Li, Y., Renshaw, M.A., Pfrender, M.E., Rius, M., Bernatchez, L., Lodge, D.M. (2018): Optimising the detection of marine taxonomic richness using environmental DNA metabarcoding: the effects of filter material, pore size and extraction method. *Metabarcoding and Metagenomics* 2: 1-15. DOI 10.3897/mbmg.2.28963
- Ellison, S.L.R., English, C.A., Burns, M.J. & Keer, J.T. (2006): Routes to improving the reliability of low-level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnol.* 6:33.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F. & Taberlet, P. (2008): Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4:423-425.
- Fossing, H., Hansen, J.W., Jakobsen, H., Markager, S. & Møller, E.F. (2019): Indsamling af vand- og planktonprøver i felten. *Teknisk anvisning M01*. 17 pp. https://bios.au.dk/fileadmin/bioscience/Fagdatacentre/MarintFagdatacenter/TekniskeAnvisninger2011_2015/TA_M01_Indsamling_af_vand-og_planktonproever_i_felten_ver1.pdf

- Goldberg, C.S., Pilliod, D.S., Arkle, R.S. & Waits, L.P. (2011): Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. *PLoS ONE* 6, e22746.
- Goldberg, C.S., Strickler, K.M., Pilliod, D.S., (2015): Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation* 183: 1-3.
- Jo, T., Murakami, H., Yamamoto, S., Masuda, R., & Minamoto T. (2019): Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecol Evol.* 9(3):1135-1146. doi: 10.1002/ece3.4802
- Kibbe, W.A. (2007): OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research.* 35:43-46. doi: 10.1093/nar/gkm234. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059520>
- Knudsen, S.W., Hesselsøe, M., Bekkevold, D., Jensen, S.K.S., Møller, P.R. & Andersen, J.H. (2018): Tekniske anvisninger for eDNA-baseret overvågning af ikke-hjemmehørende marine arter. NIVA Danmark rapport, 32 pp.
- Knudsen, SW, RB Ebert, PB Mortensen, F Kuntze, M Hesselsøe, J Hassingboe, PF Thomsen, EE Sigsgaard, E Egg & PR Møller (2019): Species-specific detection of six commercially important marine fishes in the Baltic Sea using environmental DNA. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 510:31-45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.09.004>
- Majaneva, M., Diserud, O.H., Eagle, S.H.C., Boström, E., Hajibabaei, M. & Ekrem T. (2018): Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Sci. Rep.* 8: 4682. doi: 10.1038/s41598-018-23052-8.
- Mardis E, McCombie WR. et al. (2017): Library Quantification: Fluorometric Quantitation of Double-Stranded or Single-Stranded DNA Samples Using the Qubit System. *Cold Spring Harb Protoc.* 2017(6): pdb.prot094730.
- Olson, Z.H., Briggler, J.T. & Williams, R.N. (2012): An eDNA approach to detect eastern hellbenders (*Cryptobranchus a. alleganiensis*) using samples of water. *Wildlife Research* 39: 629-636. <https://doi.org/10.1071/WR12114>
- Pedersen, M.W., Overballe-Petersen, S., Ermini, L., Sarkissian, C. Der, Haile, J., Hellstrom, M., Spens, J., Thomsen, P.F., Bohmann, K., Cappellini, E., Schnell, I.B., Wales, N.A., Carøe, C., Campos, P.F., Schmidt, A.M.Z., Gilbert, M.T.P., Hansen, A.J., Orlando, L. & Willerslev, E. (2015): Ancient and modern environmental DNA. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370: 20130383.
- Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S. & Waits, L.P., (2013): Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 70(8): 1123-1130. DOI: 10.1139/cjfas-2013-0047
- Renshaw MA, Olds BP, Jerde CL, McVeigh MM, Lodge DM. (2015): The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular Ecology Resources* 15 (1): 168-176. doi: 10.1111/1755-0998.12281.
- Sigma Aldrich (2020): <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11444646001?lang=en®ion=DK>
- 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., Bach, S.S., Lorenzen, E.D., Robinson, D.P., Knudsen, S.W., Pedersen, M.W., Jaidah, M.A., Orlando, L., Willerslev, E., Møller, P.R. & Thomsen, P.F. (2016): Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology & Evolution* 1:0004.
- 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* 164:128.
- 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 (5): 635-645. doi:10.1111/2041-210X.12683

- Strickler, K.M., Fremier, A.K. & Goldberg, C.S. (2015): Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biol. Conserv.* 183:85-92.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M. & Rieseberg, L.H. (2012): Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 1789-1793.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H. & Kawabata, Z. (2012): Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE* 7, e35868.
- Takahara, T., Minamoto, T. & Doi, H. (2013): Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS ONE* 8, e56584.
- Takahara, T., Minamoto, T. & Doi, H. (2014): Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Biol. Conserv.* 183:64-69.
- Thomsen, P.F. & Willerslev, E. (2015): Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Cons.* 183:4-18.
<http://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>.
- Thomsen, P., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L. & Willerslev, E. (2012a): Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21:2565-2573.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M. & Willerslev, E. (2012b): Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One* 7, e41732.
- Thomsen, P.F., Møller, P.R., Sigsgaard, E.E., Knudsen, S.W., Jørgensen, O.A. & Willerslev, E. (2016): Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PLoS ONE* 11, e0165252. doi:10.1371/journal.pone.0165252.
- Treguier, A., Paillisson, J.-M., Dejean, T., Valentini, A., Schlaepfer, M. & Roussel, J.-M. (2014): Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *J. Appl. Ecol.* 51: 871-879.
- Tsuji, S., Ushio, M., Sakurai, S., Minamoto, T. & Yamanaka, H. (2017): Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLoS ONE* 12, e0176608.
- Turner, C.R., K.L. Uy & R.C. Everhart (2015): Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation* 183: 93-102.
- Vang, T. (2014): CTD måling. Teknisk Anvisning M01-M04. Aarhus Universitet, DCE, Nationalt Center Miljø og Energi.
- Wilcox, T.M., McKelvey, K.S., Young, M.K., Jane, S.F., Lowe, W.H., Whiteley, A.R. & Schwartz, M.K. (2013): Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PLoS ONE* 8, e59520.
- Willerslev, E., Hansen, A.J., Binladen, J., Brand, T.B., Gilbert, M.T.P., Shapiro, B., Bunce, M., Wiuf, C., Gilichinsky, D.A. & Cooper, A. (2003): Diverse plant and animal genetic records from holocene and pleistocene sediments. *Science* 300:791-795. [http:// dx.doi.org/10.1126/science.1084114](http://dx.doi.org/10.1126/science.1084114).
- Zharkov, D.O., G.V. Mechetin & G.A. Nevinsky (2010): Uracil-DNA glycosylase: Structural, thermodynamic and kinetic aspects of lesion search and recognition. *Mutation research*, 685(1-2): 11-20.
doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.10.017

Bilag 1: Kilder til usikkerheder i forbindelse med prøvetagning, transport, konservering og analyser

DNA fra organismer der kan findes frit i miljøet kaldes ofte miljø-DNA, environmental DNA eller bare eDNA. Forekomst af eDNA indikerer normalt nylig forekomst af den organisme, som DNA-materialet kommer fra (Thomsen & Willerslev 2015, Sigsgaard *et al.* 2017) og i umiddelbar nærhed – måske de nærmeste kilometers radius (Pont *et al.* 2018).

Analyser af eDNA kommer givetvist til at udgøre en del af fremtidens biodiversitetsmonitoring og arbejdet med at udvikle metoderne er i fuld gang. Metodernes store potentiale er bekræftet gennem et stort antal publikationer og studier fra hele verden, som er offentliggjort siden de første store gennembrud på området omkring år 2012 (se f.eks. Ficotela *et al.* 2008, Port *et al.* 2016, Taberlet *et al.* 2012, Evans *et al.* 2016, Knudsen *et al.* 2019, Thomsen *et al.* 2012a,b, Wilcox *et al.* 2013, Sigsgaard *et al.* 2015, Thomsen *et al.* 2016, Yamamoto *et al.* 2016).

Der er imidlertid en række forhold, som det er vigtigt at være opmærksom på, når eDNA anvendes til monitoring af biodiversitet. I dette notat gennemgås nogle af de mulige problemer og usikkerheder der kan opstå fra sampling til analyse. Dette bilag til de tekniske anvisninger omfatter en vurdering af de enkelte trin fra prøvetagning til analyse og databearbejdning.

eDNA undersøgelser opdeles normalt i to hovedgrupper:

- PCR/qPCR som baseres på detektion af enkelte arter. Også refereret til som arts-specifik sporing af eDNA, fx Agersnap *et al.* (2017), Knudsen *et al.* (2019) og Sigsgaard *et al.* (2015).
- Metabarcoding/metagenomics (baseret på samtidige sekvensanalyser af flere arter/taxa ad gangen), fx som i studiet af Thomsen *et al.* (2016).

Det fører for vidt i denne sammenhæng at beskrive metoderne i detaljer. Dette notat fokuserer alene på de usikkerheder, som er knyttet til eDNA-detektion i vandprøver med qPCR. Der henvises til videnskabelige publikationer fx Thomsen & Willerslev (2015) og Taberlet *et al.* (2012) for en nærmere gennemførelse af fordel og ulemper og usikkerheder knyttet til de forskellige metoder. Nogle af de faktorer der beskrives vil også have betydning for andre typer af analyser.



1. Sampling

1.1 Sted og dybde

Sted og vanddybde hvor prøvetagningen udføres er naturligvis afgørende for, hvilke arter der kan detekteres. Man kan kun forvente et positivt eDNA-signal, hvis prøven indsamles et sted, hvor den art der ledes efter også forekommer.

Generelt er det erfaringen, at eDNA opblandes effektivt hvis vandet på lokaliteten er i opblanding. Hvis vandet ikke opblandes fx på grund af temperaturspringlag eller salinitetsgradienter, så må man forvente en dårlig opblanding af eDNA, og alt afhængigt af hvilket niveau i vandsøjlen vandprøven indsamles kan et varierende signal af eDNA forventes.

Derudover er det rimeligt at antage, at der vil være sæsonvariation i mængden af eDNA fra de forskellige organismer, alt afhængigt af de pågældende organismers økologi og livscyklus. På tidspunkter hvor der enten gydes eller kan forventes store opblomstringer af den eftersøgte organisme, må det også antages at der sikkert er større mængder af eDNA tilstede i vandsøjlen. Der er lavet en studie der fokuserer på sæsonvariation (Sigsgaard *et al.* 2017), og egne erfaringer med eDNA fra marine ikke-hjemmehørende arter har også vist, at der er forskel mellem forår og efterår. Men der mangler stadig forskning på dette område.

Der er få detaljerede studier, som har undersøgt fordelingen af eDNA i vandsøjlen. Overordnet må det forventes, at hvis der eftersøges bundlevende organismer så bør prøven tages nær bunden. Eftersøges pelagiske organismer, så bør prøven tages øverst i vandsøjlen. Ofte er det dog muligt at detektere bundlevende organismer, selv i en vandprøve taget ved overfladen. Dette vil afhænge af mængden af eDNA der frigives til vandet og opblandingen i vandsøjlen.

Ved prøvetagning nær bunden er det vigtigt, at undgå eller begrænse mængden af organiske og uorganiske partikler i prøven. Hvis protokollen for prøvetagning er udviklet til analyse af vandprøver, så vil partikler ofte give problemer for de efterfølgende analyser. Partiklerne kan føre til flere forskellige typer problemer.

Partiklerne kan tilstoppe filteret så den samlede prøvestørrelse reduceres. Hvis prøvestørrelsen reduceres, så vil muligheden for at detektere eDNA i prøven alt andet lige også reduceres.

Partiklerne kan (især ved indsamling af ferskvandsprøver) indeholde humusstoffer der ødelægger eller reducerer følsomheden af de molekylærbiologiske undersøgelser. Fx kan humusstoffer i nogle tilfælde helt forhindre analyse med PCR-baserede metoder. Det er dog muligt at adskille DNA og humusstoffer inden analyse. Denne procedure vil dog også reducere følsomheden betydeligt. Endelig er det påvist at eDNA gemmes relativt effektivt og længe i sediment (Turner *et al.* 2015), hvorfor sediment i en vandprøve kan betragtes som en kontaminering fra organismer der tidligere levede i området. For at få en bedre idé om hvorvidt der er hæmmende stoffer med i vandprøven der analyseres, kan der tilsættes en intern positiv kontrol.

1.2 Opkoncentrering/filtrering

Sampling af eDNA fra vandmiljøet kræver normalt opkoncentrering af vandprøven. Opkoncentrering udføres ved filtrering. Der kan anvendes forskellige filtreringsmetoder og forskellige filtre.

Dels filtrering baseret på tangential flow filtrering, hvor prøven op koncentrerer 10-1000 gange i en suspension. Dels opkoncentrering ved såkaldt dead-end filtrering. Den efterfølgende protokol for DNA ekstraktion afhænger af opkoncentreringsmetoden.

Den opkoncentreringsmetode som oftest anbefales i øjeblikket er dead-end filtrering på et kolonnefilter. Det er denne filtreringsmetode som pt. anbefales i Miljøstyrelsens tekniske anvisninger (Knudsen *et al.* 2018). Anbefalingen bygger på studierne af Spens *et al.* (2017) og Djurhuus *et al.* (2017). Det er afgørende for DNA-analysens følsomhed hvor meget prøve der filtreres. Hvis man eftersøger eDNA fra sjældne organismer, eller organismer der kun frigiver lidt eDNA til vandet, så er filtreringsvolumet ofte afgørende for, om der opnås et positivt signal eller ej. Filtreringsvolumet skal altid noteres ved sampling, så det efterfølgende analyseresultat kan relateres til det volumen der er indsamlet i felten.

Koncentrationen af eDNA i vandet er bestemt af en ligevægt mellem frigivelse af eDNA til vandet fra de levende organismer vi leder efter, og samtidig nedbrydning og fortynding af DNA. Så snart vandprøven er taget så ophører frigivelsen af eDNA, mens nedbrydningen fortsætter. Derfor anbefales det altid, at filtrering og fiksering (næste afsnit) udføres så hurtigt som muligt efter prøven er taget.

1.3 Fiksering

Fiksering skal sikre eller minimere nedbrydningen af eDNA efter prøven er taget. Der findes flere metoder til fiksering.

Første trin i fikseringen er, at alt vand fra prøven skal fjernes fra filteret. Det sker ved at vandet suges eller pustes ud af filteret til filtrat siden. Det kan være vanskeligt at få alt vandet ud. Det er imidlertid helt afgørende, at den resterende vandmængde er så lille som mulig inden fikseringsproceduren starter.

Hvis prøver skal sammenlignes kvantitativt fra flere forskellige steder, dybder, årstider eller lignende, så er det vigtigt for sammenligningen, at fikseringen er foretaget på den samme måde for hver prøve. Hvis prøverne kun skal sammenlignes kvalitativt, så kan man bedre acceptere forskelle i fikseringsproceduren. At restvand fjernes er vigtigt for alle fixeringsmetoder.

Forskningen omkring filtrering, fiksering og opbevaring af filtrerede vandprøver er i rivende udvikling, se eksempelvis Djurhuus *et al.* (2017), Spens *et al.* (2017) og Majaneva *et al.* (2018). Det er desværre ikke entydigt hvilken filtrering og fikseringsmetode der er optimal. Der er studier som antyder, at både filtrering og fiksering bør justeres, alt efter hvilken form for eDNA sporings metode der benyttes (metabarcoding eller artsspecifik sporing) og hvilke organismer der skal eftersøges (hvirveldyr, hvirvelløse dyr, alger eller planter). På nuværende tidspunkt anbefales fiksering ved øjeblikkelig (indenfor 1 time) indfrysning af et tørt filter ved -20°C, se også den tekniske anvisning (Knudsen *et al.* 2018).

1.3.1 Frysning og køling

Den anbefalede metode til fiksering er frysning. Ved frysning sættes DNA nedbrydningsprocesserne i stå, og DNA kan holde meget længe (årevis), hvis frysningen opretholdes uden afbrydelser.

Derfor anbefales frysning i felten efter filtrering ved hjælp af tørre is, som straks bringer den filtrerede prøve langt under nulpunktet. Alternativ nedkøling på almindelig is er ikke lige så effektiv. Hvis der nedkøles på is, så bør prøven hurtigst muligt bringes på frost. Er prøven indsamlet ombord på et skib med større frysekapacitet, kan prøven også indfryses straks i en almindelig fryser (< -15°C), og tørre is er så unødvendig.

Det er afgørende for effekten af frysning, at der ikke sker midlertidige optøninger fx i forbindelse med transport. Transport bør derfor også ske på tøris.

Anvendes frysning til fiksering, så er det meget vigtigt at prøverne forinden er opkoncentreret (forrige afsnit), da det kan være umuligt eller meget vanskeligt, at udføre opkoncentrering efter frysning og optøning. Det skyldes at frysning kan medføre, at mere eDNA findes opløst i vandet og derfor næppe bliver fanget ved filtrering.

1.3.2 Fikseringsvæske m.m.

Som alternativ til frysning findes forskellige typer fikseringsvæske. Disse kemikalier kan tilsættes prøven efter filtrering. Tidligere studier af eDNA har gennemført forskellige test af forskellige filtre og fikseringsvæsker (Spens *et al.* 2017, Djurhuus *et al.* 2017, Majaneva *et al.* 2018, Deiner *et al.* 2015). Formålet med fixeringsvæsken er at stoppe DNA nedbrydningen. Fixeringsvæskerne er typisk aktive ved alle temperaturer, og kan anvendes til at begrænse nedbrydningen af DNA i filteret, hvis frysning ikke er mulig straks. Alt andet lige, er prøven bedre fikseret ved frysning, så derfor bør prøven opbevares så meget som mulig på frost, også selvom fikseringsvæske er tilsat. Der er også nogle få studier, der har fikseret eDNA'et på filtre ved simpel udtørring, vha. silica (se Majaneva *et al.* 2018).

1.4 Kontaminering

I alle dele af arbejdet med eDNA, er risikoen for kontaminering af største betydning for resultaterne. Ved sampling er følgende faktorer afgørende, for at minimere risikoen for kontaminering:

- Prøverne må aldrig tages af personer, der samtidig arbejder med håndtering af en eller flere af de organismer, som skal eftersøges i prøven.
- Prøvetagerne skal forsynes med engangshandsker og evt. mundbind.
- Prøvetagningen skal udføres med engangsudstyr.
- Forskellige prøver må aldrig komme i kontakt med hinanden. Der bør som udgangspunkt tages en blank prøve (negativ kontrol) i felten, samtidig med den øvrige indsamling, fx af postevand.

1.5 Transport og opbevaring

Korrekt og optimal behandling af prøverne i forbindelse med transport og opbevaring er afgørende for analysernes resultat.

Hvis prøver skal sammenlignes kvantitativt fra flere forskellige steder, dybder, årstider eller lignende, så er det vigtigt for sammenligningen, at opbevaringen og transport er foretaget på den samme måde for hver prøve. Hvis prøverne kun skal sammenlignes kvalitativt, så kan man bedre acceptere forskelle i transport og opbevaring.

Den rigtige opbevaringsmetode afhænger af fixeringsmetoden.

Generelt anbefales langtidsopbevaring på frost uanset fixeringsmetoden.

Forsendelse skal også ske på frost (tøris), hvis prøven er fixeret på frost (uden fixeringsvæske). Dette er nødvendigt for at undgå optøning. Gentagen optøning og nedfrysning vil skade prøven.

For prøver med fixeringsvæske kan transport ske ved stuetemperatur eller på køl. Hver gang man ændrer temperaturen ved opbevaringen vil man miste noget af prøven, så antallet af gange man optør og nedfryser prøven skal reduceres til et minimum.

2. Analyse

2.1 Minimumskrav til analyse

Minimumskravene til analyser er, at der udføres 3 tekniske gentagelser for hver mål-art for hver prøve. Derudover inkluderes en standardkurve for hver mål-art. Standard kurven er en fortyndingsrække af en positiv kontrol med DNA ekstraheret fra en vævsprøve fra målarten eller lignende, der stammer fra mål-arten. Standardkurven skal omfatte mindst 4 dekaders fortynding og gentagelser særligt ved de laveste fortyndinger. Laveste fortynding af standardkurven bør give et negativt resultat. Hvis dette ikke er tilfældet, så har standarden ikke været tilstrækkeligt fortyndet.

Derudover inkluderes altid negative kontroller. Disse kontroller vil hurtigt vise, hvis reagenser eller laboratorium er blevet kontamineret med uønsket DNA.

Derudover bør man inkludere en intern PCR-kontrol (IPC) for hver af vandprøverne. Den interne positive kontrol, vil indikere om der er PCR-hæmmende stoffer i ekstraktionen fra vandprøven. Reduktion i signalet fra IPC kan bruges til at korrigere eDNA-målinger fra prøver med delvis hæmning af PCR-reaktionen.

2.2 Fejlkilder i laboratoriet

Laboratoriearbejde med eDNA kræver ekstremt meget fokus på at undgå kontaminering. Laboratoriearbejde forudsættes udført af professionelle med kendskab til almindelig god laboratoriepraksis.

Laboratoriearbejdet kan opdeles i tre trin: 1) DNA-ekstraktion, 2) PCR-opsætning (pre-PCR) og 3) PCR-analyse (post-PCR). De tre dele af arbejde bør udføres i tre adskilte rum for at begrænse risikoen for kontaminering. Det er særligt vigtigt at der aldrig er kontakt mellem post-PCR og de to øvrige laboratorier. Det skyldes at PCR-processen opformerer DNA fra de arter der ledes efter. Derfor kan der forekomme kilder til meget store kontamineringer af prøverne fra dette laboratorium. Er der først konstateret kontaminering med PCR-produkter i de øvrige laboratorier, så kan alle resultater der produceres blive påvirket, og det kan være helt umuligt at sikre tilfredsstillende renhed igen. For at overvåge eventuel kontaminering, så er det vigtigt altid at inkludere negative kontroller i arbejdet.

Hvis der ses qPCR-resultater fra de negative kontroller, så skal disse resultater indgå i evalueringen af analyseresultaterne. Ligger de negative kontroller inden for samme område som standardkurven, så kan der være tale om kontaminering som potentielt kan påvirke resultatet af alle prøver.

2.3 Specificitet af artsspecifikke detektionssystemer

Alle de 22 artsspecifikke qPCR-detektionssystemer rettet mod ikke-hjemmehørende marine arter i Danmark, er udviklet i samarbejde med Københavns Universitet (Andersen *et al.* 2018). Alle detektionssystemer er testet på vævsmaterialer fra mål-arter og nærtbeslægtede ikke-mål arter, der forekommer i det Nordvesteuropæiske område. Langt hovedparten af de udførte test, er baseret på eksemplarer som findes i museumssamlinger (hovedsagligt Zoologisk Museum i København), som dermed kan tjene for eventuel senere re-identifikation af både den eftersøgte art, samt andre sameksisterende og tætbeslægtede arter.

Negative resultater kan ikke tages som et sikkert udtryk for mållartens fravær på lokaliteten. Mange forhold kan påvirke forekomsten af eDNA, fx indsamlingstidspunkt, opbevaring af prøven, indsamlingsdybde mm. Svage eDNA-signaler bør tolkes med stor forsigtighed for at minimere risikoen for falske positive.

De 22 artsspecifikke detektionssystemer er kun testet mod nærtbeslægtede og sameksisterende arter i det nordeuropæiske område. Forekomst af falske positive kan ikke afvises ved anvendelse af analyserne på prøver fra andre dele af verden eller i områder, hvor andre nært beslægtede arter også forekommer. Nært beslægtede arter der ikke blev inkluderet i de indledende sammenligninger og valideringer fremgår af Andersen *et al.* 2016, 2017, 2018. Idet teknikken er baseret på små genetiske forskelle i DNA mellem den eftersøgte art og andre evolutionært tæt beslægtede arter, vil det ikke kunne afvises, at falsk positiv sporing af eDNA kan forekomme, såfremt sporingssystemerne benyttes på prøver indsamlet uden for det anbefalede virkeområde.

Der kan være genetiske forskelle mellem populationer i forskellige dele af udbredelsesområdet. Der tages generelt forbehold for ukendte DNA-forskelle på target-arter og non-target-arter, som ikke er inkluderet i de udførte *in vitro*-tests. De udførte test fremgår af tidligere publicerede rapporter (Andersen *et al.* 2017, 2018).

Der tages generelt forbehold for DNA-sekvenser fra organismer, der var ukendte i de offentligt tilgængelige databaser (National Center of Biotechnology Information GenBank), da udviklingsarbejdet blev gennemført (Andersen *et al.* 2016, 2017, 2018). Som udgangspunkt henvises der til *in silico*-sammenligninger og *in vitro*-tests (Andersen *et al.* 2017, 2018). Disse test angiver, hvilke andre sameksisterende arter, der kan mistænkes at give ophav til potentiel positiv detektion. For evolutionært tæt-beslægtede arter, der kan tænkes at sameksistere med den eftersøgte art, kan store populationstætheder af sådanne evolutionært tæt beslægtede arter i sjældne tilfælde give ophav til falsk positiv detektion. Dette vil typisk ske hvis det udviklede og efterprøvede sporingssystem kun er testet på én population, mens en anden population med en anden genetisk variation ikke kan opfanges af sporingssystemet. Det er derfor nødvendigt, at positiv sporing altid sammenholdes med, hvilke andre evolutionært nært beslægtede arter, der kan formodes at sameksistere med den eftersøgte art. Derudover bør det overvejes om arten der efterspores eventuelt kan forefindes i adskilte del-populationer der har meget lille genetisk udveksling.

Resultater, der afrapporteres som "måske positive", kontrolleres til højere sikkerhed ved sekventering af positive qPCR-produkter. Positive qPCR-produkter skal derfor gemmes med henblik på senere validering ved sekventering.

Ønskes kvantificering af det sporede eDNA, bør der udføres mange gentagelser på prøvetagningen (filtrering), samt yderligere tekniske gentagelser af de udførte analyser. Der er ofte stor varians på kvantificering ved hjælp af qPCR, og man kan kun forvente resultater, der indikerer størrelsesorden (inden for dekader).

Der foreligger meget få studier, der undersøger korrelation mellem bestandstætheder og eDNA-mængder. Se fx studierne af Agersnap *et al.* (2017) og Knudsen *et al.* (2019) samt Yamamoto *et al.* (2016), hvor eDNA koncentrationer sammenholdes med forskellige konventionelle målinger af biomasse. Der er endnu ikke noget der tyder på, at bestandstætheden kan bestemmes præcist ud fra måling af eDNA-mængder.

Ved kvantitative anvendelse af eDNA kan man aldrig sammenligne på tværs af forskellige sporingssystemer. Det skyldes at forskellige eDNA sporingssystemer vil have forskellig evne til at spore eDNA fra de mål-arter de er designet til. Men eDNA-koncentrationen kan i nogle tilfælde med forsigtighed anvendes til kvantitativ sammenligning af forskellige lokaliteter, der er undersøgt for forekomst af samme art.

3. Databearbejdning

Det anbefales at der anlægges en forsigtig tilgang til databearbejdning af eDNA analyser baseret på qPCR og at en tilsvarende forsigtig tilgang anlægges for tolkning af resultater. Forsigtig tilgang minimerer risikoen for falske positive. Til gengæld vil de svageste resultater afrapporteres som "måske positive".

En forsigtig tilgang indebærer også et godt forudgående kendskab til den eftersøgte organismes biologi, økologi, taksonomi og livscyklus. Kraftigt positive signaler kan skyldes at vandprøverne er blevet indsamlet i et tidsvindue hvor aktivitet og livscyklus er høj. Mens falske positive kan skyldes, at det pågældende sporingssystem ikke er tilfredsstillende testet imod en kryptisk art, der endnu ikke er beskrevet taksonomisk endsiige kendt ved genetisk sekventering.

3.1 Definition af LOD og LOQ

Første trin i databearbejdningen er at definere den nedre detektionsgrænse 'Limit of detection' (LOD) og den nedre kvantificeringsgrænse 'Limit of quantification' (LOQ). Grænserne defineres ud fra C_q-værdi som aflæses ud fra data fra qPCR-maskinen.

Der findes forskellige tilgange til definition af LOD og LOQ i forbindelse med qPCR- analyser (Wilcox *et al.* 2013). I denne sammenhæng anbefales det, at definere LOD og LOQ ud fra standard-kurven.

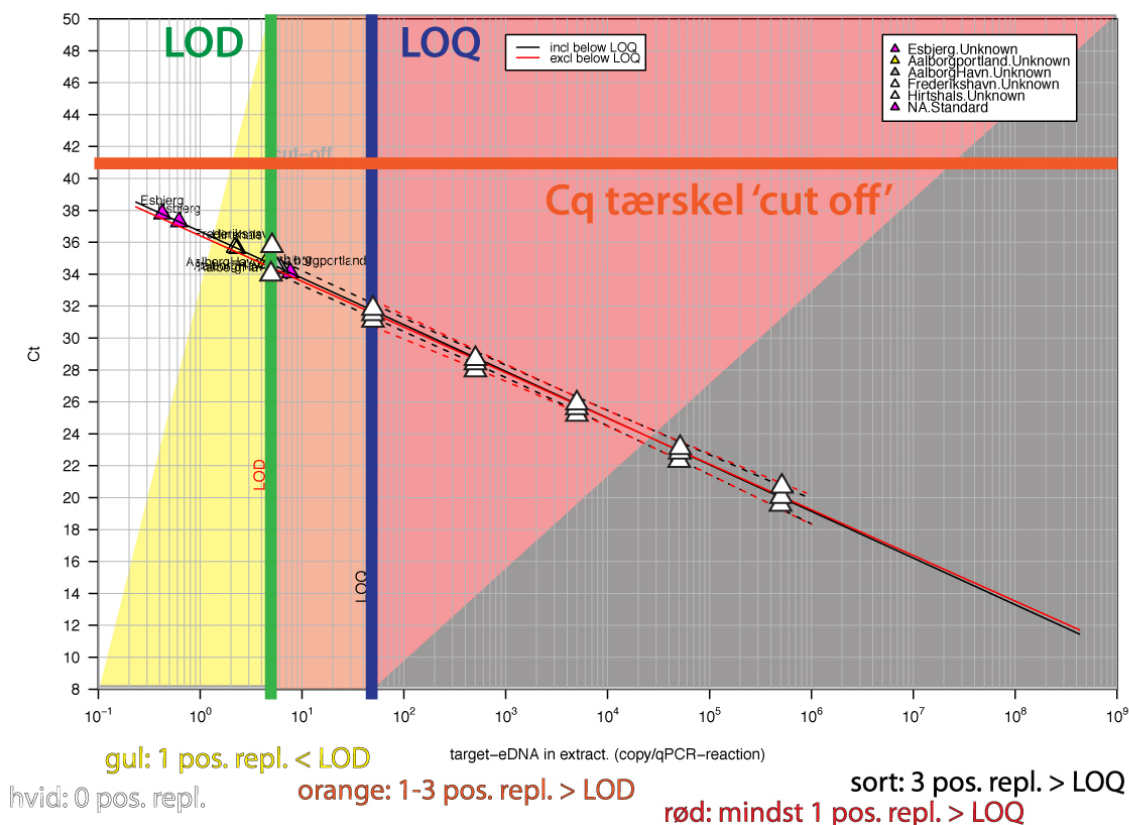
LOD og LOQ skal defineres på ny i forbindelse med hver udførelse af en arts specifik qPCR-analyse. Standardkurver fra tidligere analyser kan således aldrig genbruges, selvom de er udført på samme artsspecifikke sporingssystem. Et eksempel på definition og fastsættelsen af LOD og LOQ ud fra standardkurven ses i Figur A1.

LOD og LOQ anbefales defineret som følger:

- LOQ: 'Limit of quantification'. Laveste reproducerbare standard. Det laveste fortyndingsniveau af standardrækken, hvor alle gentagelser er positive og ligger nogenlunde inden for samme område. Alle gentagelser af højere koncentrationer af standardrækken skal samtidig være positive.
- LOD: 'Limit of detection'. Laveste positive standart. Det laveste fortyndingsniveau af standardrækken hvor minimum én af gentagelserne er positiv. Der kan godt være mere end en gentagelse af standardrækken der er positiv.

(No Ct / Below LOD / Above LOD below LOQ / Above LOQ)

(n/n/n/n)



Figur A1. Standardkurven fra en qPCR-opsætning kan plottes i et logaritmisk plot. De hvide trekanten er standardkurven (fortyndingsrække af kendte tilsatte koncentrationer). De øvrige trekanten repræsenterer vandprøvernes eDNA-niveau. Eksempel på definition af LOD (grøn linje) og LOQ (blå linje) ud fra standardkurve. I eksemplet er de analyserede prøver vist med pink trekanten. Det ses at to prøver ligger på en værdi for kopi per qPCR reaktion længere til højre for LOQ, mens de øvrige prøver ligger under LOD og dermed anses for måske positive (gul og hvid kategori). Tærskelværdien (Cq) for 'cut-off' (orange linje) er her sat ved Cq=41. Flyttes den til en senere amplificerings-cyklus i qPCR-analysen, vil denne tærskelværdi rykke opad på plottet, og dermed inkludere flere af svage eDNA-signaler i øverste venstre hjørne.

3.2 Vurdering af prøver

De ukendte prøver evalueres i forhold til LOQ og LOD. Målet med evalueringen er at prøverne placeres i fire kategorier som fremgår af Figur A2.

Et eksempel på den anbefalede metode til evaluering af hver prøve fremgår af Tabel A1. Dette kommenteres nærmere i det følgende med henvisning til de grænser der fremgår af Figur A1.

Analyserede prøver som er lavere end LOD anses som udgangspunkt for negative (HVID). Hvis samme prøve reproduceres med et signal under LOD, så anses prøven for måske positiv (GUL). Hvis enkelte gentagelser af prøven overstiger LOD anses den tilsvarende for positiv men ikke kvantificérbar (ORANGE). Hvis prøven er reproducérbar for alle gentagelser i området mellem LOD og LOQ, så er prøven positiv men ikke kvantificérbar (ORANGE). Hvis kun en af gentagelserne er større end LOQ så betragtes prøven som positiv (RØD). Hvis alle tekniske gentagelser er større end LOQ, så betragtes eDNA signalet som positivt og kvantificerbart (SORT). I det anvendte eksempel illustrerer farveskalaen at der eftersøges invasive og ikke-hjemmehørende arter.

Tabel A1. Vejledning til tolkning af eDNA-signaler. Her vist et eksempel på detektion af ikke-hjemmehørende arter med 3 tekniske gentagelser i qPCR-opsætningen. Eksemplet er baseret på detektion af ikke-hjemmehørende arter. Positive resultater vises derfor med rød og sort.

eDNA resultat	Tolkning	Konklusion
No Ct	Ingen 'target eDNA' i vandprøven	Negativ
All below LOD	Muligvis svagt spor af eDNA fra 'target art'	Måske positiv
>1 above LOD, all below LOQ	Svagt spor af eDNA fra 'target art'	Positiv (ikke kvantificering)
1 Above LOQ	eDNA fra 'target art' sporet	Positiv (ikke kvantificering)
3 Above LOQ	Kraftigt eDNA fra 'target art'	Positiv (Kvantificering mulig)

<ul style="list-style-type: none"> • Sample >LOQ and reproducible (Rough quantification possible, DNA copy/L used as index to compare different samples analyzed for same target-species) • Sample >LOQ and not reproducible (no quantification) • LOD <Sample< LOQ and reproducible (no quantification) • LOD <Sample< LOQ and not reproducible • Sample <LOD and reproducible • Sample <LOD and not reproducible • No signal 	<ul style="list-style-type: none"> • Positive and quantification (many replicates needed) • Positive (no quantification) • Possible positive • Negative
--	---

Figur A2. Opsummeret evaluering af analyseresultater (generelt).

Det må dog understreges, at kvantitative vurderinger baseret på eDNA-målinger altid skal udføres med stor forsigtighed. Der er mange kendte og ukendte faktorer, som kan påvirke mængden af eDNA i en konkret prøve. Det er dog sandsynligt, at der er en hvis sammenhæng mellem biomassen/ antallet af den art som eftersøges, og koncentrationen af eDNA i vandet. Eventuelle kvantitative sammenligninger bør derfor fokuseres på relative sammenligninger af lokaliteter indbyrdes. De prøver som sammenlignes bør være samlet på samme måde og analyseret samtidig.

Referencer til bilag

- Agersnap, S, WB Larsen, SW Knudsen, D Strand, PF Thomsen, M Hesselsøe, PB Mortensen, T Vrålstad & PR Møller (2017): Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS ONE* 12, e0179261.
- Andersen, JH, M Brink, E Kallenbach, M Hesselsøe, SW Knudsen, JG Støttrup, PR Møller, W Eikrem, C Fagerli & E Oug (2017): Sampling protocol for monitoring of non-indigenous species in selected Danish harbours. NIVA Denmark Report, 59 pp.
- Andersen, JH, E Kallenbach, M Hesselsøe, SW Knudsen, PR Møller, D Bekkevold, BK Hansen & J Thaulow (2016): Steps toward nation-wide monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters under the Marine Strategy Framework Directive. NIVA Denmark Report. 123 pp.
- Andersen, JH, E Kallenbach, J Thaulow, M Hesselsøe, SW Knudsen, D Bekkevold, BK Hansen, LMW Jacobsen, PR Møller & CAa Olesen (2018): Development of species-specific eDNA-based test systems for monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters. NIVA Denmark Report. 77 pp.
- Deiner, K, JC Walser, E Mächler & F Altermatt (2015): Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biol Conserv* 183, 53–63.
- Djurhuus, A., J Port, CJ Closek, KM Yamahara, O Romero-Maraccini, KR Walz, DB Goldsmith, R Michisaki, M Breitbart, AB Boehm & FP Chavez (2017): Evaluation of filtration and DNA extraction methods for environmental DNA biodiversity assessments across multiple trophic levels. *Frontiers in Marine Science* 4, 314.
- Evans, NT, BP Olds, MA Renshaw, CR Turner, Y Li, CL Jerde, AR Mahon, ME Pfrender, GA Lamberti & DM Lodge (2016): Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 16, 29–41.
- Ficotela, GF, C Miaud, F Pompanon & P Taberlet (2008): Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4, 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>.
- Knudsen, SW, RB Ebert, PB Mortensen, F Kuntze, M Hesselsøe, J Hassingboe, PF Thomsen, EE Sigsgaard, E Egg & PR Møller (2019): Species-specific detection of six commercially important marine fishes in the Baltic Sea using environmental DNA. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 510, 31-45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.09.004>
- Knudsen, SW, M Hesselsøe, D Bekkevold, SKS Jensen, PR Møller & JH Andersen (2018): Tekniske anvisninger for eDNA-baseret overvågning af ikke-hjemmehørende marine arter. NIVA Danmark rapport. 32 pp.
- Majaneva M, OH Diserud, SHC Eagle, E Boström, M Hajibabaei & T Ekrem (2018): Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Sci Rep.* 8, 4682. doi: 10.1038/s41598-018-23052-8.
- Pont, D, M Rocle, A Valentini, R Civade, P Jean, A Maire, N Roset, M Schabuss, H Zornig & T Dejean (2018): Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports* 8, 10361. doi: 10.1038/s41598-018-28424-8.
- Port, JA, JL O'Donnell, OC Romero-Maraccini, PR Leary, SY Litvin, KJ Nickols, KM Yamahara & RP Kelly (2016): Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 2, 527–541.
- Sigsgaard, EE, H Carl, PR Møller & PF Thomsen (2015): Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biol. Conserv.* 183, 46–52.
- Sigsgaard, EE, IB Nielsen, H Carl, MA Krag, SW Knudsen, Y Xing, TH Holm-Hansen, PR Møller & PF Thomsen (2017): Seawater environmental DNA reflects seasonality of a coastal fish community. *Marine Biology* 164, 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 (5), 635-645. doi:10.1111/2041-210X.12683
- Taberlet, P, E Coissac, M Hajibabaei & LH Rieseberg (2012): Environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21, 1789–1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542>.
- Thomsen, PF, J Kielgast, LL Iversen, C Wiuf, M Rasmussen, MTP Gilbert, L Orlando & E Willerslev (2012a): Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21, 2565–2573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>.
- Thomsen, PF, J Kielgast, LL Iversen, PR Møller, M Rasmussen & E Willerslev (2012b): Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732>.
- Thomsen, PF., & E Willerslev (2015): Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183, 4–18.
- Thomsen, PF, PR Møller, EE Sigsgaard, SW Knudsen, OA Jørgensen & E Willerslev (2016): Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PLoS ONE* 11, e0165252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165252>.
- Turner, CR, KL Uy & RC Everhart (2015): Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biol. Conserv.* 183, 93–102.
- Wilcox, TM, KS McKelvey, MK Young, SF Jane, WH Lowe, AP Whiteley & MK Schwartz (2013): Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PLoS ONE* 8, e59520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059520>.
- Yamamoto, S, K Minami, K Fukaya, K Takahashi, H Sawada, H Murakami, S Tsuji, H Hashizume, S Kubonaga, T Horiuchi, M Hongo, J Nishida, Y Okugawa, A Fujiwara, M Fukuda, S Hidaka, KW Suzuki, M Miya, H Araki, H Yamanaka, A Maruyama, K Miyashita, R Masuda, T Minamoto & M Kondoh (2016): Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: a case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS ONE* 11, e0149786 (Erratum in: *PLoS One* 2016 11, e0153291).

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