

Kartlegging av laks og ørret i kystvassdrag i Agder ved studier av miljø-DNA.

Philip Thomassen Neset

VEILEDERE

Førsteamanuensis Audun Slettan,

Marte Sodeland & Tormod Haraldstad

Universitetet i Agder, 2021

Fakultet for teknologi og realfag

Institutt for naturvitenskapelige fag

Forord

Jeg ønsker å takke mine veiledere førsteamanuensis Audun Slettan, og forskere Marte Sodeland og Tormod Haraldstad for tett oppfølging gjennom laboratoriearbeid og feltarbeid, og for god veiledning gjennom hele skriveprosessen. Tildeling av midler fra Fylkesmannen i Agder har dekket kostnader knyttet til feltarbeid. Videre ønsker jeg å takke Universitetet i Agder for tilgang, og lån, av laboratoriefasiliteter og utstyr. Takk til Marc Anglès d'Auriac ved NIVA for lån, og opplæring, av utstyr for filtrering av vannprøver, samt hjelp underveis vannprøveekstrahering.

Sammendrag

Atlantisk laks (*Salmo salar*) og brunørret (*Salmo trutta*) gyter begge i ferskvann, og vassdragenes tilgjengelighet og gode vannkvalitet er kritisk for bestandene. Gjennom, og i etterkant av den industrielle revolusjon, ble store mengder svovel og nitrogen slippet ut og introdusert til akvatiske habitat. Dette bidro med reduserte pH-verdier og videre økte mengder giftig aluminium i vannet gjennom 1900-tallet. Det sure og giftige vannet påvirket laksebestandene sterkt, og flere av bestandene på Sørlandet ble utryddet. Ørreten, derimot, tolerer surt vann bedre enn laksen og har i større grad blitt værende i vassdragene. Bevisstheten rundt forurensende utslipp førte til strenge, industrielle restriksjoner i tillegg til studier på metodikk for forbedring av økologiske forutsetninger. Det ble i denne sammenheng funnet at tilføring av kalkstein økte pH-verdien i miljøet, og det ble igangsatt nasjonale kalkingsprosjekter på midten av 1990-tallet. Det har blitt målt en stadig bedret vannkvalitet, og økte andeler laks i de tradisjonelle lakseelvene.

Kunnskap om hvordan laksen utnytter kystvassdrag har foreløpig manglet, og det har blitt påstartet kartleggingsprosjekter for å etablere et bedre bilde av laksens bruk av mindre bekker som gjerne er forbundet med ørretbestander. Dette har blant annet blitt undersøkt ved elektrofiske, der elektriske pulser midlertidig bedøver fisken slik at den kan registreres. Det ble i 2019 undersøkt tilstedeværelse av laksefisk ved elektrofiske i kystvassdrag mellom Kristiansand og Mandal, og det ble da påvist laks i seks av de tolv undersøkte vassdragene. De siste årene har molekylære analyser av miljø-DNA (eDNA) blitt etablert innen blant annet studier på artsfordeling og bevaringsbiologi. eDNA inkluderer all DNA som finnes fritt i miljøet, og prøvetakning skjer ved DNA-ekstraksjon fra miljøprøver, som for eksempel vannprøver.

I dette arbeidet er det analysert eDNA fra totalt 20 kystvassdrag. Tolv av disse er vassdrag som ble undersøkt ved elektrofiske i 2019, og de resterende 8 er nye vassdrag hvor kvalitative og kvantitative data mangler. Det ble utført både qPCR (Real Time Polymerase Chain Reaction), og metabarcoding på DNA ekstrahert fra vannprøvene. qPCR-amplifikasjon skjedde ved artsspesifikke primere og -prober for laks og ørret, og PCR-amplifikasjon for metabarcoding ble gjort ved bruk av universelle primere for også å kunne se på andre fiskeslag. Ved qPCR ble det påvist ørret i samtlige vassdrag, og laks i tolv av disse. Seks av elvene som fikk påvist tilstedeværelse av laks var av de 12 inkluderte vassdragene som ble undersøkt ved elektrofiske i 2019. qPCR og elektrofiske påviste laks og ørret med en resultatlighet på henholdsvis 10/12- og 12/12 vassdrag. Grunnet utfordringer med konstruksjon av sekvenseringsbibliotek ble metabarcoding kun gjennomført for 14 av 20 vassdrag. Også metabarcodingen påviste ørret i alle prøver, samt laks i 11 av 14 undersøkte vassdrag. Det var en overensstemmelse mellom qPCR og metabarcoding ved 14/14 for ørret, og 10/14 for laks. Sekvenseringen påviste også tilstedeværelse av ni andre fiskearter i flere av vassdragene, deriblant ål, abbor og trepigget stingsild. Selv om eDNA for øyeblikket ikke kan erstatte tradisjonelle kartleggingsmetodikker, særlig for kvantitative undersøkelser, gir disse metodene mulighet for mer kostnads- og arbeidseffektiv kartlegging av akvatisk fauna. Metodene vil dermed kunne bidra til betydelig oppskalering av kartleggings- og overvåkingsaktivitet.

Abstract

Both Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Brown trout (*Salmo trutta*) spawn in freshwaters, and availability to water courses of good water quality is of great importance for the Salmonidae populations. The industrial revolution introduced release of considerable amounts of sulphur and nitrogen taken up by the environments, including aquatic habitats. Through the 20th century, the pH levels dramatically dropped while levels of toxic aluminium rose in the freshwaters. The acidic and toxic waters strongly affected the salmon populations, and several of the stocks of south Norwegian rivers were eliminated. The trout, however, have managed the decrease in water quality better and have remained in the water courses. The awareness surrounding the polluting releases lead to strict, industrial restrictions as well as researching on different methodologies for improving the ecological conditions. Through this research it was found that adding limestone to the waters increased the pH levels, and national liming projects were established in the mid-1990s. It has been noticed improved water quality, and increased salmon stocks in the traditionally viewed salmon rivers.

Knowledge on how salmon are exploiting the coastal water courses have been lacking, and mapping projects were initiated to establish better knowledge on the salmon's habitats and their use of these smaller creeks. Electric fishing, giving out electric pulses that temporarily stuns the fish present in the nearby water, is among the methodologies used to register the species, sex, sizes, and number of fishes. In 2019 a study mapping the fish presence in water courses between Kristiansand and Mandal by electric fishing detected salmon in six of twelve rivers surveyed. In recent years molecular analyses of environmental DNA (eDNA) have become an established part of studies on biodiversity and in conservation. eDNA include all DNA present in the environment, and sampling is done by extracting DNA from environmental samples, e.g., water samples.

In this study, eDNA collected from a total of 20 coastal water courses have been analysed. Twelve of which were included in the 2019 electric fishing survey, and an additional eight water courses where qualitative and quantitative data are lacking. DNA extracted from water samples from the twenty water courses have been analysed both through qPCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) and metabarcoding. Amplification by qPCR have been done using species specific primers and probes targeting salmon and trout, and PCR-amplification for metabarcoding was done using universal primers to be able to detect other species of fish. The qPCR amplification detected trout in all water courses, and salmon in twelve of them. Six of the rivers where salmon was detected were among the twelve water courses included in the 2019 electric fishing survey. qPCR and electric fishing detected salmon and trout with a similarity of results of 10/12 and 12/12, respectively. Because of challenges in making a sequencing library only fourteen of the twenty watercourses were analysed through metabarcoding. The metabarcoding detected trout in all samples, and salmon in eleven of the fourteen. There was a concurrence of results between qPCR and metabarcoding of 14/14 and 10/14 for trout and salmon, respectively. Sequencing also detected nine other species of fish in several of the water courses, including European eel, European perch, and three-spined stickleback. For the moment, analysis including eDNA cannot replace the traditional mapping methodologies, especially for quantitative surveys. Being a significantly more cost- and labour efficient method for mapping aquatic fauna, it however, contributes with the possibility of greatly upscaling the mapping- and monitoring activity.

Innhold

Forord	2
Sammendrag	3
Abstract	4
Introduksjon	7
Atlantisk laks, <i>Salmo salar</i> L. og brunørret, <i>Salmo trutta</i>	7
Laksen forsvinner	8
Sur nedbør	9
Kalking	10
Metoder for kartlegging biodiversitet/arter	11
Miljø-DNA	12
Molekylære analyser på miljøDNA	13
Konsentrasjonsmålinger	16
Vannprøve-takning	17
Tidligere kartlegging ved elektrofiske	18
Mål med studie	18
Lokalitetsbeskrivelse	19
Innsamling av prøvematerialer	21
Generelt, laboratorium	22
Ekstrahering, prøvemateriale fra Sterivex filter	22
DNA-ekstrahering	23
Ekstrahering av prøver som hadde lekkende filterkapsel	23
Måling av DNA-konsentrasjon	23
qPCR	24
Korrigerer av Ct-verdier	25
Analyse av eDNA ved metabarcoding	25
Sammenlånning av replikater	25
PCR	25
Gel elektroforese	26
PCR-produktrensjøring	26
Qubit	27
Sekvensering	27
Bioinformatikk	27
Test av reaksjonsmiks-oppskrift, temperaturprofil:	28
Resultater	29
qPCR	29

Ct-verdi, volumskorrigert etter referansebekk	31
DNA-konsentrasjon	33
Analyse av eDNA ved metabarcoding	34
Sekvensering, bioinformatikk	34
Kvalitetstesting	36
Gel elektroforese	38
Gel-elektroforese av alle prøver	38
Test av Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix	39
Diskusjon	40
Artsdeteksjon med qPCR	40
Artsdeteksjon med metabarcoding	40
Sammenlikning av qPCR og metabarcoding	41
Sammenlikning av eDNA metodikk og elektrofiske-resultater	42
Kvantifisering av tetthet gjennom eDNA	44
Arts sammensetning innad i et vassdrag	45
Ytterligere faktorer som kan ha påvirket artsdeteksjon ved eDNA-analyser	46
Volumkorrigering	46
Kvalitet av ekstrahert DNA	47
Antall PCR sykluser i qPCR	48
Sammenslåing av replikater	48
Testing av Phusion Hot Start 2 High Fidelity Master Max	48
Innsamling av vannprøver	48
Filtreringseffektivitet	49
DNA ekstraksjon	49
Konklusjon	51
Vedlegg	52
Referanser	53

Introduksjon

Atlantisk laks, *Salmo salar* L. og brunørret, *Salmo trutta*

Atlantisk laks kjennetegnes med en sterk, strømlinjeformet kropp som gjør at fisken kan bevege seg opp bratte, og kuperte elver. Laksen tilbakelegger lange vandringer i både fersk- og saltvann, og returnerer presist tilbake til elven de ble født (Jonsson & Jonsson, 2011). Laks og brunørret er utseendemessig relativt like, men lakseparren har bredere brystfinner. Dette gjør at laksen bedre kan benytte de strømssterke delene av elva (Jonsson & Jonsson, 2011). I forhold til laksen er ørreten bedre tilpasset et stillestående vannmiljø. Mens laksen som hovedregel er avhengig av migrasjon til havet for å bli kjønnsmoden, kan ørreten fullføre hele sin livssyklus i ferskvann (Jonsson & Jonsson, 2011). Fysiologiske forskjeller mellom artene gjør at laksen og ørreten har konkurransemessige fordeler i henholdsvis store elver og mindre side- og kystvassdrag. I havet skiller artene seg ved at ørreten hovedsakelig oppholder seg kystnært og i fjordområdene, mens laksen vandrer lenger ut, til både Nordsjøen og Norskehavet. Det er bare en andel av ørretindivider som vandrer ut i saltvann, og disse kalles gjerne sjøørett. I kystnære vassdrag vil man derfor finne både stasjonære- og sjøvandrende individer av ørret.

Laks og ørret gyter på rennende vann fra oktober-november. I vassdrag der begge arter er til stede ser man gjerne at ørreten gyter tidligere på høsten enn laksen. Begge arter foretrekker å gyte i elver og vassdrag med sterk strøm, men laksen gyter gjerne noe dypere og ved sterkere strøm enn ørreten (Jonsson & Jonsson, 2011). Hunnfisken graver eggene ned i bunnsstratet av elven, der hannfiskene sloss for å få være den som befrukter eggene med sin melke. Eggene ligger i bunnsstratet av elven og klekker på våren. Nyklekte larver blir noen uker på bunnen og får næringen gjennom plommesekken. Etter omtrent en måned kommer larvene ut av bunnsstratet og spiser små, virvelløse dyr. Å få skaffet nok mat etter plommesekken er tom er kritisk, og dødeligheten er høy i løpet av yngelens første sommer. Fisk i tidlig yngelstadium, parr, er til stede i både stille og rennende vann, og spiser hovedsakelig på epibentiske og frittdrivende insektslarver. Ørreten drar til innsjøer allerede fra første sommer, i større grad enn laksen (Jonsson & Jonsson, 2011). Det finnes også rene ferskvannspopulasjoner av laks i en rekke innsjøer i Europa, som Byglandsfjord i Norge, Vänern i Sverige og Saimaa i Finland. Denne laksen tilbringer hele livet i ferskvann (Jonsson & Jonsson, 2011). Disse europeiske ferskvannspopulasjonene av atlantisk laks oppstod antakelig for omtrent 10000 år siden, da sjøtemperaturer var svært lave og migrasjon til sjøen for vekst derfor var ufordelaktig (Berg, 1985). For anadrome populasjoner blir parr til smolt ved en kroppslengde på omtrent 10-20cm, og smolten vandrer vanligvis til sjøen på våren etter 1-5 år i elven (Forseth et al., 2017). Vandring skjer ved å svømme med strømmen ned vassdraget til estuarier og kystlinjen, og for laksen vandres det videre ut til åpen sjø. Laksen blir gjerne i Nord-Atlanteren i 1-4 år før de som kjønnsmodne starter vandringen tilbake til elven de ble født for å gyte. Anadrom ørret tilbringer hovedsakelig tid i estuarier og langs kysten, og innen 100 km elvemunningen. De vandrer ofte tilbake til elven de ble født i samme året som utvandring, enten for å gyte eller for å overvintre (Jonsson & Jonsson, 2009a). Gytingen er en energikrevende prosess og en del individer dør i etterkant. Individer som overlever, kan komme tilbake for å gyte etter et nytt sjøopphold. Repetert gyting er mer vanlig blant ørret enn laks. Hvor mye energireserver individene har igjen etter gyting kan påvirke om de gyter den påfølgende høsten, eller utsetter gytingen ett år (Haraldstad et al. 2018).

Både laks og ørret har stor økonomisk, kulturell og økologisk betydning (Atkinson et al., 2018). Laks og ørretfiske i elver gir store inntekter til lokale rettighetshavere og oppdrett av laks er blant Norges største eksportvarer. Ingen annen fiskegruppe har mottatt like omfattende kommersiell eller vitenskapelig oppmerksomhet som salmonidae (Davidson et al., 2010).

Laksen forsvinner

Den totale populasjonen av laks har sunket de siste tre tiår, både i antall populasjoner og ved reduksjon i reproduksjon (Chaput, 2012). I årene fra 1983-2016 har antallet villaks blitt redusert med mer enn 50% fra tiden før fiske av arten startet. Særlig dramatisk var perioden fra 1983-1990 da den totale bestanden gikk fra 7 til 5 millioner fisk. Videre har bestanden sunket med 33%, men siden 1990 har man sett en reduksjon i tap. I 2016 ble bestanden estimert til å bestå av 3.38 millioner fisk (NASCO, 2019). Anadrome populasjoner av laks er truet, og forsvinner i sydlige deler av deres naturlige leveområde. Det er flere menneskeskapte årsaker som bidrar til redusert bestander, blant annet forurensing, vannkraftverk og bygging av dammer, fjerning av vann og bunnsstrat i habitat, økte vanntemperaturer som følger av klimaendringer og genetisk endring ved rømt oppdrettslaks (Forseth et al., 2017; Klemetsen et al., 2003).

Fra 1983-2016 var det en stor reduksjon i utnyttelse av laksen ved fiske. Før 1960-tallet var det ingen internasjonal avtaler rundt fangstreguleringer, og hvert land hadde sine egne bestemmelser. I oktober 1983 opprettet Convention for the Conservation of Salmon in the North Atlantic Ocean, senere North Atlantic Salmon Conservation Organization (NASCO), et stort beskyttet område der fiskere ikke kunne målrette fangst mot laks i de fleste områder mer enn 12 nautiske mil fra kysten. Dette reduserte øyeblikkelig omfanget av kommersielt fiske på laksen, som var størst i 1973 ved 3.5 millioner laks (NASCO, 2019). Fangsten i Norge var størst på 1970 og -80-tallet grunnet drivgarnfiskeriene (Jensen et al., 1999). Selv med grundige restriksjoner observeres det likevel liten økning i populasjonene (Klemetsen et al., 2003).

Den raske veksten av fiskeoppdrett siden 1980-tallet har introdusert nye problemer for viltpopulasjonene av laks (Hansen & Youngson, 2010). Oppdrettslaks er genetisk forskjellig fra villaks. Dette fører til at rømt oppdrettslaks introduserer ukjente alleler til viltpopulasjoner og videre mulige konsekvenser for lokalspesifikke tilpasninger (Jonsson & Jonsson, 2011). Oppdrettslaksen introduserer endring i vekstrate, stresstoleranse og oppførsel, og det har i tillegg blitt dokumentert lavere genetisk variasjon for oppdrettslaksen enn hos villaks (Einum & Fleming, 1997; Norris et al., 1999; Solberg et al., 2013; Thodesen et al., 1999). Genetisk innblanding fra oppdrettslaks på villaksen kan videre føre til reduksjon i smoltproduksjonen, og til en reduksjon i voksne individer og sjøoverlevelse (Fleming et al., 2000; Forseth et al., 2017; McGinnity et al., 2009). Oppdrett av store mengder laks har også ført til en unormal høy andel lakselus i sjøen, ettersom merder utgjør stor vertstetthet. Mye lakselus på utvandrende smolt kan føre til dødelighet (Taranger et al., 2012). På Sørlandskysten er det lite lakseoppdrett og trusselen tenkes derfor mindre enn ved områder med større oppdrettstetthet.

Dammer, særlig i sammenheng med vannkraftproduksjon, har ført til reduksjon av laks og ørretbestander (Ugedal et al., 2008). For å hindre dette er det bygget fisketrapper og -passasjer ved mange slike dammer. (Jonsson & Jonsson, 2011). Endringer i habitat grunnet andre typer menneskeskapte strukturer kan redusere habitatkvaliteten for fisken, men selv om det er

bygget flomsikrende strukturer i er mer enn 200 norske elver regnes konsekvensene som små i forhold til andre faktorer. En nylig økning i flomepisoder på Vestlandet har ført til utbygging av kanaler og andre strukturer for beskyttelse mot fremtidig flom, og habitatsendring kan derfor tenkes å påvirke laksen i større grad i fremtiden (Forseth et al., 2017).

Det har nylig blitt konkludert at laksepopulasjonene har blitt, og vil bli, påvirket av klimaendringer, både i ferskvann under vandring til sjøen og i marine miljø (Friedland et al., 2003; Jonsson & Jonsson, 2009b; Reist et al., 2006). Man ser indikasjoner for en negativ klimapåvirkelse for laks i sjøen, antakelig drevet av betydelig nedgang i biomasse for blant annet raudåte (*Calanus finmarchicus*) i Nord-Atlanteren (Jonsson & Jonsson, 2011). Klimaendringer har også ført til økte vanntemperaturer i ferskvannene, særlig i sydlige deler av laksens leveområder (Jonsson & Jonsson, 2004). Vanntemperatur er blant de mest begrensende faktorene for utbredelsen av laks og brunørret (Elliott, 1994). Temperaturgrensene for vekst ligger ved ca. 5-25°C (Forseth et al., 2009; Jonsson et al., 2001) og øvre overlevelsesgrense ligger mellom 25°C og 30°C, henholdsvis noe høyere for laks enn brunørret (Jonsson & Jonsson, 2011). Utvikling av embryo skjer ved en smalere variasjon på ca. 0-15°C (Crisp, 1981). Endringer i klima vil sannsynlig ramme særlig de sydlige områder av laksens utbredelse der grensene for fysiologisk toleranse raskere kan overgå og sommertørke kan bli vanligere (Schneider et al., 2013). Oksygeninnholdet i vannet er en annen faktor for overlevelsen til laksefisk, og silt og lav vannhastighet reduserer overlevelsen for embryo. Fravær av gunstige gyteområder reduserer, og i verste fall forhindrer, overlevelse absolutt (Elliott & Hurley, 1998; Soulsby et al., 2001; Wood & Budy, 2009). Eutrofikasjon truer sterkt populasjonene, og problemet er særlig dramatisk i sydlige deler av deres endemiske område ettersom oksygenkonsentrasjoner allerede er lave grunnet høye vanntemperaturer (Jonsson & Jonsson, 2011).

Både naturlig og menneskeskapte trusler påvirker laks og ørretbestandene over hele utbredelsesområdet. (Jonsson & Jonsson, 2011). På grunnlag av miljørelaterte problemer, og antropologisk utløste dødsrater, er en oppdatert plan for håndtering og bevaring av atlantisk laks og brunørret sterkt etterspurt (Marttunen & Vehanen, 2004). Det har blitt introdusert nye regler og reguleringer i flere land de siste årene, men mange populasjoner er truet (Jonsson & Jonsson, 2011). Både laks og brunørret har tradisjonelt symbolisert rent og kaldt vann (Jonsson & Jonsson, 2011).

Sur nedbør

God vannkvalitet er kritisk for overlevelsen av laksefisk, og utslipp av svovel og nitrogen på 1900-tallet førte til forsuring av overflatevann og redusert vannkvalitet (Clair et al., 2004; McCormick et al., 2009). Surt vann har vært anerkjent som et problem for ferskvannsfisk i visse områder av Norge siden 1920-tallet, og sammenhengen mellom sure vann og nedbørs pH ble først foreslått på 1950-tallet (Staurnes et al., 1996). Avsetninger fra luftforurensinger, som sulfur, salpetersyre og sur nedbør, i områder der berggrunnen har liten kapasitet for nøytralisering fører til redusert pH og utslipp av potensielt giftig, labil aluminium til vannet (Driscoll et al., 1980). Jo mer forsuret jorden er, jo mer aluminium frigjøres, og jo lavere pH-verdien er i vannet, jo mer sannsynlig er det at aluminiumen er i sin giftige form (Clair & Hindar, 2005). Aluminium akkumulerer på fiskens gjeller og påvirker blodkjemien og fysiologiske prosesser hos fisken (Kroglund & Finstad, 2003). Aluminium påvirker også

oksygentransport over gjellene hos særlig yngel og smolt, og utgjør en stor faktor for tidlig død for laksen, og ikke-dødelige påvirkninger i ferskvann kan vise seg dødelige når fisken vandrer til sjøen (Forseth et al., 2017; Kroglund et al., 2007). Laks er mer sårbar for surt vann enn ørret, og for å vedlikeholde levedyktige populasjoner bør pH ligge mellom 6 og 9. Det har blitt observert negativ påvirkning på laks allerede ved pH på 6.3, og ved økt aluminiumkonsentrasjon ser man desto større effekt, spesielt på smoltstadiet av laks (Herrmann et al., 1993; Jonsson & Jonsson, 2011; Rosseland & Skogheim, 1984). En pH-verdi under omtrent 5.5 reduserer klekkesuksess for ørretrogn, og det finnes få populasjoner i innsjøer der pH-verdi er lavere enn 5.0 (Hesthagen & Jonsson, 1998). Smolten er laksens mest sensitive livsstadium, og laksens sensitivitet til aluminium under smoltifisering kan være kritisk for overlevelsen (Rosseland et al., 1986; Skogheim & Rosseland, 1986).

Mange fiskebestander har blitt sterkt redusert, og til og med gått tapt, som følger av forsureningen, både i Nord-Amerika og Europa. I Norge sank produksjonen av laks med omtrent 25% i løpet av 1900-tallet grunnet forsurening av vannet i sammenheng med aluminium, og vannkvaliteten ble særlig forverret på Sørlandet (Hesthagen et al., 2008; Sandøy & Langåker, 2001; Miljødirektoratet, 2020). Forsuringen har påvirket elver i et stort område av Sør-Norge og effektene har svekket, og utryddet, et stort antall lakse- og ørretbestander (Hesthagen & Hansen, 1991; Jensen & Snekvik, 1972). Dødelighet og populasjonsnedgang var sterkere ved det økte utslippet av sulfur fra 1960-1980, og i 1990 var laksepopulasjonene tapt i 25 elver og sterkt redusert i minst åtte (Hesthagen & Hansen, 1991). Siden 1990 har en betydelig reduksjon i forsurende utslipp ført til økt pH og redusert aluminiumkonsentrasjoner i Sør-Norge (Skjelkvåle et al., 2003). Et nasjonalt kalkeprogram ble påstartet i 1983, og 22 lakseelver er kalket av kontinuerlig tilføring av kalk (Clair & Hindar, 2005). Blant annet har det blitt kalket i Sørlandselver på midten av 1990-tallet, og det har i etterkant blitt observert en betydelig økning i både produksjon og fangst av laks.

Det har blitt gjort flere studier på laksefisks påvirkning av surt vann, deriblant fant Staurnes et al. (1996) at laksesmolt i surt vann hadde ulik overlevelsesrate enn laksesmolt i nærliggende kalket elv i Sør-Norge. Blant smolten utsluppet oppstrøms i sur elv var det knapt fisk som overlevde lenge nok til å bli gjenfanget som voksne. Smolt oppholdt i sur elv led dramatiske osmoregulatoriske feil, og utrykte høy dødelighet allerede innen få timer. Skogheim & Rosseland (1986) observerte i områder beriket med labilt aluminium at høyere aluminiumkonsentrasjoner førte til at 50% dødelighet ble oppnådd på kortere tid. Rosseland & Skogheim (1984) konkluderte at elver med giftig pH- og aluminiumsnivå vellykket kan nøytraliseres ved kalking.

Kalking

På grunn av internasjonale avtaler har utslippene av svovel, nitrogenforbindelsene i nedbør, avtatt med 75-91% fra 1980-2011, men dette er ikke tilstrekkelig (Miljødirektoratet, 2012). For å motvirke skadevirkninger av sur nedbør kalkes vassdrag i stor, rutinemessig, skala i Norge. Målet er å tilnærme seg den naturlige tilstanden for forsureningsområdene og videre påvirke det biologiske mangfoldet gjennom å bedre vannkjemien (Direktoratet for naturforvaltning, 2003). Kalkingen av vassdrag har vært en av Norges mest vellykkede miljøtiltak. Gjennom vassdragskalking har man begrenset de negative effektene av sur nedbør, og reetablert mange av artene som forsvant under den verste forsureningsperioden. I mange av vassdragene i Sør-Norge er grensen for sur nedbør stadig overskredet, og støtten fra myndigheter til kalking vil derfor fortsette i mange tiår (Miljødirektoratet, 2012).

Kalk brukes for å øke pH, syrenøytraliserende kapasitet og å redusere aluminiumkonsentrasjoner i vann (Clair & Hindar, 2005). Metoder for kalking deles gjerne inn i tre hovedgrupper; tilføring av buffermateriale direkte til rennende vann, tilføring av buffermateriale til vassdragssediment og å kalke vannoverflaten av innsjøer (Clair & Hindar, 2005). Tilføring av fine kalkpartikler direkte i vassdrag bidrar med øyeblikkelig syrenøytralisering og derfor også øyeblikkelig forbedring i pH-verdi og syrenøytraliserende kapasitet. Konseptet for metoden er at den sure elven blir titrert av en doserer som slipper ut en kjent mengde finkornet kalkpulver som er blandet med vann. Mengden kalk som tilføres bestemmes av pH-verdien som måles opp- og nedstrøms fra dosereren (Clair & Hindar, 2005). Fordeler med slik direkte tilføring av kalk til vassdrag inkluderer muligheten for å målrette vassdrag som er viktige for fiskevandring (Bjerknes & Tjomsland, 2001). Ulemper inkluderer at doseringsutstyr er kostbart, og gjerne trenger menneskelig oppsyn (Clair & Hindar, 2005).

En måte å forbedre vannkjemien ved mindre lokaliteter oppstrøms er å tilføre buffermaterialer til sedimentene, ved at kalkpartikler av grusstørrelse plasseres som barrierer i vannet og fungerer som vannfiltre (Clair & Hindar, 2005). Kalking av vannoverflaten av innsjøer er en annen metode for motvirkning av forsuring som er mye brukt i Norge, og består av å tilføre finkornet kalk direkte på overflaten av innsjøer (Clair & Hindar, 2005; Sandøy & Romundstad, 1995). Fordeler inkluderer lave kostnader og enkel metodikk, og kalktilføringen bidrar vanligvis med en øyeblikkelig forbedring av pH-verdi og syrenøytraliserende kapasitet, samt reduksjon i aluminiumkonsentrasjon (Clair & Hindar, 2005). De små kystvassdragene kalkes i liten grad, men redusert utslipp av svovel og nitrogen har ført til en gradvis bedring i vannkvalitet. Reduserte utslipp og mindre sur nedbør bidrar til en stadig bedre vannkjemi i de små kystvassdragene, og ettersom mange av dem har store deler av nedbørsfeltet under marin grense antas det en betydelig bedre vannkjemi enn i større elver. Perioder med redusert kvalitet i vannkjemi kan likevel sammenfalle med kritiske livsstadier for laksen. Dette kan videre føre til at fisken ikke klarer å gjennomgå livssyklus og etablere stedegne bestander i de ukalkede vassdragene. Det er viktig at det bygges kunnskap om de mindre kystvassdragene, som antas å ha vært svært produktive før perioden med forsuring (Personlig kommunikasjon, Tormod Haraldstad).

Metoder for kartlegging biodiversitet/arter

Fiske, kamera- og videofeller og direkte visuelle observasjoner har tradisjonelt vært metoder for kartlegging av biodiversitet (Masuda et al., 2010; Samejima et al., 2012). Overvåking av laksebestander i elver og vassdrag har tradisjonelt inkludert elektrofiske, utplasserte fiske-tellere eller -feller, og stangfiskedata fra sportsfiskere (Atkinson et al., 2018). Elektrofiske er av de mest brukte metoder for kartlegging av laksefisk. Dette er hovedsakelig fordi metodikken er relativt kosteffektiv og enkelt utførbar i varierte naturforhold. Metoden tenkes også å påvirke fiskens helse i liten grad. Konseptet for elektrofiske er bruk av elektrisitet for å midlertidig bedøve fisken i et område, slik at fisken som er til stede, eksempelvis kan telles, måles eller merkes (Temple & Pearsons 2007). Felles for tradisjonelle metoder er at de kan være økonomisk tappende, arbeidskraftskrevende og mulig skadelig for fisken (Ushio et al., 2018a; Snyder, 2003). Atkinson et al. (2018) argumenterer at det tydelig trengs en effektiv og ikke-inntrengende metodikk for overvåking av fiskearter og at bruk av eDNA-analyser kan dekke dette behovet, særlig mot ledelses- og bevaringsformål (Atkinson et al., 2018).

Miljø-DNA

Miljø-DNA (eDNA) inkluderer all DNA som finnes fritt i miljøet, og prøvetakning skjer ved DNA-ekstraksjon fra miljøprøver, som for eksempel vann og jord, uten å ta prøver direkte fra mållart (Ushio et al., 2018b; Taberlet et al., 2012b; Thomsen & Willerslev, 2015).

Makroorganismer som lever i et miljø vil kontinuerlig frigi DNA til omgivelsene via utskilte celler eller skadet vev i urin, avføring, hår- og hudceller, i sammenheng med gyting, og fra døde individer som frigir genetisk materiale til miljøet (Barnes & Turner, 2015; Kelly et al., 2014; Thomsen & Willerslev, 2015; Poinar et al., 1998; Bunce et al., 2005; Lydolph et al., 2005; Valiere & Taberlet, 2000; Thomsen & Willerslev, 2015).

eDNA inneholder artsdefinerende informasjon om organismen som har produsert det, og kunnskapen om at DNA fra makrobiota kan ekstraheres fra miljøprøver ble først oppdaget ved studie på ekskrementer (Höss et al., 1992; Ushio et al., 2018b). Det har deretter blitt vist som en effektiv måte å bevise tilstedeværelse av jordbaserte arter, og senere arter i ferskvanns- og marinmiljø. For studier mot tilstedeværelse av makroorganismer er eDNA særlig brukt i akvatiske miljø (Miya et al., 2015; Taberlet et al., 2012a; Yamamoto et al., 2017; Willerslev et al., 2003; Clusa et al., 2017; Gargan et al., 2017; Gustavson et al., 2015).

DNA-analyser som inkluderer ikke-inntrengende prøvetakning er i dag svært utbredt innen naturvitenskapelige felt som molekylærøkologi, populasjonsgenetikk og bevaringsbiologi (Matejusová et al., 2008). De siste 15 årene er det oppdaget et stort potensial for bruk av eDNA ved identifisering av planter og dyr fra vannprøver av små volum (Martellini et al., 2005; Rees et al., 2014; Thomsen et al., 2012). Analyser av vannbasert eDNA er en stadig mer populær tilnærming innen studier på artsfordeling, tidlig oppdagelse av invaderende arter, og overvåkning av sjeldne og truede arter innen bevaring (McKee et al., 2015a; Zhan et al., 2013; Jane et al., 2015; Valentini et al., 2016; Simmons et al., 2016; Smart et al., 2015). Overvåkning ved bruk av vannbasert eDNA og molekylære analyser gjør det mulig med oppskalering innen artsfordelingsstudie, ettersom det kreves betydelig lavere tid- og ressursbruk enn for tradisjonelle metoder (Davy et al., 2015; Dejean et al., 2012). Ved overvåkningsstudie med eDNA og molekylære analyser kan man også påvise mållarter av alle livsstadier, inkludert egg-, larve- og yngelstadie (Shu et al., 2020). Analyser av eDNA i akvatiske økosystem har blitt brukt i en rekke studier for å etablere et bilde av fiskearters fordeling i dammer, elver og sjøvann (Jerde et al., 2011; Minamoto et al., 2011; Sigsgaard et al., 2015; Simmons et al., 2016; Takahara et al., 2012).

Thomsen et al., (2012) fant at biodiversitet for sjeldne og truede ferskvannsarter kan gjenkjennes og kvantifiseres ved DNA-analyse fra små vannprøver tatt i innsjøer, dammer og vassdrag. De fant også at DNA raskt brytes ned, og at molekylære analyser av eDNA-prøver hentet to uker etter at arten ble fjernet ikke kunne gjenkjenne arten. Atkinson et al. (2018) diskuterer sine resultater som argument for videre bruk av eDNA og molekylære analyser for overvåking av elve-hindres påvirkning på laks, så vel som rømningslaks fra oppdrettsanlegg. Det tenkes også at utstyr brukt for vannprøvetakning i større grad holdes sterilt for å unngå DNA-kontaminering, og at det derfor inkluderes lavere risiko for tilføring av arter mellom lokaliteter. (Herder et al., 2014).

Molekylære analyser på miljøDNA

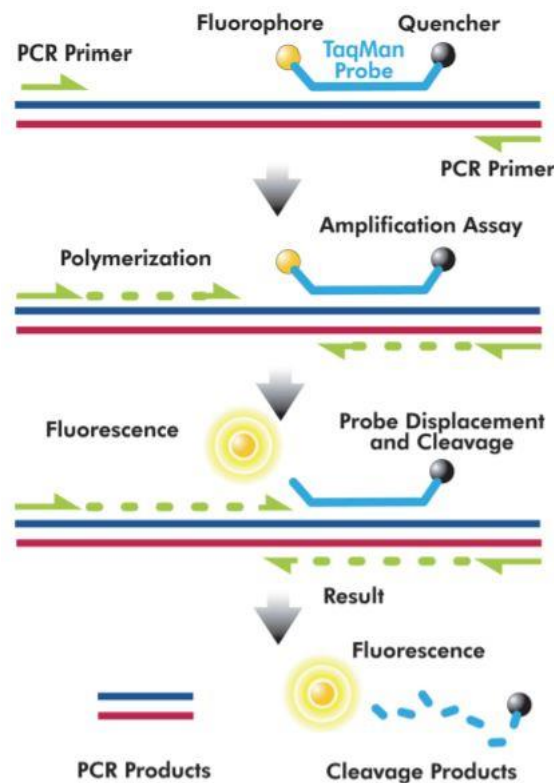
Molekylærbiologi er i stadig utvikling og har vært en av de viktigste feltene i naturvitenskap på 1900-tallet. PCR ble utviklet av Kary Mullis og kolleger på midten av 1980-tallet, og han har fått Nobels kjemipris i 1993 (Saiki et al., 1985). PCR kan amplifisere en hvilken som helst nukleinsyresekvens til stede i en kompleks prøve til et stort antall identiske kopier for videre analyse (Kubista et al., 2006). Amplifisering kan gjøres både artsspesifikk eller mot en fokalgruppe med henholdsvis artsspesifikk- eller universalprimere (Thomsen & Willerslev, 2015). eDNA-prøver er typisk analysert ved enten qPCR-amplifisering eller sekvensering.

Tradisjonell PCR-analyse gjøres på et enkelt- eller dobbeltrådet DNA-templat, og tillater syntese av spesifikke DNA-fragmenter ved å bruke et DNA-polymeraseenzym som deltar i replikasjonen av genetisk materiale (Valones et al., 2009). PCR involverer to oligonukleotid-primere som binder til templatsekvensen, de fire nukleotidtrifosfatene (dNTP), en varmestabil polymerase og magnesiumsioner. Reaksjonen skjer gjennom en temperatursyklus, der høy temperatur separerer de to DNA-trådene, før temperatur senkes slik at primere kan binde til templatet. Til slutt går temperaturen til 72°C, der Taq polymerasen forlenger primerne ved å tilsette dNTP (Kubista et al., 2006). Polymerase syntetiserer en komplementær sekvens av DNA ved at primere festes til en av DNA-trådene ved et spesifikt punkt bestemt før analyse, og bare en spesifikk region blir amplifisert (Valones et al., 2009). Temperaturen der primerne bindes til templatets enkelttråder avhenger av primerne, og bør være noen få grader under primernes smeltepunkt. På den måten kan de danne stabile komplekser med målsekvenser uten å binde til andre sekvenser (Kubista et al., 2006; Mullis, 1990). Holland et al., (1991) fant at forlengelse kan skje på temperaturer så lavt som 60°C, men høyere temperatur kan hindre dannelse av sekundærstrukturer i templat som kan blokkere forlengelsen av målsekvens. Komplementære primere kan føre til uønsket binding dem imellom, såkalt primer dimer (Kubista et al., 2006).

Real Time PCR (qPCR) har utviklet seg fra den tradisjonelle PCR-amplifiseringen, og har tatt over en sentral rolle innen klinisk diagnostikk og forskningslaboratorier ettersom teknologien medfører kvantitative resultater (Valones et al., 2009). qPCR tillater presis kvantifisering av nukleinsyrer, og bidrar med en sensitiv metodikk for kvantifisering av individuelle arter (Valones et al., 2009). Ellers gir qPCR bedre sensitivitet, amplifisering, presisjon og resultatpresentasjon, raskere analyse, lavere kontamineringsrisiko enn tradisjonell PCR (Kubista et al., 2006; Morillo et al., 2003). qPCR krever en PCR-maskin med et optisk system for registrering av fluoresens, og en PC med programvare som kan lagre analysedata samt utføre reaksjonsanalyse (Valones et al., 2009).

qPCR inkluderer en fluorescerende probe som binder til templatet og signaliserer positivt produkt, se Figur 1. Disse probene signaliserer fluoresens på et nivå som reflekterer mengden produkt dannet ved amplifisering. I tidligere stadier av amplifisering er fluoresenssignalet svakt og registreres ikke av maskin- eller programvare, men ved amplifisert produkt gjennom sykluser følger en tilsvarende eksponentiell økning i fluoresens. Utsendingen av fluorescens genererer et signal som øker proporsjonelt med økningen av PCR-produkt. Fluorescensverdier blir registrert ved hver PCR-syklus og representerer mengden amplifisert produkt (Valones et al., 2009). Eksempler på slike fluorescerende komponenter er SYBR Green og Taqman (Kubista et al., 2006). TaqmanMGB-prober (Applied Biosystems) består av oligonukleotider fra 14-15 basepar som holder en fluorescerende farge i 5'-enden i tillegg til en ikke-fluorescerende quencher og MGB i 3'-enden. Når disse probene binder til mål-sekvens vil

quencher løsne og den fluorescerende fargen vil aktiveres. MGB bidrar også med økt bindestabilitet for amplifikasjonsproben (Kutyavin et al., 2000). Til slutt går reaksjon tom for én eller flere kritiske komponenter for videre økning, primere, probe eller dNTP, og økningen i fluoresens flater ut (Kubista et al., 2001). Prøvers kurve kan skilles ved deres vekstfase av qPCR-reaksjon, som reflekterer forskjellen i hvor mye målsekvens det var i templatet før analyse startet. Forskjellen kvantifiseres ved å se på antallet amplifikasjonssykluser som krevdes før gjeldende prøves kurve nådde en spesifikk nivå-terskel for fluorescerende signal, kalt Ct-verdi (Kubista et al., 2006).



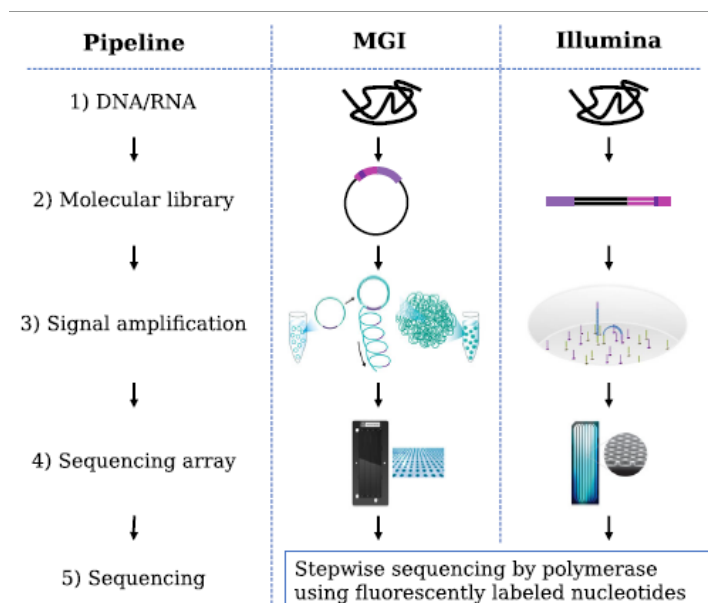
Figur 1: TaqMan-probe inkluderer fluorofofor og en quencher. Når primer er festet på templat og polymerasen ved amplifisering treffer TaqMan-proben løsner fluorofoforen og fluorescerende lys utgis (Agilent Technologies, Introduction to Quantitative PCR)

Ved DNA barcoding anvendes standardiserte artsspesifikke regioner, såkalte DNA barcodes, for å danne store bibliotek av DNA for videre identifikasjon av ukjente prøver. Eksempelvis kan cytochrome *c* oksidase underenhet 1 (CO1) gen-region skille mellom nært beslektede arter fra dyreriket (Hebert et al., 2003; Meusnier et al., 2008). Et stort antall genmarkører har blitt brukt i biodiversitetsanalyser ved ulik spesifisitet (Shokralla et al., 2012).

DNA-sekvensering ble først introdusert av Sanger et al., (1977), og kunne hente ut opptil 1kb sekvensdata fra én enkelt prøve á gangen. Utvikling av den tradisjonelle Sanger-sekvenseringen har ført til biosystematiske prosjekter med stor skala og variasjon bruksområder (Shokralla et al., 2012). I dag kan den mest utviklede Sanger-sekvenseringen hente ut opptil 1kb fra 96 ulike prøver i samme analyse, og denne tradisjonelle sekvensering har bidratt med opprettelse av store DNA-refereringsbibliotek (Shokralla et al., 2012). Sanger-sekvensering strekker likevel ikke til i studie på miljøprøver som gjerne inkluderer DNA fra tusentalls individer (Hajibabaei et al., 2011). Mens tradisjonell barcoding inkluderer DNA-identifisering av enkelte arter i hvert system, er metabarcoding en PCR-basert

tilnærming for DNA-identifisering av flere arter samtidig (Riaz et al., 2011; Taberlet et al., 2012b). Ved metabarcoding er det derfor viktig å velge en barcodemarkør som er så universal som mulig, i tillegg til at den inneholder nok informasjon til å skille mellom nært slektede arter (Riaz et al., 2011). DNA-innholdsrike miljøprøver krever at man kan lese et flertall templatler parallelt, og her tar high-throughput sekvensering (HTS) over for tradisjonell Sanger-sekvensering (Shokralla et al., 2012). Siden 2005 har ulike plattformer for HTS blitt introdusert til det kommersielle markedet, og gjort det mulig å hente DNA-sekvenser direkte fra miljøprøver (Sogin et al., 2006). Det kan ved HTS sekvenseres fra flere hundre tusen og opptil titalls millioner sekvenser parallelt innad analyse, og data fra slik innhenting har blitt brukt til blant annet sammenligning av mikrobiota hos friske og døde individer og for å studere eldgammelt DNA (Andersson et al., 2008; Boessenkool et al., 2012; Haile et al., 2009; Zhang et al., 2009). Ved å sammenligne sekvensresultater etter med referansebibliotek over organismers kjente sekvenser kan det identifiseres arter til stede i miljøprøver (Shokralla et al., 2012).

DNBSeq™ er en sekvenseringsplattform nylig lansert av MGI (MGI Tech Co. Ltd.). Teknologien bruker DNA nanoballer (DNB) og probeanker-syntese (cPAS) (Fehlmann et al., 2016). DNBSeq™ gir korte sekvenser av høy kvalitet, tilsvarende data som leveres av Illumina teknologien (Korostin et al 2020). For sekvensering med DNBSeq™ blir DNA-molekyler først fragmentert, og adaptere blir ligert til fragmentene. Deretter dannes det bibliotek som består av enkeltrådet DNA-sirkler med en DNBSeq™-adapter på midten, se Figur 2. DNA-sekvensene blir så kopiert ved rolling circle replication for å oppnå et amplifisert signal ved sekvenseringen. Rolling circle replication er en lineær amplifisering der hver kopi dannes fra det originale fragmentet, som reflekteres i fravær av amplifikasjonsfeil og molekylær veksling av prøvenes barcoder (Li et al., 2019). Teknologien for DNBSeq™ bidrar også med redusert dekningsbias, som representerer bedre dekning for GC-sterke regioner (Patterson et al., 2019). DNBSeq™-instrumenter bruker patterned flow cells for å kunne oppnå høyere nanoball-tetthet, samt sekvensering ved polymerase på enkeltrådet DNA (ssDNA) med fluorescensmerket nukleotider.



Figur2: Sammenligning av DNBSeq og tradisjonell sekvensering ved Illumina (Patterson et al., 2019).

Forskere har nylig begynt å analysere eDNA ved HTS og universelle primersett (Kelly et al., 2014; Miya et al., 2015; Simmons et al., 2016; Taberlet et al., 2012a; Ushio et al., 2017; Ushio et al., 2018b; Yamamoto et al., 2017). HTS har særlig åpnet muligheter for å gjøre gjennomgående biodiversitetsundersøkelser billigere, og ved lavere arbeidsinnsats (Shokralla et al., 2012). HTS har blitt brukt for å artsdefinere hele fauna, inkludert amfibier og fisk, ved eDNA-prøver tatt i vannet (Thomsen et al., 2012). Det ble også påvist fuglearter som levde i området rundt vann det ble tatt prøver fra, som argumenterer for at arter ikke trenger å finnes i overflod i miljø for å kunne gjenkjennes (Thomsen et al., 2012). DNA-sekvensering har betydelig bedret mulighetene for bruk eDNA, og det forventes stadig utvikling av teknologi i fremtiden (Thomsen & Willerslev, 2015). Det er ingen tvil om at nye sekvenseringsmetoder betydelig vil endre eDNA-studier og at sekvenseringsbaserte eDNA-studier vil bli sentrale verktøy for økologer (Shokralla et al., 2012; Baird & Hajibabaei, 2012; Taberlet et al., 2012a; Valentini et al., 2009). Miya et al. (2015) påviste, ved en eDNA tilnærming ved metabarcoding og fiske-universelle primere (MiFish-primere), mer enn 230 fiskearter fra sjøvann i ett enkelt studie. Som følger har eDNA tilnærming for metabarcoding blitt en kostnads- og arbeidseffektiv metodikk for akvatisk biodiversitetsestimering (Ushio et al., 2018a).

Genetiske analyser av miljøprøver har fått en sentral plass i forskning på evolusjonær historie, og i funksjonell og økologisk biodiversitet (Shokralla et al., 2012). Det har altså dannet seg to ulike tilnærminger for artsgjenkjenning ved bruk av eDNA-prøver: gjenkjenning av en enkel, spesifikk art ved qPCR (barcoding), og gjenkjenning av flere arter samtidig ved neste-generasjons sekvensering av PCR-produkt av eDNA-prøver eller prøver fra komplekse samfunn (metabarcoding) (Thomsen & Willerslev, 2015). (q)PCR-analyser er fordelaktige i studier der man søker etter én, eller noe få, kjent(e) arter, og det designes da artsspesifikke primere og prober (Dejean et al., 2012; Takahara et al., 2013; Thomsen et al., 2012). Tilnærmingen er svært sensitiv og spesifikk, men er begrenset ved at man søker etter enkelte arter per primersett. Det blir derfor kostbart og tidskrevende ved mer mangfoldig studie, og det finnes problemer ved kvantifisering av biomasse og individer (Thomsen & Willerslev, 2015). Cycle threshold (Ct) cut-off verdier og klare retningslinjer på hvor mange positive replikater det trengs for å beskrive teststed positivt er eksempler på dette (Bustin et al., 2009; Ellison et al., 2006).

Det er usikkert i hvilken grad kartlegging ved eDNA direkte kan erstatte felt-observasjoner av erfarne økologer eller takson-spesialister, ettersom det kan hentes kunnskap utover kvantitative og kvalitative registreringer. Molekylær metodikk kan likevel være raskere og mer kostnadseffektiv, og det kan hentes inn standardiserte data uten bruk av personell med spesialisert taksonomisk kompetanse (Thomsen et al., 2012).

Konsentrasjonsmålinger

Korrekt kvantifisering av små mengder DNA er kritisk innen molekylærbiologi, og eksempler på verktøy for måling av DNA-prøvers konsentrasjon og renhet inkluderer UV-spektrofotometri og fluorescens-spektrofotometri. UV-spektrofotometre måler maksimal absorbans av nukleinsyre ved 260nm, og skiller derfor mellom dobbeltrådet- og enkeltrådet DNA, RNA og nukleotider (Nakayama et al., 2016). Fluorens-spektrofotometre måler ved en fluoroserende farge bundet til, særlig dobbeltrådet, DNA (Nakayama et al., 2016), og kan estimere mengden intakt dobbeltrådet DNA, og den kvantitative verdien synker med nivået av fragmentert og denaturert DNA (Georgiou & Papapostolou, 2006; Sedlackova et al., 2013;

Shokere et al., 2009). Ved utvikling av teknologier, som HTS, har det blitt desto viktigere å kunne evaluere DNA kvalitet og -kvantitet, og det har blitt utviklet flere kvantifikasjonsmetoder for estimering av DNA-konsentrasjoner (Nakayama et al., 2016).

Vannprøve-takning

eDNA er et felt under stadig utvikling, og en endelig enighet om hvordan metodikk for innsamling, lagring og ekstraksjon bør gjøres er enda ikke oppnådd (Goldberg et al., 2015). Det har blant annet blitt studert hvilken partikkelstørrelse makrobiell eDNA har og Turner et al., (2014) fant at absolutt majoriteten av biologiske partikler overgikk 1µm. For å sikre at videre analyser som (q)PCR og HTS skal fungere optimalt og bidra med pålitelige resultater er kvantitet og kvalitet av miljøprøver kritisk (Spens et al., 2016). Utvikling av en standardisert metodikk innen eDNA-studier bør inkludere både design av feltarbeid og bioinformatikk etter HTS innen metabarcoding-studier (Loeza-Quintana et al., 2020). Det har for øvrig kommet forslag for standardisering av metodikk, og Shu et al. (2020) gjorde et litteratursøk ved «environmental DNA» og «fish», og 168 forskningsartikler utgitt mellom 2011 og 2019 ble inkludert. De konkluderte at for de fleste studier på påvisning av fiske vil vannprøvetakning av 1-2 liter overflate vann filtrert på 0.7µm GF filter før DNA-ekstraksjon ved DNAeasy Blood and Tissue Kit eller PowerWater DNA Isolation Kit gi gode grunnlag for å oppnå eDNA av høy kvalitet og videre pålitelige resultater. Deretter vil bruk av artsspesifikke *Cytb*-baserte primere i et qPCR-system, eller gjennom metabarcoding ved universale 12S- 16S rRNA-primere i et PCR-system med etterfulgt HTS for påvisningsstudie av alle arter til stede. Det ble også foreslått steg for optimalisering ved negativ kontroll ved alle steg i analysene av eDNA, overflatesterilisering, kjøre PCR-amplifikasjon i triplikater. Negative kontrollen reduserer risiko for falske positive prøver, mens PCR-amplifisering i triplikater reduserer risiko for falske negative.

Spens et al. (2016) gjorde en sammenligning av metoder for henting og lagring av vannbasert eDNA-prøver. Det ble argumentert at en modifisert, steg-for-steg, ekstraksjonsprotokoll med gode resultater manglet, og var nødvendig. Det ble videre identifisert tre punkter med forbedringspotensiale i forkant PCR, inkludert innsamling av nok eDNA, effektiv lagring av vannprøver frem til eDNA-ekstraksjon og minimering av kontamineringsrisiko frem til ferdig ekstrahert eDNA. Det ble konkludert at Sterivex-GP kapselfiltre (SX), med stor suksess, kan brukes for å bevise tilstedeværelse av makroorganismer. SX-filtre er en filterkapsel for vannprøvetakning mye brukt ved studie på mikrobielle samfunn, og de har også blitt brukt i studier for å bevise tilstedeværelse av fisk (Bergman et al., 2016; Chestnut et al., 2014; Keskin, 2014). Filtrene er omsluttet av en kapsel som reduserer direkte håndtering, og ettersom vannprøver enkelt kan filtreres i felt representerer kapselfiltrene reduksjon i tidsbruk. eDNA kan derfor også fikses like etter innsamling, og videre kan eDNA-ekstraksjon skje direkte fra filterkapsel uten krav om at filtermembran må fjernes eller håndteres direkte (Spens et al., 2016). Det ble videre funnet at bevaringsbuffer bør tilsettes like etter filtrering var metoden for innsamling, lagring og DNA-ekstraksjon som gav best resultater for eDNA-mengde og sensitivitet for målarter. Det ble i tillegg anbefalt å skru lokk på filterkapsel øyeblikkelig etter filtrering for å redusere kontamineringsrisiko. De fant også at eDNA i SX-filtre ble bevart godt over tid, i motsetning til åpne filtre der man gjerne ser betydelig nedbrytning av eDNA. Det ble også reflektert om dette var grunnet at filtermembranen oppbevares i en lukket kapsel og fravær av direkte håndtering av filter. Dette vil videre føre til redusert eksponeringsrisiko for fysisk og biologisk stress og kontaminering, ettersom filtrering, lagring og ekstraksjon skjer uten at filter forlater kapselen.

Tidligere kartlegging ved elektrofiske

Det ble gjort en studie på tilstedeværelse av laks og ørret ved elektrisk fiske i tolv vassdrag på Sørlandet i september-oktober, 2019: Regevikbekken, Jåbekken, Kigebekken, Harkmarkvassdraget (ved Valand og Vatne), Tånevikbekken, Trysbekken (nedre), Kleivsetelva, Lundeelva, Søgneelva, Kvernbecken og Fiskåbekken. Studiet undersøkte hvilke miljøvariabler som kunne forklare en variasjon i innslag av laks i de enkelte kystvassdragene. Det ble derfor forsøkt å velge vassdrag under generell diversitet lokalisert i ulik distanse fra store lakseelver, som for eksempel Otra og Mandalselva, vassdrag av ulik størrelse og vassdrag med og uten innsjøer i nedbørsfeltet. Lokalitetsområde ble forsøkt begrenset ved å velge vassdrag mellom Otra og Mandalselva. Det ble funnet ørret i alle tolv vassdrag, og laks i seks av dem: Harkmarkvassdraget (ved Valand), Trysbekken (nedre), Kleivsetelva, Kvernbecken, Lundeelva og Søgneelva. Resultater antydte en positiv sammenheng mellom bekkens vannføring og andelen laks. Det antas at det er en betydelig utveksling av individer mellom kystvassdrag og de større lakseelvene, og at reetablering i kystvassdragene kan grunne i feilvandring fra andre elver, men det er ikke gjort undersøkelser på dette. Laksebestander i kystvassdrag vil kunne fungere som sikringsbestander om uforutsette hendelser skulle inntreffe de større elvene. Det har lenge vært spekulert i andelen feilvandrere fra kalkede vassdrag, og om den er betydelig høyere enn det man finner i en ubehandlet elv. Et forsøk med merket smolt fra Audna og Storelva tydet på høy feilvandring til nærliggende elver, spesielt i den tidlige reetableringsfasen. Det er ikke utenkelig at kystvassdragene også kan bidra med laks til de store nærliggende lakseelvene om gytebestanden blir høy (Personlig kommunikasjon, Tormod Harraldstad).

Det har ved elektrofiske blitt påvist tilstedeværelse av laks, ørret, bekkerøye, ål, trepigget stingsild og nipigget stingsild i de tolv elvene. Det er også kunnskap om at det finnes abbor og sørv i noen av lokalitetene, uten at disse ble funnet ved tidligere elektrofiskestudie. Det er i tillegg mistanke om at det er skrubbe nært utløpt av lokalitetene, og at det er elveniøye i flere av vassdragene (Personlig kommunikasjon, Tormod Harraldstad). Kartlegging av ungfisk ved elektrofiske er en tidkrevende, men en nødvendig metodikk for å kvantifisere tetthet og mengdeforhold mellom laks og ørret. Ved å bruke eDNA og etterfølgende molekylære analyser kan utvide kartleggingsområdet betrakelig, og følge opp positive lokaliteter ved elektrofiske (Personlig kommunikasjon, Tormod Harraldstad).

Mål med studie

Det ønskes her å undersøke om tilstedeværelse av laks og ørret kan påvises ved analyse av eDNA. For å gjøre dette vil det tas vannprøver i tjue vassdrag mellom Kristiansand og Mandal i perioden mai-august. DNA tilstede i vannprøver vil ekstraheres og det vil undersøkes for tilstedeværelse av laks og ørret ved artsspesifikk qPCR og ved metabarcoding med universelle primere utviklet for fisk. Resultatene fra eDNA analysene vil sammenlignes med funn fra en tidligere studie ved elektrofiske i 2019, og de tolv elvene som da ble undersøkt er derfor inkludert her. Det ønskes videre å utvide kartleggingsområdet med åtte ytterligere elver: Sjølingstadbekken, Budokka-bekken, Trysbekken (øvre), Høyebekken (over og under anadrom grense), Prestebekken, Justvikbekken og Timenesbekken. Utvalget for inkluderte vassdrag er basert på erfaringer fra undersøkelsen i 2019, samt informasjon fra lokalkjente. Metabarcodingen vil potensielt kunne gi informasjon om tilstedeværelse av ytterligere fiskearter ut over laks og ørret, og dermed et bedre bilde av det biologiske mangfoldet i det enkelte vassdrag.

Materialer og metoder

Lokalitetsbeskrivelse

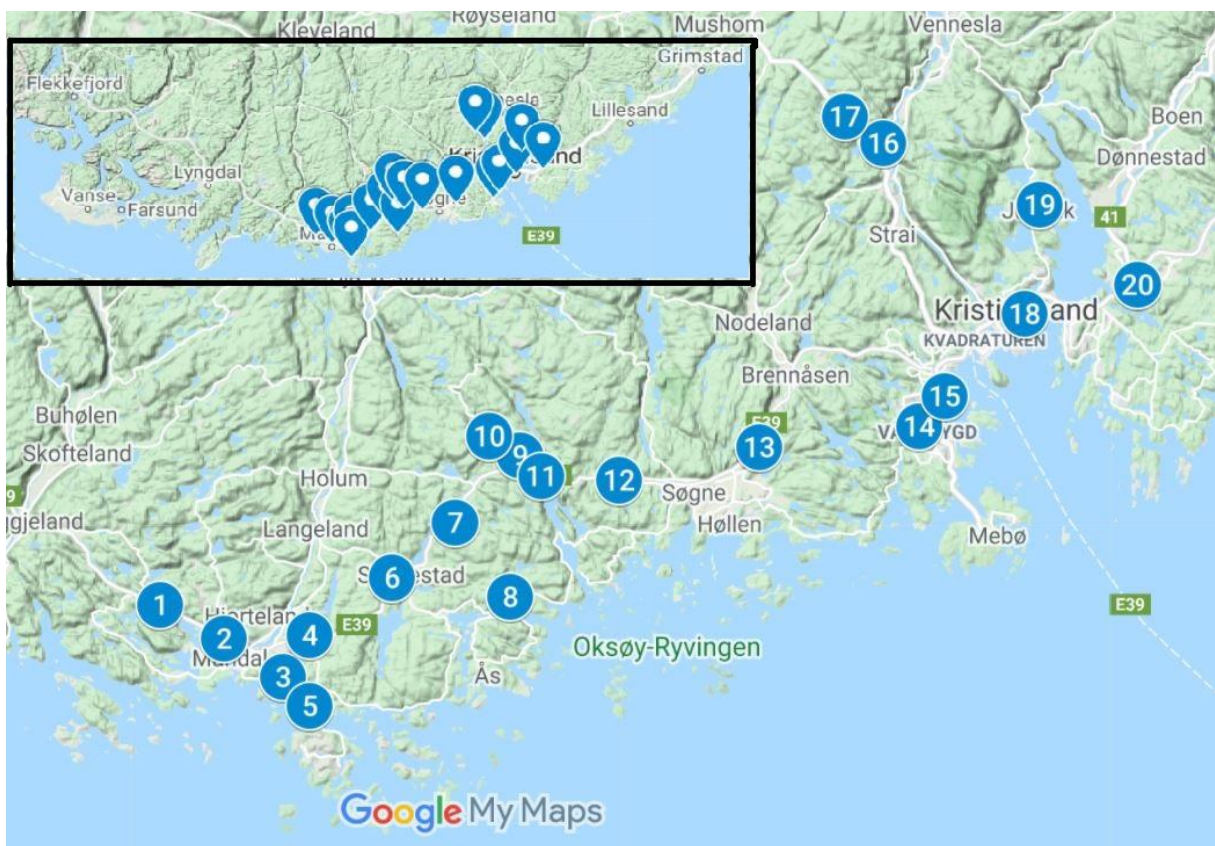
Vannprøvetakning er gjort i lokaliteter listet under i Tabell 1., der de tolv elektrofiskestuderte vassdragene er skrevet i kursiv.

Tabell 1: Vassdrag i oppgavesett med koordinater. Lokaliteter i kursiv er undersøkt i elektrofiskestudiet i 2019.

Lokalitet	Prøvenummer	GPS-koordinat
Sjølingstadbekken	1	58°02'52.6"N 7°24'05.6"E
Budokka-bekken	2	58°02'05.7"N 7°26'52.8"E
<i>Regevikbekken</i>	3	58°01'12.9"N 7°29'26.0"E
<i>Jåbekken</i>	4	58°02'11.1"N 7°30'32.6"E
<i>Kigebekken</i>	5	58°00'33.5"N 7°30'35.3"E
<i>Harkmarkvassdraget, Valand</i>	6	58°03'29.2"N 7°34'04.9"E
<i>Harkmarkvassdraget, Vatne</i>	7	58°04'46.5"N 7°36'47.1"E
<i>Tånevikbekken</i>	8	58°03'03.6"N 7°39'09.8"E
<i>Trysbekken, Nedre</i>	9	58°06'18.3"N 7°39'36.4"E
Trysbekken, Øvre	10	58°06'42.1"N 7°38'17.0"E
<i>Kleivsetelva</i>	11	58°05'48.7"N 7°40'32.1"E
<i>Lundeelva</i>	12	58°05'43.5"N 7°43'53.3"E
<i>Søgneelva</i>	13	58°06'26.8"N 7°49'56.3"E
<i>Kvernbekken</i>	14	58°06'55.7"N 7°56'49.7"E
<i>Fiskåbekken</i>	15	58°07'37.9"N 7°57'55.4"E
Høyebekken, under androm	16	58°13'21.2"N 7°55'13.9"E
Høyebekken, over anadrom	17	58°13'58.8"N 7°53'36.6"E
Pretebekken	18	58°09'30.9"N 8°01'20.4"E
Justvikbekken	19	58°11'57.5"N 8°02'03.2"E
Timenesbekken	20	58°10'08.9"N 8°06'16.1"E

Sjølingstadbekken er et større vassdrag, og vannprøver ble tatt i et område der bekken renner parallelt med E39 i et område med gårdsbruk. Budokka-bekken er en svært liten, og grunn, bekk, og vannprøver ble tatt der den renner parallelt med E39 like oppstrøms sjøen. Regevikbekken er også en svært liten bekk, med svært lite vann, og vannprøver ble tatt like oppstrøms fra sjøen. Jåbekken er en mellomstor bekk, og vannprøver ble tatt under E39 i et gårdslandlig område. Kigebekken er en liten bekk, og vannprøver ble tatt like oppstrøms der bekken renner ut i sjøen. Vannprøver for Harkmarkvassdraget (Vatne) ble tatt i en mellomstor bekk like nedstrøm der et nettverk av mindre bekker samler seg. Vannprøver for Harkmarkvassdraget (Valand) ble tatt i en noe større bekk enn ved

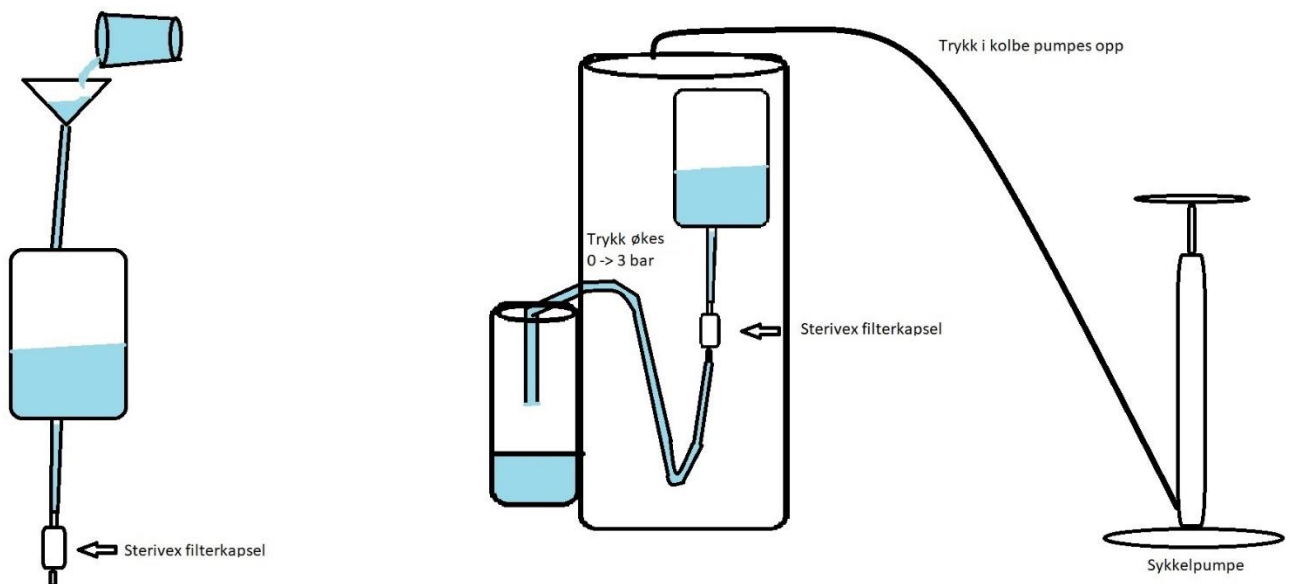
Vatne. Vannet virker brunlig i farge, og person fra området forteller bekken har vært gromsete i sammenheng veiutbygging. Tånevikbekken er en liten bekk og vannprøver ble tatt i et område med gårdsbruk like oppstrøms sjøen. Trysbekken (nedre) er en mellomstor bekk, og vannprøver for lokalitet ble tatt like etter elven kommer ut av en skog og renner videre mellom to jorder i et gårdsområde. Vannprøver for Trysbekken (øvre) ble tatt i et område av bekken som virket både smalere og generelt mindre. Kleivsetelva er en mellomstor bekk, og vannprøver ble tatt like oppstrøms der den renner ut i sjøen ved Holmen i et område der bekken er svært grunn. Lundeelva er en større elv, og vannprøver ble tatt i et område oppstrøms Lunde, der den er smalere og grunnere. Søgneelva er det største vassdraget i prøvesettet, og vannprøver ble tatt i et område der elven slanger seg gjennom et område med mye jorder. Kvernbecken er en mellomstor elv, og vannprøver ble tatt i et område der elven har tursti parallelt et stykke oppstrøms. Fiskåbekken er en mindre bekk, og prøve ble tatt like oppstrøms der bekken renner under industriområdet til Elkem og videre ut i sjøen. Høyebekken er en større bekk, og vannprøver under anadrom ble tatt i et område der bekken slanger seg gjennom yttersiden av et jorde. Over anadrom ble det tatt vannprøver i et område der bekken renner langs riksvei 9. Prestebekken er en mellomstor bekk som renner gjennom prestegården, under E39 og videre gjennom østre Lund til sjøen. Det er mye utbygging i området rundt lokaliteten der vannprøver ble tatt. Justvikbekken er en mellomstor bekk, og vannprøver ble tatt like oppstrøms fra sjøen. Timenesbekken er en liten, og grunn, bekk, og vannprøver ble tatt like oppstrøms der bekken renner under E39.



Figur 3: Kart over Sørlandet, der lokalitets koordinater er merket etter numre oppgitt i Tabell 1.

Innsamling av prøvematerialer

Innsamling ble gjort ved kit og trykkassistert filtreringssystem fra NIRAS (NIRAS A/S, eDNA sampling kit B og Pressure assisted filtration system). Filtreringssystem kan sees i Figur 4 ved oversiktsbilde og tegning som beskriver filtreringskonsept.



Figur 4: (a) Trykkassistert filtreringssystem fra NIRAS med kolbe, målebeger (montert på utsiden) og sykkelpumpe til trykkøkning og (b) Filtrering av vannprøver, der sykkelpumpe pumper trykket i kolbe til 3 bar. Dette presser vannet ut av filtreringspose, gjennom filter, og ut i målebeger.

eDNA sample kits inkluderte alt nødvendig engangsutstyr for vannprøveinnhenting; filterkapsel (Sterivex Milipore Capsule Filter, 0.2 μ m) og skrulokk for hver side av filterkapsel, filtreringspose, klistremerkelapper, engangshansker, 10ml kanyle, trakt og 3dl plastikkopp. Det trykkassisterte filtreringssystemet kom med kolbe og oppsamlingsbeger for volumsestimering etter filtrering, og trykk i kolbe ble oppnådd ved sykkelpumpe. Kolben filtrerer opptil 2l, og holdes enkelt ren ettersom alt utstyr medfulgt eDNA sample kit som er i kontakt med vannprøver er engangs.

Metodikk for innsamling av vannprøver er gjort etter protokoll fra NIRAS (NIRAS A/S, Filtration Guide): Filtreringsprosedyre ble forsøkt utført på flat bakke så kolbe fikk stå i ro, samt for å estimere filtrert volum best mulig. Det ble gjort tre filtreringer ved hver lokalitet; én negativ kontroll og to replikater av faktiske vannprøver fra vassdrag. Negativ kontroll ble

utført før faktiske vannprøver, ved underbeskrevet prosedyre, og ved First Price Mineralvann U/ kullsyre som prøvevolum.

Hansker ble tatt på før trakt ble festet i filtreringspose. Deretter ble plastikkopp á 3dl fylt opp og tømt i trakt, tre ganger. Sterivex filterkapsel (tm-navn, størrelse) ble festet i motsatt ende av filtreringspose og videre til kolbeslange, før ventil på filtreringspose ble åpnet og den ble senket ned i kolbe. Filtreringspose ble festet i to kroker i toppen av kolbe, og slangen som trakt tidligere var festet i ble knyttet og plassert langs filtreringspose i kolbe før lokk ble festet. Det ble sjekket om slangen som bringer filtrert vann ut av kolbe var fint plassert i oppsamlingsbeger festet på utsiden av kolbe. Til slutt ble sykkelpumpe festet til kolbelokk og det ble pumpet til oppnådd 3 bar. Når stor nedgang i utkommende volum ble trykk løsnet, lokk åpnet, filtreringspose hentet og filterkapsel ble avskrudd. Filterkapsel ble videre tømt for vann ved medfulgt 10ml kanyle, før medfulgt filterkapsellokk ble påskrudd utflodsiden av filterkapsel. 720µL Buffer ATL ble pipettert inn patronåpning før patronlokk ble påskrudd også denne siden. Filterkapsler ble påfestet medfølgende klistremerker for videre identifisering av prøver. Hansker ble så tatt av før videre håndtering, og filterkapsel ble lagt i vassdragspesifikk brødpose, og volum av filtrert vann ble målt. Ettersom filterkapsler er rullet i parafilm, og i originalemballasje, ble det tenkt at det var kontamineringstrygt å ha tre prøver fra samme vassdrag i én brødpose. Etter fullført lokalitet ble brødpose lagt i kjølebag, der de lå gjennom feltdag frem til de først ble overført til vanlig kjøkkenfrys og videre lagt på -20°C ved UiA.

Generelt, laboratorium

Alt laboratoriearbeid ble gjort ved Universitetet i Agder. Laboratoriumsoverflater ble sterilisert ved etanol før og etter hver prosedyre. Ved mistanke om overflatekontaminering ble det vasket med klorin og etanol. Det ble brukt FinnPipetter, og pipettespisser fra Ahn. Det ble brukt hansker under alle prosedyrer, som ble byttet hyppig. Under blanding av reaksjonsmiks, pipeters største volum til sist, før blanding ved pipettering. Prosedyrer før (q)PCR ble gjort i annen lab enn (q)PCR-amplifisering og etterfulgte prosedyrer.

Ekstrahering, prøvemateriale fra Sterivex filter

ATL-bufferløsning ble hentet ut fra filterkapsler som beskrevet i Spens et al., (2016), etter prosedyreforklaring for Sterivex Filters inkluderende Buffer ved hjelp av kanyler (20ml (24ml) Norm-Ject ® Luer).

Utsiden av filterkapsler ble først sveipet ved tørkepapir med 5% klor og deretter 70% EtOH, for å denaturere eventuell biologisk kontaminering samt å sterilisere filterkapseloverflater. Korker ble avskrudd filterkapsler og prøvevolumet ble så presset ut av kapsel og over til Eppendorfrør ved Norm-Ject kanyle. Eppendorfrør ble merket med prøvenumre for senere identifisering. Eppendorfrør ble tilsatt 80µl (/60/10µl, se under) Proteinase K, et proteinfordøyende enzym, før innkubering ved 56°C i 24 timer/over natten.

Dag 2 ble startet med vortex i ca. 15 sekunder. Ettersom volum videre ville ha oversteget maksimumsvolum for Eppendorfrør ble volum for hver prøve fordelt på to Eppendorfrør. Buffer AL og EtOH 96% ble så tilsatt begge Eppendorfrør for alle prøver, i et 1:1:1 forhold (Spens et al., 2016).

5% klor ble blandet hver kjøring, mens 70% og 96% EtOH ble blandet hver annen uke.

DNA-ekstrahering

Videre ble medfulgt protokoll for DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Inc.) fulgt fra og med Step 4: Bufferløsning fra filterkapsler, med Proteinase K, Buffer AL og EtOH, ble pipettert fra Eppendorfrør over i Qiagen Spinnkolonner, med filter med affinitet for DNA, videre plassert i Collection Tubes (2ml). Spinnkolonner ble sentrifugert ved 8000rpm i 1 minutt, og Collection tube ble deretter kastet. Spinnkolonner ble så plassert i ny Collection tube før 500µl vaskebuffer AW1, ble tilsatt, og ny sentrifugering i 1 minutt ved 8000rpm etterfulgte. Filtrert volum og Collection Tube ble kastet, og Spinnkolonne ble plassert i en siste Collection Tube. 500µl vaskebuffer AW2 ble tilsatt hver prøve før spinnkolonner ble sentrifugert i 3 minutter ved 13.4 rpm. Filtrert volum og Collection Tube ble deretter kastet, og spinnkolonne ble plassert i et nytt Eppendorfrør, merket for videre identifisering. Vaskebuffer fjerner protiner, salter og andre kontaminanter slik at DNA i prøven isoleres.

Til slutt ble DNA eluert ved å tilsette 100µl elueringsbuffer AE direkte på filter av Spinnkolonne. Før sentrifugering ved 8000rpm i 1 minutt, ble prøvene innkubert i romtemperatur i 1 minutt. Filtrert volum (<100µl Buffer AE) ble deretter pipettert ut av Eppendorfrør og tilbake på spinnkolonne før ny, tilsvarende, innkubering og sentrifugering. Dette ble gjort for å sikre at så mye DNA som mulig ble eluert fra spinnkolonnefilter over i Eppendorfrør. Ferdig ekstrahert DNA ble deretter satt på frys (-20°C) for videre analyser.

Ekstrahering av prøver som hadde lekkende filterkapsel

Enkelt filterkapsler var defekte, og utpressing av buffer-løsning var mislykket. Prøvevolum ble derfor hentet ut ved følgende modifikasjoner fra overskrevet protokoll: Kanyle ble brukt til å suge opp innhold fra filterkapsler, og volumet ble deretter presset ut i Eppendorfrør. Etersom det generelt ble lavere volum ved slik metodikk, ble det brukt 60µl Proteinase K kontra 80µL som ved ikke-defekte filterkapsler. For prøven (Harkmarkvassdraget, Valand Replik 2) ble det bare hentet 30µl bufferløsning fra filterkapsel, og det ble derfor tilsatt 10µl Proteinase K.

Måling av DNA-konsentrasjon

Renhetskvanifisering av isolert DNA ble undersøkt ved UV-spektrofotometer, Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, MA, USA), ved protokoll (Thermo Fisher Scientific, 2021): Pidestall ble vasket med papir fuktet med nukleasefritt H₂O, og deretter tørket med papir. NanoDrop nullstilles med 1.5µl tilsvarende buffer brukt ved DNA-ekstrahering, Buffer AE, etter instruks på maskin-display. Mellom nullstilling og første prøve, ved eventuelle re-nullstillinger, og videre mellom hver prøve-analyse ble pidestall tørket med papir. Det ble re-nullstilt hver 10. prøve ved å (1) tørke over pidestall, (2) load med 1.5µl Buffer AE, (3) velge «Blank»-funksjon i display, (4) tørke over pidestall igjen og (5) load med neste prøve. Prøver og Buffer AE ble oppbevart på is under spektrofotometer-analyser, og det ble brukt 1.5µl templat for hver prøvemåling. Prøve 1-9 ble mikset i forkant spektrofotometer-analyse ved knipsing på Eppendorfrør, mens prøve 10-20 ble mikset ved kort vortex og sentrifugering. Det ble kjørt med manuell nullstilling og – måling.

Nukleinsyre og proteiner har maksabsorbans på, henholdsvis, 260 og 280nm. Forholdet mellom disse bølgelengdene brukes som renhetsverifisering for ekstrahert nukleinsyre og protein. Absorpsjon ved 230nm regnes som resultat av at reagenser eller annet som er medfulgt fra prøvetakning og/eller DNA-ekstraksjon. Et A₂₆₀/A₂₈₀-forhold på ~1.8 regnes

generelt som rent DNA-produkt, mens A260/A230 helst skal befinne seg et sted mellom 2.0-2.2 (Thermo Fisher Scientific, 2015).

qPCR

qPCR-amplifikasjon ble utført for å sjekke tilstedeværelse av sjøørret og atlantisk laks ved lokaliteter. Det ble da brukt en salmoniduniversell Forward Primer, og artsspesifikke Reverse Primere og -prober etter forslag fra Matejusová et al (2008), designet ved publisert cytokrom *b* gensekvenser og bestilt fra Eurofins Genomics. Sekvenser for primere og prober er oppgitt i Tabell 2

Tabell 2: Oversikt over primere og probers sekvenser

Primer/Probe	Sekvens (5'-3')
Salmonid Cyt B Forward	CGG AGC ATC TTT CTT CTT TAT CTG T
S. salar Reverse	ACT CCG ATA TTT CAG GTT TCT TTA TAT AGA
S. trutta Reverse	CTC CGA TAT TTC AGG TTT CTT TAT ATA GG
S. salar Cyt B Probe	6-FAM-CGA GGA CTT TAT TAT GGT TC-MGB-NFQ
Salmo trutta Cyt B Probe	VIC-CGA GGA CTC TAC TAT GGT TC-MGB-NFQ

Primerne amplifiserer et fragment fra Cytochrom *b*-genet på 96- og 95 basepar for henholdsvis laks og ørret. Positive kontroller brukt under qPCR analyser er DNA ekstrahert fra sjøørret og atlantisk laks fanget ved el-fiske i kystvassdrag i Agder. Per reaksjon (antall + ca. 10%) ble reaksjonsmiks blandet ved oppskrift beskrevet i Tabell 3.

Tabell 3 Oppskrift for reaksjonsmiks, qPCR

1.9 µl nukleasefritt H ₂ O
10 µl TaqMan Environmental Master Mix 2x
1.8 µl Primer Forward (10µM)
1.8 µl Primer Reverse (10µM), enten Ørret eller Laks
0.5 µl Probe (10µM), enten Ørret eller Laks
4.0 µl DNA/kontroll

Alle prøver ble kjørt i triplikat ved hver artsspesifikk reverse primer og probe. Prosedyre for qPCR var som følger: Det ble laget en reaksjonsmiks for hver av de to salmonidae-artene, med deres respektive reverse primere og prober. Prøver, kontroller, primere og prober, ble vortexet kort og spunnet ned før bruk. Reaksjonsmikser ble blandet ved pipettering før 16µL

ble tilført brønner, og 4µl DNA/kontroll ble tilsatt sine respektive brønner. Til slutt ble PCR-strips spunnet ned og analyse startet.

qPCR-analyser ble kjørt på StepOnePlus™ Real-Time PCR-system (Applied Biosystems) og ved PC-program StepOne™ Software v2.3. Analyse bestod av én enkel syklus for UNG (Uracil-*N*-glycosylase) fordøyelse av mulige tidligere amplifiserte kontamineringsprodukt ved 50°C (2 minutter) før 95°C (10 minutter), etterfulgt av 60 sykluser med denaturering og hybridisering ved henholdsvis 95°C (15 sekunder) og 60°C (1 minutt). Det ble valgt å kjøre på 60 sykluser ettersom prøver er ekstrahert fra konsentrasjonssensitive eDNA-prøver.

Korrigerings av Ct-verdier

Blant annet grunnet ulike volum for filtrert vann og uthentet bufferløsning fra filterkapsel, er sammenligning av Ct-verdier på kryss av lokalitet vanskelig. Ved å korrigere målte Ct-verdier mot en, tilfeldig valgt, referansebekks volum, kan volumsforholdene (VF) til hver prøve gi en korrigert Ct-verdi. Dette er gjort ved å først regne ut volumsforhold for filtrert vann, og deretter regne korrigert Ct ved

Målt Ct $-(1-VF)*2 =$ korrigert Ct.

Deretter gjøres korrigerings ved samme prosedyre for volum av uthentet bufferløsning fra filterkapsel. Korrigert Ct-verdi kan bidra til enklere sammenligning av DNA-mengde i ulike prøver.

Analyse av eDNA ved metabarcoding

Sammenlåing av replikater

For å redusere prøvesett før sekvensering ble hver lokalitets to replikatprøverslått sammen i forkant PCR. Replikater ble slått sammen ved hensyn til Nanodrop-resultater, slik at konsentrasjon for hvert replikat var likt. Det var først tenkt å slå sammen alle prøver til samme konsentrasjon, men ettersom det var stor variasjon ble det valgt å sette nedre grense på 20ng/ul. Alle lokaliteter med replikater som oversteg dette ble fortynnet ned ved Buffer AE.

PCR

For PCR-analyse ble et fiske-universelt primerset MiFish-U brukt, Tabell 4 (Miya et al., 2015). Primersettet dekker et område på 12S rRNA genet som inneholder en hypervariabel region ved basepar 163-185, i tillegg til mindre, ikke-variable, regioner på hver side. Denne hypervariabel regionen inneholder tilstrekkelig informasjon til å identifisere fisk til taksonomisk familie, slekt og art.

Tabell 4: Forward- og reverse fiske-universelle primer brukt ved PCR-analyse.

Primer	Sekvens (5'-3')
MiFish-U-F	GTCGGTAAACTCGTGCCAGC
MiFish-U-R	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTG

PCR-amplifikasjon av sammenslåtte replikater ble kjørt på Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Amplifisering startet med én enkel syklus for UNG-fordøyelse ved 95°C (10 minutter) før 40 sykluser med denaturering og hybridisering ved henholdsvis 95°C (15 sekunder), 58°C (30 sekunder) og 72°C (30

sekunder). Amplifisering avsluttet ved 72°C i 5 minutter. BGI oppgav krav om høy DNA-konsentrasjon, >1µg DNA, og som tidligere nevnt inneholder eDNA-prøver svakere konsentrasjoner enn vevs/blod-ekstrahert DNA, og det ble derfor valgt å kjøre 40 sykluser. Grunnet kravet om høy DNA-konsentrasjon fra sekvenseringslaboratorium ble i tillegg reaksjonsmiks kjørt ved totalvolum 50µl, ved oppskrift beskrevet i Tabell 5.

Tabell 5: Oppskrift for reaksjonsmiks ved PCR-amplifikasjon

10 µL PCR grade H2O
25 µL TaqMan Environmental Master Mix (2x)
4.5 µL Primer F (10µM, MiFish-U-F)
4.5 µL Primer R (10µM, MiFish-U-R)
6 µL DNA/kontroll

De 20 lokalitetsprøvene ble kjørt i kronologisk rekkefølge over tre strips (0.2ml PCRstrips, merke), avsluttet med negativ kontroll. Det ble ikke brukt positive kontroller under PCR-analyse, mens negativ kontroll ble tatt med for kontaminerings- og feilanalysekontroll. Etter PCR-analyse, ble PCR-produktstrips lagt på frys til videre analyse.

Gel elektroforese

Det ble gjennomført gel elektroforese (PowerPac Basic™, 300V) i etterkant av hver PCR-amplifisering. Elektroforesen ble gjennomført ved følgende protokoll:

Gel elektroforese ble kjørt på 1% agarose ved 100ml 1xTAE + 1.0g Agarose + 10µL SybrSafe DNA gelstrain (Thermo Fisher Scientific). Agarosen ble blandet med 1xTAE buffer ved mikrobølgeoppkok, og Sybrsafe DNA gelstrain ble tilsatt når væske var nedkjølt. Da miks var ferdig blandet, og nedkjølt, ble det overført til gel-stativ, og brønnekammer ble tilført.

Elektroforese ble kjørt med størrelsesstandard (Gel pilot, 1kb Plus Ladder, Qiagen) i første brønn, laget ved 9µl nukleasefritt H2O + 1µl stock, gel pilot, deretter blandet med 2µl loading dye per 10µl volum. For prøver ble det brukt 10µl PCR-produkt mikset med 2µl Loading Dye. Ved elektroforese av PCR-produkt som ikke skulle analyseres i etterkant ble det tilsatt 4µl Loading Dye til strips med 20µl PCR-produkt. Loading dye og PCR-produkt ble blandet ved pipettering før overføring til gel-brønner. Gel elektroforese ble kjørt på 100V i ca. 30 minutter, og bilder av bånd ble tatt (Nu Genius, Syngene).

50xTAE blandes ved å løse opp 242g Trisbase i 750ml dH2O, deretter tilsettes det 57.1ml glacial acetic acid og 100ml 0.5M EDTA, før det avslutningsvis tilsettes dH2O frem til totalt volum på 1 liter. Videre blandes 1xTAE ved tilsette 49 deler dH2O til 1 del 50xTAE. Loading dye blandes ved 25mg bromophenol blue og 5ml dH2O. Videre tilsettes 25mg xylene cyanol FF og 5ml glyserol.

PCR-produktrengjøring

Rengjøring av PCR-produkt ble gjort ved kit og protokoll fra Invitrogen, (Invitrogen, 2011). Strips med PCR-produkt ble sentrifugert før protokollstart. Binding Buffer (B2) og PCR-produkt ble blandet ved 4:1, altså 200µL Binding Buffer ved 50µL PCR-produkt, blandet ved pipettering. Totalvolumet, 250µl, ble deretter pipettert over på medfulgt Spin Column, etterfulgt av sentrifugering på 10.000*g i 1 minutt. Flow-through ble kastet og Spin Column ble plassert i medfulgt Collection tube før 650ul Wash Buffer (W1) ble tilsatt. Enda en

sentrifugering på 10.000*g i 1 minutt, og kast av flow-through etterfulgte, før ny sentrifugering på maksimum hastighet (13.5 RPM) i 3 minutter. Til slutt ble prøven eluert over til medfulgt 1.7ml Elution Tube og ved at 50ul Elution Buffer ble tilsatt senter av Spin Column, som ble inkuberet i 1 minutt ved romtemperatur. Deretter fulgte sentrifugering ved maksimum hastighet i 2 minutter. Eluation Tube inneholder da rensset PCR-produkt og ble plassert på -20°C for videre analyse. Negativ kontroll ble også rensset, i tilfelle PCR-produkt ville gel-elektroforeses før innsending til sekvensering.

Qubit

DNA-konsentrasjon i rensset PCR-produkt for alle prøver ble sjekket ved fluorometer-analyse, Qubit® Fluorometer 2.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.), før de ble sendt inn til sekvensering. Prøver ble tint, vortexet og sentrifugert, og plassert på is i forkant analyse og Qubit Assays Protocol og kit (Invitrogen, 2010) ble videre fulgt for konsentrasjonsmåling:

Qubit™ Working Solution ble først blandet med Qubit™ Buffer og -Reagens i et 15ml rør ved $1 * n \mu\text{l}$ Qubit™ Reagent + $199 * n \mu\text{l}$ Qubit™ Buffer, $n = \text{prøveantall} + \sim 10\%$. Videre ble Standard 1 og 2 mikset ved $190 \mu\text{l}$ Qubit™ Working Solution + $10 \mu\text{l}$ Stock Standard, henholdsvis 1 og 2, til deres respektive Qubit™ Assay Tube. For prøver ble det pipettert $197 \mu\text{l}$ Qubit™ Working Solution + $3 \mu\text{l}$ PCR-produkt til prøvers respektive Qubit™ Assay Tube. Før Qubit-måling ble alle rør vortexet og inkubert ved romtemperatur i 2 minutter. Videre ble rør satt i Qubit® 2.0 Fluorometer for målinger etter instruks på maskindisplay. Det ble brukt en tilleggsfunksjon, Dilution Calculator, ved hver måling for kalkulering av hele PCR-produkt stock konsentrasjon.

Sekvensering

DNBseq-sekvensering ble gjort av BGI (Beiging Genome Institute) i deres laboratorier, og de har oppgitt følgende protokoll: Fragmenter ble ende-reparert og 3'adenylert, før adaptere ble ligert til endene av disse 3'adenylerte endene. Produktene ble PCR-amplifisert og rensset ved Agencourt AMPure XP-Medium kit. Rensset, dobbeltrådet, PCR-produkt ble deretter varmedenaturert til enkeltråder og sirkulert ved splint-oligosekvensen. Den sirkulære enkeltråden av DNA (ssCir DNA) ble formattert til det endelige biblioteket og kvalitetssjekket ved QC-analyse. Til slutt ble kvalitetsgodkjente prøver sekvensert ved DNBseq. Et ssCIR DNA-molekyl danner, gjennom rolling-cycle replikasjon, en DNA nanoball (DNB) som inneholder mer enn 300 kopier. Det brukes en DNA nanochip teknologi ved høy tetthet for å tilføre DNB-ene til nanoarray. Til slutt hentes det par-endet 150 basepars sekvenser ved kombinatorisk probeanker-syntese (cPAS).

Bioinformatikk

Sekvenseringsdata fra DNBSeq ble levert i form av 150-basepar lange par-endede fastq-filer. For hver av lokalitetene ble dataene samlet i to filer, en fil for sekvenser for hver ende av det enkelte sekvenserte fragmentet (R1 og R2). Dataene var filtrert for adaptersekvenser og kvalitetsfiltrert. For hver lokalitet ble det sekvensert >30 millioner reads for hver ende av fragmentet, men det her er brukt 10 millioner reads fra hver ende (10 millioner R1 + 10 millioner R2 fra hver bekk) grunnet tidsbegrensning.

Det ble satt sammen en referansedatabase av mitokondrielle DNA sekvenser fra aktuelle fiskearter. Artene er angitt i Tabell 6 Sekvensene ble lastet ned fra NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Programvaren HS-BLAST (Chen et al., 2015) ble brukt til å

sammenligne sekvensene R1 og R2 for hver lokalitet opp mot databasen. Artstreff mot databasen med alignment lengde på minimum 100 basepar og minimum 99 prosent identitet for mer enn 100 sekvenser blant både R1 og R2 ble vurdert som påvisning av arten i prøven. Sekvenser som traff ($\geq 99\%$ identitet for alignment ≥ 100 basepar) til mer enn en art ble ikke medregnet. Bioinformatikk er utført av veileder, Marte Sodeland.

Tabell 6:

Norsk navn	Latinsk navn	NCBI Acession
Atlantisk laks	<i>Salmo salar</i>	KF792729.1
Brunørret	<i>Samlo trutta</i>	AM910409.1
Ål	<i>Anguilla anguilla</i>	KJ564227.1
Abbor	<i>Perca fluviatilis</i>	MT410943.1
Trepigget stingsild	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	NC_041244.1
Røye	<i>Salvelinus alpinus</i>	AF154851.1
Sørv	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	AP011263.1
Bekkerøye	<i>Salvelinus fontinalis</i>	AF154850.1
Pukkellaks	<i>Oncorhynchus gorboscha</i>	EF455489.1
Regnbueørret	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	MT410879.1
Canadarøye	<i>Salvelinus namaycush</i>	MF621747.1
Gjedde	<i>Esox lucius</i>	AP004103.1
Karpe	<i>Cyprinus carpio</i>	KJ511883.1
Dvergmalle	<i>Ameiurus nebulosus</i>	NC_042499.1
Regnlaue	<i>Leucaspis delineatus</i>	AP009307.1
Rødgjellet solabbor	<i>Lepomis gibbosus</i>	KP013097.1
Sandkryper	<i>Gobio gobio</i>	AB239596.1
Suter	<i>Tinca tinca</i>	AB218686.1
Gullfisk	<i>Carassius auratus</i>	KF147851.1

Test av reaksjonsmiks-oppskrift, temperaturprofil:

Det ble testet med MiFish-primere og TaqMan Environmental Master Mix på replikatsammenslåtte prøver, for å se om reaksjonsmiks og temperaturprofil ville kunne gi sterke nok resultater for sammenslåtte, og i noen tilfeller fortynnet, prøver.

Det ble testet med Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) som potensiell master mix i PCR-reaksjonsmiks, ettersom den har høyere nøyaktighet i syntesen ved proofreading slik at man i større grad unngår at det dannes feil i sekvens grunnet feilinkorporeringer i PCR-syntese. Reaksjonsmiks og temperaturprofil ble gjort så likt prosedyrer skrevet tidligere som det lot seg gjøre innenfor anbefalinger for bruk av High Fidelity Master Mix. Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix ble valgt bort grunnet ugunstige gel elektroforese-resultater.

Resultater

qPCR

qPCR-amplifisering viste tilstedeværelse av laks i 12/20 vassdrag. Gjennomsnitt av lokalitetsparallele Ct-resultater fra positive kjøringer, så vel som resultater fra elektrofiskestudiet i 2019, er beskrevet i Tabell 7. For 17 av de 20 elvene viste alle seks prøver gjennomgående positive eller negative resultater, men for tre elver var ikke dette tilfellet: (1) for Kleivsetelva ble det funnet lakse-DNA i fem av seks prøver, (2) for Fiskåbekken ble det funnet lakse-DNA i 3 av 3 prøver fra Replik 2, men bare 1 av 3 prøver fra Replik 1 hadde lakse-DNA, og (3) for Kigebekken ble det bare funnet lakse-DNA i én av seks prøver.

Tabell 7: Gjennomsnitt av lokalitetsparallele Ct-resultater i qPCR-analyse fra vannprøver tatt i kystvassdrag mellom Mandal og Kristiansand for test for tilstedeværelse av laks, inkludert resultater fra elektrofiskestudie i 2019, neg=ikke påvist tilstedeværelse av laks og N/A=lokalitet ble ikke sjekket ved elektrofiskestudiet.

Bekk	Negativ kontroll	qPCR Replik 1	qPCR Standardavvik	qPCR Replik 2	qPCR Standardavvik	El-fiske, 2019
Sjølingstadbekken	Neg	34,64	0,11	32,94	0,02	N/A*
Budokka-bekken	Neg	36,10	1,45	36,07	1,18	N/A
Regevikbekken	Neg	Neg	-	Neg	-	Neg
Jåbekken	Neg	Neg	-	Neg	-	Neg
Kigebekken	Neg	Neg	-	38,97	0,00	Neg
Harkmarkvassdraget, Valand	Neg	Neg	-	Neg	-	Funn
Harkmarkvassdraget, Vatne	Neg	Neg	-	Neg	-	Neg
Tånevikbekken	Neg	Neg	-	Neg	-	Neg
Trysbekken	Neg	35,57	0,95	34,67	0,25	Funn
Trysbekken, øvre	Neg	Neg	-	Neg	-	N/A**
Kleivsetelva	Neg	36,99	1,01	39,33	0,65	Funn
Lundeelva	Neg	31,98	0,16	33,40	0,19	Funn
Søgneelva	Neg	32,16	0,23	32,82	0,25	Funn
Kvernbekken	Neg	36,54	0,14	37,23	0,64	Funn
Fiskåbekken	Neg	38,72	0,00	38,96	1,47	Neg
Høyebekken	Neg	32,82	0,26	32,75	0,06	N/A*
Høyebekken, over anadrom	Neg	Neg	-	Neg	-	N/A**
Prestebekken	Neg	39,05	1,50	33,02	0,17	N/A
Justvikbekken	Neg	36,18	0,22	35,94	0,65	N/A***
Timenesbekken	Neg	Neg	-	Neg	-	N/A**

*Det ble, ved annet elektrofiskestudie enn beskrevet fra 2019, påvist laks i lokalitet. **Det ble, ved annet elektrofiskestudie enn beskrevet fra 2019, ikke påvist laks i lokalitet. *** Det har blitt observert gytelaks av lokale (Personlig kommunikasjon, Tormod Haraldstad).

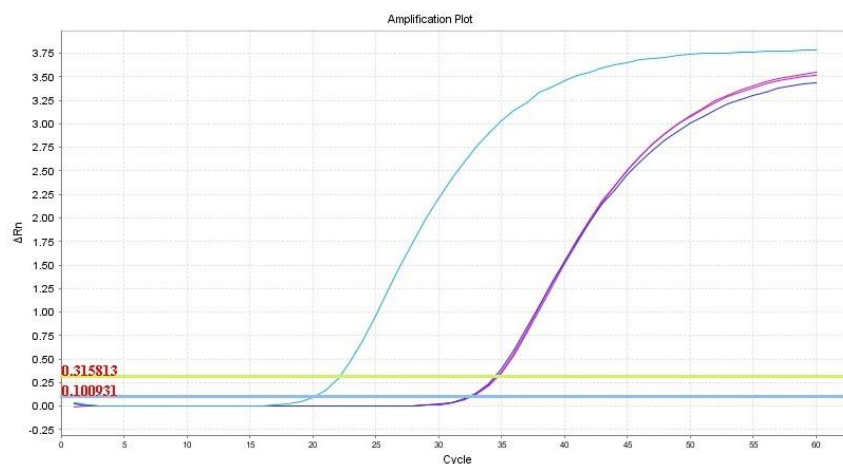
Samtlige vassdrag viste tilstedeværelse for ørret, og gjennomsnitt av lokalitetsparallele Ct-resultater er beskrevet i Tabell 8 ved sammenligning av resultater fra elektrofiskestudiet i 2019.

Tabell 8: Gjennomsnitt av Ct-verdier i qPCR-analyse for tilstedeværelse av ørret, inkludert resultater fra elfiske-studie i 2019, neg = ikke påvist tilstedeværelse av ørret, N/A = lokallitet ble ikke sjekket ved elektrofiskestudiet

Bekk	Negativ kontroll	qPCR Replikant 1	qPCR Standardavvik	qPCR Replikant 2	qPCR Standardavvik	El-fiske, 2019
Sjølingstadbekken	Neg	33,47	0,11	33,86	0,09	N/A*
Budokka-bekken	Neg	30,35	0,03	30,03	0,05	N/A*
Regevikbekken	Neg	32,79	0,19	32,45	0,04	Funn
Jåbekken	Neg	37,62	0,35	37,59	0,79	Funn
Kigebekken	Neg	31,75	0,05	30,67	0,07	Funn
Harkmarkvassdraget, Valand	Neg	36,03	0,13	38,65	0,56	Funn
Harkmarkvassdraget, Vatne	Neg	35,91	0,05	36,59	0,10	Funn
Tånevikbekken	Neg	31,98	0,09	32,21	0,18	Funn
Trysbekken	Neg	34,13	0,05	34,16	0,11	Funn
Trysbekken, øvre	Neg	33,43	0,10	33,48	0,08	N/A*
Kleivsetelva	Neg	33,25	0,07	33,73	0,17	Funn
Lundeelva	Neg	31,89	0,07	32,98	0,08	Funn
Søgneelva	Neg	34,49	0,15	34,77	0,36	Funn
Kvernbekken	Neg	34,88	0,10	35,48	0,24	Funn
Fiskåbekken	Neg	32,26	0,07	32,18	0,09	Funn
Høyebekken	Neg	32,10	0,08	32,22	0,04	N/A*
Høyebekken, over anadrom	Neg	31,32	0,06	31,38	0,12	N/A*
Prestebekken	Neg	33,23	0,04	33,36	0,15	N/A*
Justvikbekken	Neg	33,83	0,22	34,57	0,09	N/A*
Timenesbekken	Neg	30,06	0,08	30,03	0,05	N/A*

*Det har blitt påvist ørret ved annet elektrofiskestudie enn beskrevet fra 2019.

Ct-verdi for samtlige qPCR-analyser er beskrevet i Tabell 15 og 16, Vedlegg, for henholdsvis ørret og laks. Under, i Figur 5, vises amplifikasjonsplott for triplikatprøver fra Sjølingstadbekken (Replikant 1). Blå kurve som passerer threshold rett i forkant Ct=20 er positiv kontroll, mens de tre samlede prøvene som kommer senere er tripliktene fra Sjølingstadbekken.



Figur 5: Amplifikasjonsplott av Ct-verdier for triplikprøver fra Sjølingstadbekken (Replikant 1). Positiv kontroll sees som blå kurve tidligere enn samling av prøvetriplikater

Ct-verdi, volumskorrigert etter referansebekk

Det har blitt utregnet korrigert Ct-verdi fra en tilfeldig valgt referansebekk ved prøvenes filtrerte volum, og volum for ekstrahert bufferløsning fra filterkapsel. Filtrert volum varierte fra 162-955ml, der 19/60 prøver oppnådde mindre enn 500ml og 17/60 prøver oppnådde mer enn 800ml. Det ble hentet ut et volum av bufferløsning fra 30-710µl, der 10/40 lå under 400µl og bare én prøve lå under 200µl. Dette har blitt gjort for laks og ørret separat, og referansekorrigert Ct-verdi kan sees i Tabell 9 og 10, for henholdsvis laks og ørret.

For korrigerte Ct-verdier ved amplifisering med lakseprimer er Lundeelva, Replikat 1, brukt som referansebekk. Det er bare de 23 positive prøvene som er inkludert i Tabell 8. Den største korrigeringen gjelder for Trysbekken (nedre), Replikat 1, der Ct-verdien har blitt korrigert ned med 2.03, og den minste korrigeringen gjelder for Justvikbekken, Replikat 1, der Ct-verdien har blitt korrigert opp med 0.11.

Tabell 9: Korrigerte Ct-verdier for laks ved filtrert vannvolum og volum for kapselhentet bufferløsning. Ct, målt = Ct-verdien oppnådd ved qPCR, og Ct, korrigert = Ct-verdi etter korrigering ved volumsforskjell fra referansebekk

Bekk	Nummer	Ct, målt	Filtrert volum (ml)	Ekstrahert kapselløsning (µl)	Ct, korrigert
Søgneelva	Replikat 1	32,16	405	590	31,22
Søgneelva	Replikat 2	32,82	406	420	31,31
Prestebekken	Replikat 2	33,02	406	440	31,58
Lundeelva	Replikat 1	31,98	742	600	31,98
Lundeelva	Replikat 2	33,40	605	390	32,33
Høyebekken (under anadrom)	Replikat 2	32,75	650	595	32,48
Sjølingstadbekken	Replikat 2	32,94	786	500	32,73
Trysbekken (nedre)	Replikat 2	34,67	286	450	32,94
Høyebekken (under anadrom)	Replikat 1	32,82	750	710	33,21
Trysbekken (nedre)	Replikat 1	35,57	284	360	33,54
Sjølingstadbekken	Replikat 1	34,64	813	480	34,43
Kvernbekken	Replikat 1	36,54	481	390	35,13
Justvikbekken	Replikat 2	35,94	692	430	35,24
Kvernbekken	Replikat 2	37,23	455	300	35,46
Budokka-bekken	Replikat 1	36,10	650	565	35,74
Budokka-bekken	Replikat 2	36,07	778	610	36,20
Justvikbekken	Replikat 1	36,18	769	610	36,28
Prestebekken	Replikat 1	39,05	395	330	37,21
Kleivsetelva	Replikat 1	36,99	955	640	37,69
Kigebekken	Replikat 2	38,97	376	590	37,95
Fiskåbekken	Replikat 1	38,72	540	660	38,38
Fiskåbekken	Replikat 2	38,96	526	630	38,47
Kleivsetelva	Replikat 2	39,33	850	560	39,48

For korrigerte Ct-verdier ved amplifisering med ørretprimer er Budokka-bekken, Replikat 2, brukt som referansebekk. Samtlige prøver var positive og er inkludert i Tabell#. Den største korrigeringen gjelder for Harkmarkvassdraget (Valand), Replikat 2, der Ct-verdien har blitt korrigert ned 3.47, og seks andre prøver har blitt korrigert ned mer enn 2.0. Den minste korrigeringen gjelder for Kleivsetelva, Replikat 2, som har blitt korrigert opp 0.02, og Justvikbekken, Replikat 1, som har blitt korrigert ned 0.02.

Tabell 10: Korrigerte Ct-verdier for ørret ved filtrert vannvolum og volum for kapselhentet bufferløsning. Ct, målt = Ct-verdien oppnådd ved qPCR, og Ct, korrigert = Ct-verdi etter korrigering ved volumsforskjell fra referansebekk.

Bekk	Nummer	Ct, målt	Filtrert volum (ml)	Ekstrahert kapselløsning (µl)	Ct, korrigert
Timenesbekken	Replik 2	30,03	750	410	29,30
Timenesbekken	Replik 1	30,06	800	440	29,56
Kigebekken	Replik 2	30,67	376	590	29,57
Budokka-bekken	Replik 1	30,35	650	565	29,88
Budokka-bekken	Replik 2	30,03	778	610	30,03
Kigebekken	Replik 1	31,75	388	500	30,38
Høyebekken (over anadrom)	Replik 2	31,38	477	600	30,58
Høyebekken (over anadrom)	Replik 1	31,32	517	700	30,94
Prestebekken	Replik 1	33,23	395	330	31,33
Fiskåbekken	Replik 2	32,18	526	630	31,59
Tånevikbekken	Replik 1	31,98	582	650	31,61
Lundeelva	Replik 1	31,89	742	600	31,76
Fiskåbekken	Replik 1	32,26	540	660	31,81
Lundeelva	Replik 2	32,98	605	390	31,81
Høyebekken (under anadrom)	Replik 2	32,22	650	595	31,85
Prestebekken	Replik 2	33,36	406	440	31,85
Tånevikbekken	Replik 2	32,21	683	590	31,90
Trysbekken (nedre)	Replik 1	34,13	284	360	32,04
Regevikbekken	Replik 2	32,45	649	585	32,04
Regevikbekken	Replik 1	32,79	587	600	32,27
Trysbekken (øvre)	Replik 2	33,48	349	585	32,30
Høyebekken (under anadrom)	Replik 1	32,10	750	710	32,36
Trysbekken (nedre)	Replik 2	34,16	286	450	32,37
Trysbekken (øvre)	Replik 1	33,43	375	630	32,46
Sjølingstadbekken	Replik 1	33,47	813	480	33,13
Søgneelva	Replik 2	34,77	406	420	33,19
Kvernbekken	Replik 1	34,88	481	390	33,40
Søgneelva	Replik 1	34,49	405	590	33,46
Sjølingstadbekken	Replik 2	33,86	786	500	33,52
Harkmarkvassdraget (Vatne)	Replik 1	35,91	232	340	33,62
Kvernbekken	Replik 2	35,48	455	300	33,63
Harkmarkvassdraget (Valand)	Replik 1	36,03	200	350	33,70
Kleivsetelva	Replik 2	33,73	850	560	33,75
Justvikbekken	Replik 2	34,57	692	430	33,76
Kleivsetelva	Replik 1	33,25	955	640	33,80
Justvikbekken	Replik 1	33,83	769	610	33,80
Harkmarkvassdraget (Vatne)	Replik 2	36,59	222	300	34,15
Jåbekken	Replik 2	37,59	162	200	34,66
Harkmarkvassdraget (Valand)	Replik 2	38,65	167	30	35,17
Jåbekken	Replik 1	37,62	195	410	35,47

DNA-konsentrasjon

Konsentrasjon varierte fra 5.6-127ng/μl, der Harkmarkvassdraget (Valand, Replikat 2) og Kigebekken (Replikat 1) gav henholdsvis minste og største konsentrasjon. For A260/A280 varierte fult prøvesett fra 0.86-2.81, og ekskludert negative kontroller fra 0.97-1.88. For A260/A230 varierte fult prøvesett fra 0.2-1.54, og ekskludert negative kontroller fra 0.43-1.54. Resultater, konsentrasjon (ng/μl) samt A260/A280 og A260/A230 mål er listet i Tabell 11.

Tabell 11: Nanodrop-resultater i etterkant DNA-ekstrahering av samtlige prøver.

Bekkenavn	Prøve	Ng/μl	A260/A280	A260/A230
Sjølingstadbekken	Negativ kontroll	5,1	1,26	0,29
Sjølingstadbekken	Replikat 1	28,4	1,67	1,08
Sjølingstadbekken	Replikat 2	20,8	1,64	0,89
Budokka-bekken	Negativ kontroll	6,7	1,27	0,28
Budokka-bekken	Replikat 1	25,8	1,62	1
Budokka-bekken	Replikat 2	33	1,61	0,94
Regevikbekken	Negativ kontroll	10,9	1,38	0,39
Regevikbekken	Replikat 1	15,9	1,7	0,65
Regevikbekken	Replikat 2	22,2	1,6	1,08
Jåbekken	Negativ kontroll	3,5	1,18	0,43
Jåbekken	Replikat 1	17	1,5	0,64
Jåbekken	Replikat 2	11	1,44	0,65
Kigebekken	Negativ kontroll	2,2	0,93	0,42
Kigebekken	Replikat 1	127	1,24	0,47
Kigebekken	Replikat 2	119,7	1,32	0,54
Harkmarkvassdraget, Valand	Negativ kontroll	3,7	1,13	0,48
Harkmarkvassdraget, Valand	Replikat 1	18,1	1,48	0,78
Harkmarkvassdraget, Valand	Replikat 2	5,6	1,33	0,54
Harkmarkvassdraget, Vatne	Negativ kontroll	2,7	1,19	0,6
Harkmarkvassdraget, Vatne	Replikat 1	22	1,49	0,85
Harkmarkvassdraget, Vatne	Replikat 2	13	1,61	0,43
Tånevikbekken	Negativ kontroll	6,2	1,32	0,59
Tånevikbekken	Replikat 1	104,8	0,97	0,55
Tånevikbekken	Replikat 2	50,3	1,88	1,54
Trysbekken, nedre	Negativ kontroll	3,7	1,12	0,43
Trysbekken, nedre	Replikat 1	15,1	1,36	0,52
Trysbekken, nedre	Replikat 2	12,4	1,38	0,59
Trysbekken, øvre	Negativ kontroll	36,8	1,51	0,49
Trysbekken, øvre	Replikat 1	29,7	1,4	0,56
Trysbekken, øvre	Replikat 2	31,2	1,42	0,59
Kleivsetelva	Negativ kontroll	4	1,78	0,43
Kleivsetelva	Replikat 1	39,1	1,64	0,91
Kleivsetelva	Replikat 2	20,9	1,77	1,04
Lundeelva	Negativ kontroll	2,6	0,86	0,48
Lundeelva	Replikat 1	19,7	1,64	1,09
Lundeelva	Replikat 2	8,2	1,6	0,84
Søgneelva	Negativ kontroll	4,3	1,08	0,4
Søgneelva	Replikat 1	20,6	1,64	1,01
Søgneelva	Replikat 2	13,7	1,49	0,87

Kvernbekken	Negativ kontroll	2,6	1,12	0,26
Kvernbekken	Replik 1	21,9	1,63	0,73
Kvernbekken	Replik 2	18	1,61	0,85
Fiskåbekken	Negativ kontroll	4,7	1,28	0,3
Fiskåbekken	Replik 1	26,5	1,61	1,04
Fiskåbekken	Replik 2	27,2	1,58	1,02
Høyebekken, under anadrom	Negativ kontroll	0,8	2,81	0,2
Høyebekken, under anadrom	Replik 1	48,6	1,45	0,7
Høyebekken, under anadrom	Replik 2	27,2	1,54	0,81
Høyebekken, over anadrom	Negativ kontroll	7,1	1,69	0,23
Høyebekken, over anadrom	Replik 1	37,5	1,34	0,61
Høyebekken, over anadrom	Replik 2	27,1	1,41	0,62
Prestebekken	Negativ kontroll	3,9	1,11	0,57
Prestebekken	Replik 1	21,8	1,65	0,9
Prestebekken	Replik 2	18,8	1,53	0,87
Justvikbekken	Negativ kontroll	2,5	1,06	0,26
Justvikbekken	Replik 1	21,6	1,77	1,3
Justvikbekken	Replik 2	16,2	1,78	1,24
Timenesbekken	Negativ kontroll	3,3	1,26	0,44
Timenesbekken	Replik 1	6,7	1,78	1,35
Timenesbekken	Replik 2	8,5	1,67	0,98

Analyse av eDNA ved metabarcoding

Sekvensering, bioinformatikk

Etter kvalitetstesting av BGI på innsendte prøver var det fjorten av prøvene som kvalifiserte til sekvensering, se Tabell 14. Det ble benyttet en PCR basert bibliotekprotokoll da protokoll uten PCR ikke ga bibliotek av høy nok kvalitet for sekvensering. Lokalteter som oppnådde treff med 100 eller flere sekvenser mot en art i databasen, for både R1 og R2, er vurdert positive og merket ved fet skrift i Tabell 12. Prøver fra lokaliteter ved treff med $0 < x < 100$, er inkludert i tabell, men ikke vurdert positive og er skrevet i kursiv. Det ble funnet brunørret i alle lokaliteter som har blitt sekvensert. Videre ble det funnet atlantisk laks i elleve av lokalitetene. Det var gjennomgående flere sekvenser som ga treff for brunørret enn for atlantisk laks i lokaliteter, sett bort i fra Lundeelva der det reflekteres relativt like mengde sekvenser for de to artene.

Videre ble det detektert ål og trepigget stingsild for henholdsvis 13 og 10 av lokalitetene, og abbor for 7 lokaliteter. Røye og sørv ble detektert for henholdsvis 5 og 3 lokaliteter, og bekkerøye, pukkellaks, regnbueørret og canadarøye for én lokalitet. Særlig biodivers var Sjølingstadbekken, hvor det ble detektert atlantisk laks, brunørret, ål, trepigget stingsild, røye, pukkellaks, regnbueørret og canadarøye.

		Sjølingstadbekken	Budokka-bekken	Regevikbekken	Kigebekken	Tånevikbekken	Kleivsetelva	Lundeelva	Søgneelva	Fiskåbekken	Høyebekken (under analt)	Høyebekken	Prestebeekken	Justvikbekken	Timenebekken
	R1	862056	10	3	2250	3	2894	140050	347500	14392	385	4055	125718	105241	2980
Atlantisk laks	R2	814440	20	3	1467	1	820	130974	348676	10820	940	1505	113381	105796	1022
	R1	1491150	6648	6923	1994168	4062	4219968	1441335	846375	2404563	3381	4022230	1783822	1284046	6274510
Brunørret	R2	1229087	32566	26973	1574227	12701	3660109	1206250	758271	1974086	13462	3459610	1384733	1176921	6418494
	R1	264252	351	1129	840552	126	876273	448017	1173090	86006	305	363	1327448	2028006	
Ål	R2	206342	4142	6190	608072	378	833349	355765	923922	51371	2642	161	973341	1465108	
	R1	34		3239	405	6	447159	9	113091	115	1	115678	234781	5	5
Abbor	R2	51	1	6398	687	7	691459	6	212700	179		137811	457442	5	
	R1	478372	1	1	1310632	1975		2126570	1901386	748	2466	388	1129696	2138948	
Trepigget stingsild	R2	454078	4	2	1070967	11532		2209679	1643532	505	15418	233	921857	1775197	
	R1	2261			7			335	802	33		81	354	199	
Røye	R2	3195					2	494	1596	43		23	353	331	
	R1	22	546		1128281			61	55	41	61	15	23	382	
Sørv	R2	11	3658		985966	1		47	35	20		6	13	315	
	R1	6						2	15		3	73297	3	3	
Bekkerøye	R2	2			1				14	1	14	64138	2	1	
	R1	201			1			39	276	8		2	36	27	
Pukkellaks	R2	113						34	69	3			21	14	
	R1	656					1	21	59	4			16	18	1
Regnbueørret	R2	403						16	82	9			27	14	
	R1	138			1			19	50	5		89	29	27	
Canadarøye	R2	100			1			15	45	45		11	17	16	

Tabell 12: Resultater, bioinformatikk av sekvenseringsdata. Data fra R1 og R2 fra hver lokalitet har blitt sammenlignet mot en database satt sammen av mitokondrielle DNA-sekvenser fra aktuelle fiskearter. Sekvenser er lastet ned fra NCBI og HS-BLAST er brukt for sammenligning. Artstreff mot databasen med alignment-lengde på minimum 100 basepar og 99% identitet for mer enn 100 sekvenser blant både R1 og R2 er vurdert som påvisning av arten i prøven, skrevet i fet. Prøver fra lokaliteter ved treff med $0 < x < 100$, er inkludert i tabell, men ikke vurdert positive og er skrevet i kursiv.

Kvalitetstesting

Qubit-målinger ble gjort på replikatsammenslåtte prøver som senere ble innsendt til sekvensering. BGI kjører egen analysen for å kvalitetsteste rensset PCR-produkt, og oppgir krav om at prøver skal inneholde $>1\mu\text{g}$ DNA. Det var derfor ønskelig å kvalitetsteste prøvene før de ble sendt, i tilfelle konsentrasjone viste seg lave. Qubit-målingene gjort ved Universitetet i Agder varierte fra 12.5-47.5 $\mu\text{g/ml}$. Særlig avvik var Harkmarkvassdraget Valand og Vatne ved henholdsvis 12.5 og 20.7 $\mu\text{g/ml}$, samt Kvernbecken ved 19.9 $\mu\text{g/ml}$. Resultater kan leses i Tabell 13.

Tabell 13: Resultater for konsentrasjonsmålinger ved Qubit, der konsentrasjon er oppgitt ved $\mu\text{g/ml}$.

Bekk	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)
Sjølingstadbekken	38,5
Budokka-bekken	47,5
Regevikbekken	34,3
Jåbekken	25,4
Kigebekken	32,3
Harkmarkvassdraget, Valand	12,5
Harkmarkvassdraget, Vatne	20,7
Tånevikbekken	35,9
Trysbekken, Nedre	25,7
Trysbekken, Øvre	22,1
Kleivsetelva	29,4
Lundeelva	43,7
Søgneelva	37,4
Kvernbecken	19,9
Fiskåbekken	45,9
Høyebekken, under anadrom	42,7
Høyebekken, over anadrom	28,8
Prestebekken	40,9
Justvikbekken	42,6
Timenesbekken	41,5

BGI gjennomførte en egen QC-test som forklart i metodikk-kapittel, og resultater er listet i Tabell 14 under. Elleve prøver, ved $\text{DNA} > 1\mu\text{g}$, er merket kvalifiserte, mens tre prøver mellom 0.8-1.0 μg er beskrevet som risikable. Seks av prøvene kvalifiserte ikke til videre bibliotekskonstruksjon og sekvensering. BGI kommenterte videre at de ofte så sekvenseringssuksess for prøver med DNA-innhold på $0.8\mu\text{g} < M < 1.0\mu\text{g}$, og vi valgte å gå videre med de tre risikable prøvene i tillegg til elleve kvalifiserte.

Tabell 14: Resultater for QC-test, BGI, med konsentrasjon, volum, masse og kvalitetsvurdering. Prøvene vurdert som kvalifisert eller risikabel er tatt med videre i sekvensering.

Lokalitet	Konsentrasjon (ng/ μ l)	Volum (μ l)	Total Masse (μ g)	Testresultat
Skjølingstadbekken	27,7	37	1	Kvalifisert
Budokka-bekken	37,6	37	1,4	Kvalifisert
Regevikbekken	29,7	37	1,1	Kvalifisert
Jåbekken	19,6	37	0,7	Ikke kvalifisert
Kigebekken	26	37	1	Kvalifisert
Harkmarkvassdraget (Valand)	10,7	36	0,4	Ikke kvalifisert
Harkmarkvassdraget (Vatne)	14,1	36	0,5	Ikke kvalifisert
Tånevikbekken	33,5	37	1,2	Kvalifisert
Trysbekken (nedre)	18,4	37	0,7	Ikke kvalifisert
Trysbekken (øvre)	19,1	37	0,7	Ikke kvalifisert
Kleivsetelva	26	33	0,9	Risikabel
Lundeelva	28,6	37	1,1	Kvalifisert
Søgneelva	25,6	37	0,9	Risikabel
Kvernbecken	15,9	36	0,6	Ikke kvalifisert
Fiskåbekken	36,5	37	1,4	Kvalifisert
Høyebekken (under anadrom)	36,7	37	1,4	Kvalifisert
Høyebekken (over anadrom)	24,9	37	0,9	Risikabel
Prestebekken	28,3	37	1	Kvalifisert
Justvikbekken	35,4	37	1,3	Kvalifisert
Timenesbekken	35,3	37	1,3	Kvalifisert

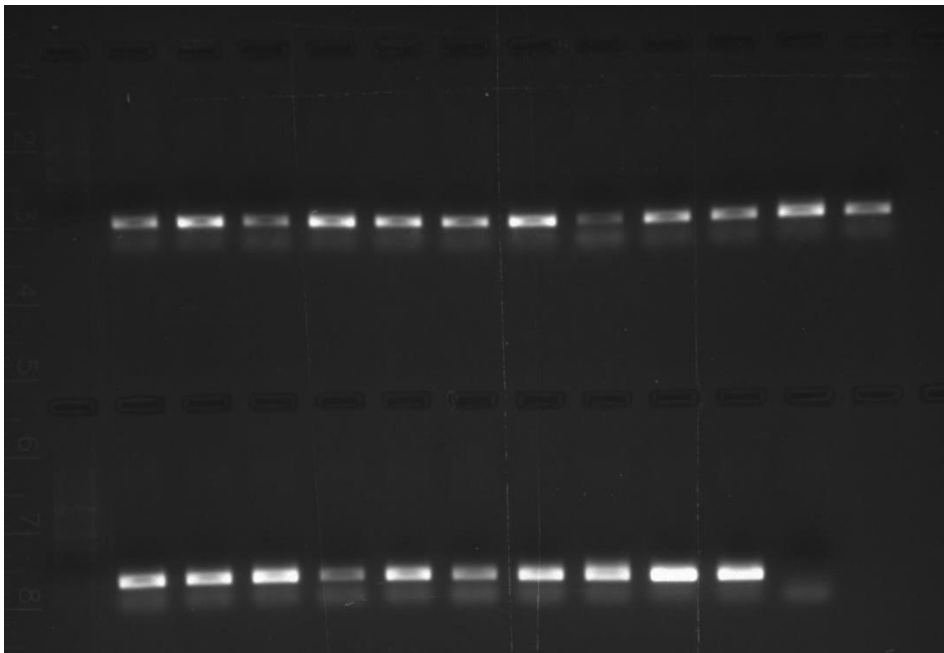
Gel elektroforese

Gel-elektroforese av alle prøver

Det ble kjørt en ekstra PCR-amplifisering tilsvarende førstnevnte for å gjøre en gelelektroforese av tilsvarende PCR-produkt innsendt til sekvensering. Alle 20 lokaliteters replikatsammenslåtte prøver ble amplifisert, sammen med to, fortynnede, positive kontroller. Temperaturprofil for PCR-analyse var som overskrevet, og oppskrift for reaksjonsmiks var som ved testkjøringer ved 20ul totalvolum. Strips med PCR-produkt lå på -18°C frem til rensing av PCR-produkt i forkant gel elektroforese.

Figur 6 viser resultat av gel elektroforese etter PCR-amplifisering av alle prøver med etterfulgt produkt-rensing, tilsvarende som for prøver sendt inn til sekvensering. Første brønn av hver rad er størrelsesstandard, og ellers er 20 prøver satt i rekkefølge f.o.m. annen brønn øverste rad til 9. brønn nederste rad. Fortynnede, positive kontroller er i 10. og 11. brønn, hhv. ørret og laks, og negativ kontroll er i 12. brønn nederste rad.

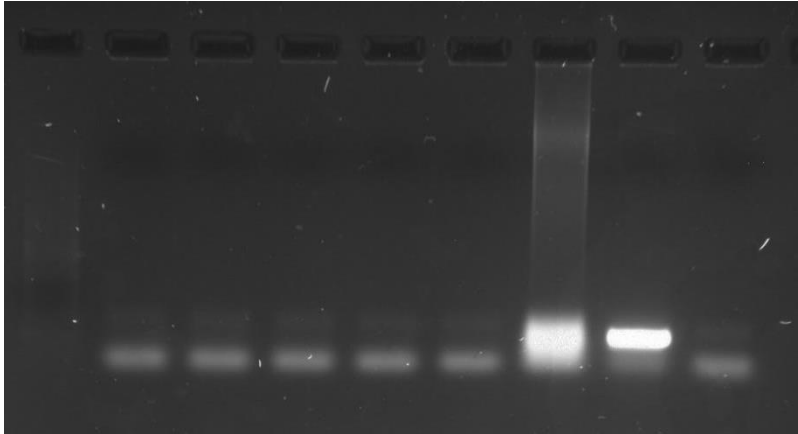
Størrelsesstandard oppnådde ikke forventet synlighet, men det sees at prøver og positive kontroller har oppnådd lik båndlengde, mens negativ kontroll avviker resten av prøvesett.



Figur 6: Oversikt over båndlengder etter PCR-amplifisering, rensing av PCR-produkt og gel elektroforese av alle tjue, replikatsammenslåtte prøver.

Test av Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix

Figur 7 viser resultat av gel-elektroforese i etterkant av PCR-amplifisering med Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix. Størrelsesstandard er i brønn 1, etterfulgt av 5 vannprøver. Ufortynnede, positive kontroller, henholdsvis ørret og laks, sees i brønn 7 og 8, før negativ kontroll i brønn 9. De fem vannprøvene var vist positive under tidligere qPCR-analyse, og negativ kontroll reflekterer her sammenlignbare bånd. Dette argumenterer for at PCR-amplifisering ikke har fungert.



Figur 7: Oversikt over båndlengder etter PCR-amplifisering med Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix.

Diskusjon

Hensikten med arbeidet utført gjennom denne masteroppgaven har vært å belyse hvorvidt tilstedeværelse av laks og ørret i kystvassdrag kan detekteres pålitelig gjennom molekylære analyser av eDNA. Dette har blitt undersøkt ved qPCR og metabarcoding av ekstrahert DNA fra vannprøver tatt i tjue vassdrag på Sørlandet. Tolv av vassdragene er undersøkt ved elektrofiske i 2019, og ved å inkludere disse kan resultater sammenlignes som en kontroll for om analysene av eDNA har fungert. Metabarcoding er utført som for å sees på i sammenheng med qPCR-resultater, så vel som forsøke å danne et bilde av det biologiske mangfoldet i vassdragene. Det ble ved qPCR detektert laks i 12 av de 20 vassdragene, og ørret i alle 20. Dette gir videre en likhet mellom qPCR- og elektrofiske-resultater på 12/12 vassdrag for ørret, og 10/12 vassdrag for laks. Metabarcoding ble utført for 14 kvalitetkvalifiserte prøver, der deteksjon av ørret og laks ble funnet i, henholdsvis, alle og 11 av de 14 vassdrag. Det ble i tillegg detektert en rekke andre fiskearter i vassdragene.

Artsdeteksjon med qPCR

Et mål ved studie var å undersøke om molekylærgenetiske analyser av eDNA kunne påvise laksefisk. Det ble hentet vannprøver i 20 vassdrag mellom Kristiansand og Mandal, der 12 var inkludert i tidligere studie ved elektrofiske i 2019. Dette ble først sjekket ved qPCR-amplifikasjon ved artsspesifikke primere og -prober for laks og ørret. Det ble i hver lokalitet hentet to vannprøver, som videre ble amplifisert ved qPCR i triplikater. Hver lokalitet ble dermed amplifisert som seks separate prøver, og Ct-verdier er listet i Tabell 15 og 16, Vedlegg. Videre har gjennomsnittet av vannprøvenes parallelle triplikater Ct-verdier blitt utregnet, se Tabell 7 og 9 for henholdsvis laks og ørret. Det ble påvist ørret i alle 20 vassdrag, inkludert de 12 undersøkte ved elektrofiske i 2019. Alle lokaliteter inkluderte påvisning av ørret i alle seks prøver, se Tabell 15. Det ble videre påvist laks i 12 av de 20 vassdragene undersøkt, derav 7 fra de 12 tidligere elektrofiskeundersøkt. For vassdragene som påviste tilstedeværelse gav 9 av lokalitene 6 positive prøver, mens det for de resterende tre vassdragene ble påvist laks i < 6 . For Kigebekken var påviste bare én av seks prøver laks, mens det for Kleivsetelva ble påvist laks i fem av seks prøver og det i Fiskåbekken ble påvist laks i fire av seks prøver. Det tenkes at disse reflekterer tilstedeværelse av mindre lakse-DNA enn ved lokaliteter der alle seks prøver påviste laks.

Artsdeteksjon med metabarcoding

Videre var det ønskelig å undersøke tilstedeværelsen av laks og ørret ved metabarcoding med fiskeuniverselle primere. eDNA ble også sekvensert med mål om å kunne si mer om hvilke ytterligere fiskearter som er til stede i vassdragene. Metabarcodingen ville på denne måten kunne hjelpe å danne et bedre bilde av det biologiske mangfoldet i de enkelte vassdragene. Det er vanskelig å sette en terskel for antall sekvenser som tilsier tilstedeværelse av art i lokalitet, men det er her valgt å vurdere prøver med 100 eller flere sekvenser som positive, se Tabell 12. Ørret ble funnet i alle 14 prøver som ble undersøkt ved metabarcoding, mens laks ble funnet i 11 av prøvene. Blant lokaliteter med påvist laks var det to av lokaliteter som ikke fikk påvist tilstedeværelse av laks ved qPCR, Timenesbekken og Høyebekken (over anadrom). Særlig overraskende var Høyebekken (over anadrom) ettersom det ikke forventes tilstedeværelse av laks over den anadrom grensen i elven. Hverken qPCR eller tradisjonelle kartleggingsmetoder har påvist laks her, og resultat må vurderes å kunne være en falsk positiv.

Andre arter som ble funnet er ål, abbor, trepigget stingsild, røye, sørv, bekkerøye, pukkellaks, regnbueørret og canadarøye. Det ble særlig detektert mye ål, som var til stede i alle lokaliteter sett bort fra Timenesbekken. Resultater for Sjølingstadbekken viste størst mangfold, og inkluderte deteksjon av atlantisk laks, brunørret, ål, trepigget stingsild, røye, pukkellaks, regnbueørret og canadarøye.

Prøver fra samme vassdrag ble opprinnelig sammenslått ettersom det var mistenkt lave DNA-konsentrasjoner, i tillegg til å redusere oppgavesett. Det var også tenkt at det skulle sekvenseres uten ekstra PCR-amplifikasjon av de rengjorte PCR-produktene, men det ble til slutt valgt å utføre PCR-amplifikasjon for å få tilstrekkelig DNA for sekvensering. I etterkant ser vi at å sammenslå prøver var unødvendig ettersom PCR-amplifikasjon betydelig øker DNA-innholdet av prøvene. Vi ser også at det ikke ville vært nødvendig å sekvensere i så store mengder. Sammenslåtte prøver er særlig ugunstig ettersom vi oppnådde overraskende resultater, særlig for antall sekvenser av laks i Høyebekken. Over anadrom var det forventet fravær av laks, blant annet begrunnet ved tidligere studie og resultater fra qPCR. Hvis prøver ikke var sammenslått ville det vært mulig å gå tilbake å se om begge replikater fra lokalitet hadde oppnådd sekvensresultater som reflekterte tilstedeværelse. Det er i løpet av prepasjoner av sekvenseringen mange steg det kan kontamineres eller skje feil. Blant annet kan PCR-amplifikasjon få feil, det kan kontamineres i løpet av de mange prosedyresteg eller rør- og eller nummerering kan feiltas. Når prøver er sammenslått vil det være umulig å ettersjekke om uforventede positive prøver skyldes feil eller ikke, ettersom replikater fra samme lokalitet ikke kan sammenlignes. For fremtidige studier anbefales sekvensering av flere replikater fra samme lokalitet. Ettersom det er kjørt to PCR-amplifikasjoner på prøvene i forkant sekvensering er det mulig terskel på treff for 100 sekvenser for vurdert tilstedeværelse er lavt, men det var usikkerhet knyttet til hvordan å sette terskel. . Fordi sekvenseringsdataene først var klare under to uker før innleveringsfristen ble analysert ved sterk tidsbegrensning. Det ble derfor kun inkludert 14 aktuelle arter i referansebiblioteket, og kun analysert 20 millioner sekvenser fra hver lokalitet.

Sammenlikning av qPCR og metabarcoding

Ettersom bare 14 av de 20 prøvene DNA-kvalifiserte for sekvensering, er det følgelig bare disse som vil kunne sammenlignes mellom de ulike metodikkene for påvisning av laksefisk ved bruk av molekylærgenetiske analyser av eDNA-prøvene. Alle undersøkte prøver påviste ørret, ved både qPCR-amplifikasjon og gjennom metabarcoding. For laks var det derimot noen forskjeller i resultatsett mellom de to metodikkene. Blant de 14 vassdragene ble det påvist laks i 9 av lokalitetene ved både qPCR og metabarcoding: Sjølingstadbekken, Kigebekken, Kleivsetelva, Lundeelva, Søgneelva, Fiskåbekken, Justvikbekken, Prestebekken og Høyebekken (under anadrom). Videre var det bare qPCR som påviste laks i Budokka-bekken, og bare metabarcoding som påviste laks i Timenesbekken og Høyebekken (over anadrom).

De to metodene for analyse av eDNA gav likevel en likhet på 14/14 for ørret og 11/14 for laks. Metabarcoding er absolutt et alternativ for qPCR-amplifikasjon i kartleggingsstudier ved bruk av eDNA. Man får mye ekstra informasjon som kan være nyttig, særlig i studier der kartlegging av lokalitets biodiversitet er interessant. Sekvenseringsdata av amplicon fra universelle primerpar kan analyseres mot svært artsrike referansebibliotek, og det kan forventes å kunne påvise alle fiskearter som er til stede. Det bør helst være en korrelasjon mellom den enkelte lokalitets Ct-verdier og sekvensresultater for henholdsvis laks og ørret.

Ettersom qPCR er kjørt ved to replikater fra hver lokalitet og replikater ble slått sammen i forkant metabarcoding er dette gjort ved gjennomsnittet av de to gjennomsnittsverdiene oppgitt for lokalitetene i Tabell 7 og 8. Videre er gjennomsnittet av R1 og R2 (se verdier, Tabell 12) for metabarcoding brukt. Verdier for antall sekvenser oppnådd ved metabarcoding er ikke volumkorrigert, og det sammenlignes derfor mellom rangering av de 14 lokalitene innad analyse-metode mot hverandre.

Ved fravær av deteksjon av laks i begge analyser var Tånevik rangert likt i forhold til andre vassdrag i begge resultatsett. Ellers var ingen vassdrag rangert helt likt mellom de to analysene, men for de fleste prøver som fikk lav Ct-verdi, ble det også oppnådd et høyt antall ssekvenser. Søgneelva fikk eksempel lavest Ct-verdi, og nest høyest antall sekvenser. Videre fikk Lundeelva nest-lavest Ct-verdi, og tredje høyeste antall sekvenser. Sjølingstad var lokalitet som fikk høyeste antall sekvenser, og fikk fjerde laveste Ct-verdi. Selv om det ikke er total sammenlignbar rangering mellom analysene, er det likevel en trend på hvilke lokaliteter som hadde sterk deteksjon.

For ørret var det 2 lokaliteter som rangerte helt likt mellom resultatsettene, der Timenesbekken var vassdraget som fikk både lavest Ct-verdi og høyest antall sekvenser. Lundeelva er rangerer som åttende laveste Ct-verdi, og åttende høyeste sekvensantall. Høyebekken (over anadrom) reflekterer tredje laveste Ct-verdi, og fjerde høyeste antall sekvenser, men ellers er det vanskeligere å se en trend for ørret enn det er for laks.

Sammenligning er altså gjort mellom verdier for Ct og sekvens-antall i fravær av korrigering. Dette vil ikke påvirke sammenligning ettersom analysene er gjort på samme prøver ved samme volumforskjeller. Et klart usikkerhetsmoment i denne sammenligningen er at prøver inkludert i metabarcoding er replikatsammenslått.

Sammenlikning av eDNA metodikk og elektrofiske-resultater

Et mål ved dette studie var å sammenligne resultater fra tradisjonell kartleggingsmetodikk med molekylærgenetiske analyser av eDNA for å undersøke om metodikk kan vurderes å ha fungert. Resultater fra både qPCR-amplifikasjon og metabarcoding påviste ørret i alle vassdrag undersøk, og altså i like stor grad som ved tradisjonell kartlegging med elektrofiske. Metabarcoding ble gjort på sammenslåtte prøver fra 14 av lokalitene, listet i Tabell 12.

Det ble påvist laks i tolv av de tjue vassdragene ved qPCR i dette studiet, inkludert 6 av de 12 som ble undersøkt ved elektrofiske i 2019. Elektrofiskestudiet påviste også laks i seks av vassdragene. Fem vassdrag fikk påvist laks ved både elektrofiske og analyser av eDNA: Trysbekken (nedre), Kleisetelva, Kvernbekken, Lundeelva og Søgneelva. Hver studie hadde ett ytterligere funn av laks, der bare elektrisk fiske påviste laks i Harkmarkvassdraget (Valand) og bare molekylær metodikk påviste laks i Kigebekken. For Kigebekken viste bare én av de seks qPCR-amplifikasjonene tilstedeværelse av laks, og ved metabarcoding ble detektert langt færre sekvenser i Kigebekken enn ved, eksempelvis, Sjølingstadbekken og Søgneelva. Det kan derfor tenkes at laks her er sjeldnere. Ettersom elektrofiske undersøker et bekkestrek på 30 meter kan få individ, eller eventuelt individer et stykke oppstrøms fra studiested argumentere forskjeller i resultater. Da vannprøver ble tatt i Harkmarkvassdraget (Valand) kommentert en lokalkjent beboer at vassdrag visuelt hadde opplevdes svært gromsete grunnet utgraving og utbygging av nye E39.

Det ble med andre ord påvist tilstedeværelse av ørret i alle undersøkte vassdrag ved molekylærgenetisk analyse av eDNA ved både qPCR og metabarcoding, og ved elektrofiskestudie i 2019. Dette er et betydelig funn som tilsier at kartlegging av laksefisk i kystvassdrag på Sørlandet kan gjøres ved analyser av vannprøver. Slike analyser er mer kostnads- og arbeidseffektive enn tradisjonelle metodikker for kartlegging, i tillegg til at henting vannprøver vil være mer skånsomt for både fisk og prøvetaker. Videre kreves det mindre opplæring ved eDNA-analyser enn ved tradisjonelle metoder. I flere tilfeller er også tradisjonell kartlegging upraktisk grunnet utilgjengelighet eller ugunstig terreng, og vannprøvetakning vil da inkludere store fordeler.

Det er likevel verdier ved tradisjonelle kartleggingsmetoder som analyse av eDNA ikke innehar enda, særlig knyttet til kvantitetsestimering. Både antall sekvenser ved metabarcoding og Ct-verdier ved qPCR-amplifikasjon kan kunne fortelle noe om mengden DNA fra gjeldende art som var til stede i miljøprøve før analyser, men det er likevel vanskelig å si noe sikkert om artens faktisk tetthet i miljøet. Det er ved, eksempelvis, elektrofiske et tydelig antall fisk på en målt størrelse og registrert kjønn som er påvist. Ved eDNA-analyse kan det være vanskelig å trekke konklusjoner utover mengden av relevant DNA i prøve. Selv ved stor utvikling av eDNA metabarkoding, er det flere potensielle begrensninger for ren bruk av molekylære metoder for å kvantitativt overvåke biodiversitet (Ushio et al., 2018b). Det er stilt spørsmål til om mengden eDNA er en fungerende indeks på biomassen av makroorganismer til stede i miljøet prøvene er hentet, selv ved flere studier som rapporterer positiv korrelasjon (Barnes & Turner, 2015; Klobucar et al., 2017; Stoeckle et al., 2017; Takahara et al., 2012; Yamamoto et al., 2016). Selv om mengden eDNA er en indeks for biomasse, er det ikke sikkert antallet sekvens-reads hentet ved HTS er en indeks for mengden eDNA. Delvis grunnet problemer ved molekylære analyser i under studiet, som PCR-inhibitorer (Schrader et al., 2012), og den faktiske mengden eDNA i et miljø kan derfor ikke estimeres ved en ren eDNA, og molekylæranalytisk, tilnærming.

Videre har det blitt funnet ørret ved andre elektrofiske-undersøkelser enn det beskrevne fra 2019 i de ytterligere åtte vassdragene inkludert her. Det er også undersøkt for laks ved elektrofiske i Sjølingstadbekken, Trysbekken (øvre), og både under og over anadrom grense i Høyebekken. Det ble da detektert laks i Sjølingstadbekken og Høyebekken (under anadrom). I tillegg er det observert laks i Justvikbekken (Personlig kommunikasjon, Tormod Haraldstad). Ved å inkludere disse påvisninger finner vi en likhet i deteksjon av artene i de tjue vassdragene ved 20/20 for ørret, og 13/15 for ørret.

Tidligere studie, ved elektrisk fiske, ble gjort i månedene september og oktober, 2019, mens i dette studie ble eDNA hentet ved vannprøver i juli og august, 2020. Med andre ord ble datainnsamling både gjort over ulike år, og gjennom ulike måneder. Dette kan naturligvis påvirke tilstedeværelsen av laks i prøvesettet, ettersom sensommeren og høstmånedene gjerne reflekterer tilbakevendende laks til elver og vassdrag. Laksen begynner å vandre opp vassdrag allerede i mai, men særlig i bekker med få individer vil det et par måneder forskjell kunne reflektere påvirkning av påvisningsmuligheter. Videre vil studier i ulike år bidra med ytterligere usikkerhet, ettersom det kan være betydelig forskjeller i vandringsesong grunnet temperatur og vær, og nyintroduserte antropologiske faktorer og/eller endringer i vannkjemi mellom årene. Atkinson et al. (2018) sammenlignet molekylære analyser, inkludert eDNA-prøvetakning, med elektrofiske og gjorde da begge undersøkelser samme dagen. Dette vil være fordelaktig ved eventuelle fremtidige metodikksammenligninger for å redusere ulikheter

og risiko for sesongbaserte forskjeller. Det vil da være kritisk å reflektere rundt vannprøvetakning og elektrofiske i sammenheng, inkludert tema som rekkefølge for de to metodikkene, sterilisering av utstyr og klær brukt i annen elv tidligere. Rene elektrofiskestudier er ikke like sensitive for kontaminering ved eDNA fra tidligere lokaliteter. Er det funnet stor andel laks i ett vassdrag ved elektrofiske, er det viktig å reflektere rundt kontamineringsrisiko ved, eksempelvis, støvler før man tar miljøprøver i neste vassdrag. Utstyr bør derfor behandles ved klorin etter bruk, og før det benyttes i nytt vassdrag.

Ved metabarcoding ble videre detektert en rekke fiskearter i tillegg til atlantisk laks og brunørret: ål, abbor, trepigget stingsild, røye, sørv, bekkerøye, pukkellaks, regnbueørret og canadarøye. Det er gjort observasjoner av bekkerøye, ål, trepigget stingsild, nipigget stingsild, abbor og sørv i noen av vassdragene ved elektrofiske-undersøkelse. (Personlig kommunikasjon, Tormod Harraldstad). Det er med andre detektert ål, abbor, trepigget stingsild, bekkerøye og sørv ved både metabarcoding av eDNA fra vannprøver av vassdragene, i tillegg til ved elektrofiske. Det er noe usikkerhet rundt hvilke vassdrag fiskeartene ble funnet ved med elektrofiske, og derfor en videre usikkerhet om artene er funnet i samme vassdrag med de to metodikkene.

Begrensningene ved eDNA metodikk sammenliknet med el-fiske er særlig knyttet til kvantitetsestimering. Både antall sekvenser ved metabarcoding og Ct-verdier ved qPCR-amplifikasjon kan kunne fortelle noe om mengden DNA fra gjeldende art som var til stede i miljøprøve før analyser, men det er likevel vanskelig å si noe sikkert om artens faktiske tetthet i miljøet. Det er ved, eksempelvis, elektrofiske et tydelig antall fisk på en målt størrelse og registrert kjønn som er påvist. Ved eDNA-analyse kan det være vanskelig å trekke konklusjoner utover mengden av relevant DNA i prøve. Likevel er det her funnet at man ved analyser av eDNA kan påvise tilstedeværelse av fisk i like stor grad som ved tradisjonelle kartleggingsmetoder. Dette introduserer kostnadseffektiv og tilgjengelig kunnskap om hvilke vassdrag det vil være interessant å satse arbeidskraft ved tradisjonelle overvåkningsmetoder på.

Kvantifisering av tetthet gjennom eDNA

En qPCR-analyse gir gode indikasjoner på om en arts DNA er til stede eller ikke i prøven, men det kan være verre å ta noen kvantitative beslutninger for prøvene. Ct-verdien reflekterer når prøven oppnådde nok mål-produkt for fluoresens-registrering, og indikerer derfor hvor mye målsekvens prøven hadde før amplifisering startet. Det er derfor strengt talt mulig å sammenligne Ct-verdier på kryss av lokaliteter, men det er flere grunner for at man bør være forsiktig med dette. Det er mange faktorer som spiller inn på mengden DNA til stede i prøven utover biomasse av arten det finnes i gjeldende vassdrag. Eksempelvis kan det være mer PCR-hemmere i én prøve enn i en annen, og sammenligning av Ct-verdier på tvers av lokaliteter eller prøver er derfor skummelt. Amplifisering kan også vise ulik effektivitet i to uavhengige kjøringar av andre årsaker, blant annet ulik kvalitet i reaksjonsmiks. Vannføring, vanntemperatur og UV-stråling er eksempler på slike faktorer. I et vassdrag der laks er til stede, men for eksempel i svært små mengder eller ved sjeldnere intensitet, vil stor vannføring redusere sjansen for at vannprøver er tatt til riktig tid. På lik måte vil stor vannføring føre til at miljøprøver tatt kan være vann fra tilkoblet vassdrag oppstrøms i større grad enn ved lavere vannføring. Generelt vil stor vannføring bidra med større tilfeldigheter knyttet til om man får et resultat som faktisk reflekterer området i vassdraget med faktisk studerer. Varmer vanntemperaturer og mye UV-stråling vil kunne påvirke mengden og kvaliteten av biologisk

materiale og DNA til stede i miljøet. Både høy temperatur og sterk UV-stråling vil bidra med raskere nedbrytning av DNA som befinner seg fritt i vannmassene. Det ble tatt målinger av vanntemperatur og -konduktivitet og notert vær, ved hver lokalitet. Det ble også notert vannføring ved NVE's seneste oppdatering for Søgneelva ved hvert tidspunkt for vannprøvetakning. Målinger, og noteringer, har ikke blitt analysert i sammenheng DNA-konsentrasjoner og qPCR-resultater. pH ble ikke målt ettersom alle vassdrag i lokalitetssett uttrykker god pH i sommermånedene, der kritiske perioder oppstår ved høst- og vårflokker utenfor perioden det ble tatt miljøprøver. For å måle pH-intensitet over lengre perioder kreves det avansert kalibrert utstyr. Et noe lavt pH-nivå er heller ikke på egenhånd veldig farlig for laksen, men når det sees i sammenheng med aluminium i sin labile form blir det kritisk. Undersøkelse av mengden labilt aluminium krever vannprøve-analyse på laboratorier (Personlig kommunikasjon, Tormod Harraldstad).

Artsammensetning innad i et vassdrag

Det er for øvrig mulig å sammenligne Ct-verdi oppnådd for ørret og laks innad samme prøve mot hverandre, ved at en lavere Ct-verdi vil reflektere tilstedeværelse av mer DNA. Faktorer som gjør sammenligning av Ct-verdier på kryss av lokaliteter, og strenge kvantitetskonklusjoner vanskelig, gjelder ikke i like stor grad ved sammenligning innad den enkelte prøve. En differanse i Ct-verdi på 1.0 reflekterer en fordobling/halvering av DNA-mengde i prøven. Dette kan fortelle noe om forholdet mellom artene i vassdraget. Også her er det likevel faktorer som spiller inn, flere av dem inkluderende tilfeldigheter. I rennende vann, med mer eller mindre føring, og sensitive molekylære metoder, kan en stor laks som nylig svømte forbi området for vannprøvetakning gi større utslag i miljøprøven enn flere ørret fastboende like understrøms eller lenger oppe i vassdraget. Denne laksen kan videre være raskt innom vassdraget før den snur, og svømmer kystveis. Det er derfor vanskelig å trekke noen sikre konklusjoner annet enn om arten har vært til stede eller ikke, i nærheten eller oppstrøms fra der vannprøve er hentet, og innen et relativt tidsrom. Dette er grunner for at eDNA med medfølgende molekylære analyser ikke nødvendigvis kan ta over totalt for tradisjonelle verktøy som elektrisk fiske og direkte observasjoner av taksonspesifikke eksperter. Ved å sammenligne gjennomsnittlige Ct-verdier (Tabell 7 og 8, for henholdsvis laks og ørret) innad vassdrag ser man flest vassdrag med lavere Ct-verdier for ørret, men også ett vassdrag med lavere Ct-verdier for laks. Noen vassdrag resulterte også i Ct-verdier så like for ørret og laks at det er vanskelig å kommentere forholdet sikkert. Det er her brukt Ct-verdier som ikke har blitt volumkorrigeret og det er derfor mindre relevant å sammenligne Ct-verdier på kryss av replikater, også innad lokalitet.

Budokka-bekken, Kleivsetelva og Fiskåbekken er av vassdragene som detekterte ørret ved lavere Ct-verdi enn laks. Eksempelvis ble det i Fiskåbekken detektert ørret ved Ct-verdi 32.26 og 32.18 for henholdsvis Replikat 1 og 2, og laks ved Ct-verdi 38.72 og 38.96 for henholdsvis Replikat 1 og 2. Sjølingstadbekken og Høyebekken (under anadrom) er vassdrag som reflekterer likere Ct-verdier mellom de to artene. Prøvene fra Sjølingstad oppdaget ørret ved Ct-verdier på 33.47 og 33.86 for henholdsvis Replikat 1 og 2, men laks ble oppdaget ved Ct-verdier på 34.64 og 32.94. Her er det vanskeligere å si noe om forskjell i biomasse mellom de to artene ettersom Replikat 1 reflekterer mer ørret og Replikat 2 reflekterer mer laks. Søgneelva er det eneste vassdraget der Ct-verdier reflekterer større biomasse av laks enn ørret. Her ble ørret oppdaget ved Ct-verdier 34.49 og 34.77 for henholdsvis Replikat 1 og 2,

og laks ved Ct-verdier 32.16 og 32.82 for laks, for henholdsvis Replikat 1 og 2. For Prestebekken var Ct-verdier vanskeligere å kommentere ettersom prøvene detekterte ørret ved Ct-verdier 33.23 og 33.36, og laks ved 39.05 og 33.02, henholdsvis Replikat 1 og 2. Det er vanskelig å konkludere artsforhold her ettersom det ved Replikat 2 ble oppnådd relativt like gjennomsnittsverdier, mens Replikat 1 reflekterer en Ct-forskjell på 5.69.

Ytterligere faktorer som kan ha påvirket artsdeteksjon ved eDNA-analyser

Volumkorrigering

Videre vil faktorer som vannvolum filtrert og bufferløsning hentet fra filterkapsel påvirke endelig DNA-mengde i prøvene. Hvor mye vann som er filtrert og hvor mye bufferløsning det ble hentet ut av filterkapsel kan ha store betydninger for mengden eDNA i den endelige prøven med isolert DNA. For to prøver tatt ved samme forutsetning vil et lavere volum sannsynlig føre til høyere Ct-verdier ettersom prøven vil ha mindre mengde DNA ved at mindre volum er filtrert. Lokalteter med få fisk vil gjerne også kunne reflekteres ved at bare en eller to av triplikatene er positive. For prøver med svært lite eDNA, eksempelvis grunnet få fisk vil lavt volum kunne utgjøre en stor forskjell. Dette har blitt forsøkt korrigert ved volumforhold for hver prøve mot en referanseprøve, og korrigerte verdier er beskrevet i Tabell 9 og 10. Spekulering av verdier fra et korrigert resultatsett skal derfor gjøres med forsiktighet, og det er klare usikkerhetsmomenter involvert. Blant annet vil det ikke være mulig å korrigere en prøve med for lav DNA-mengde til at påvisning av tilstedeværelse har vært mulig. Et fravær multiplisert ved korrigeringsverdi fremdeles reflekterer fravær. Det vil likevel vurderes trygt å anta at Timenesbekken (Replikat 2) har tilstedeværelse av mer ørret-DNA enn Jåbekken (Replikat 1) ved Ct-verdier på henholdsvis 29.30 og 35.47. På samme måte tenkes Søgneelva (Replikat 1) å ha mer laks til stede enn Kleivsetelva (Replikat 2) ved Ct-verdier på henholdsvis 31.22 og 39.48. Ettersom en Ct-forskjell på 1.0 ytrer en originalmengde på det dobbelt, vil det også vurderes trygt å anta at det er mer laks i Sjølingstadbekken (Replikat 2) enn i Budokka-bekken (Replikat 2) ved Ct-verdier på henholdsvis 32.73 og 36.20.

For ukorrigerte resultater er høyeste og laveste Ct-verdi for prøver med påvist laks henholdsvis 40.23 og 31.83, og for høyeste og laveste Ct-verdi ved triplikatgjennomsnitt er 39.33 og 31.98. Volumkorrigerte resultater er utregnet for de 23 replikatene som har påvist tilstedeværelse av laks ved deres triplikatgjennomsnitt, og volumkorrigerte Ct-verdi er 39.48 og 31.22. En interessant observasjon fra disse verdiene er at det er samme lokalitetreplikat som har gitt høyeste og laveste verdi henholdsvis før og etter korrigering. Det er likevel stor endring i hvilke replikater som gir høyere/lavere Ct-verdier fra ikke-korrigert til korrigerte verdier, der for eksempel Prestebekken (Replikat 1) har nest høyest verdi (22/23) av de 23 prøvene ved Ct=39.05 for korrigering, og nummer 15/23 ved Ct=37.21 etter volumkorrigering. Gjennomsnittet for alle positive prøver er 35.51 før korrigering, og 34.83 etter korrigering.

For ørret er høyeste og laveste Ct-verdi før korrigering 39.94 og 29.96, og høyeste og laveste Ct-verdi ved triplikatgjennomsnitt 38.65 og 30.03, der to replikater oppnådde Ct-verdi på 30.03. For volumkorrigerte gjennomsnittsverdier var høyeste og laveste Ct-verdi 35.47 og 29.30. Høyeste og nesthøyeste Ct-verdi bytte plass fra ikke-korrigert til korrigert verdi. Timenesbekken (Replikat 2) var en av elvene som før korrigering fikk Ct=30.03, og som oppnådde laveste korrigerte verdi på 29.30. Annen prøve ved 30.03 før korrigering oppnådde nestlavest Ct-verdi etter korrigering, og den tredje laveste verdien før korrigering oppnådde

tredje laveste verdi etter korrigering. Ellers var det også her endringer i rekkefølge lavest-høyest ved korrigering der blant annet Trysbekken (nedre – Replikat 1) var 28/40 før korrigering, og 18/40 etter korrigering. Det kan videre drøftes om større volum filtrert ville ha påvirket påvisning både ved lavere Ct-verdier og nye vassdrag med lakse-påvisning.

Kvalitet av ekstrahert DNA

Resultatene oppnådd ved Nanodrop-spektrofotometri indikerer at det er DNA i noen av de negative kontrollene, Trysbekken (øvre), Regevikbekken og Høyebekken (over anadrom) ved henholdsvis 36.8, 10.9 og 7.1 ng/μl. Samtlige negative kontroller, inkludert disse, viste likevel negative qPCR-amplifiseringer. Nanodrop-resultatene indikerer derfor at det finnes andre ting i prøvene som gav absorbans. NanoDrop-målinger for vannprøver varierte i DNA-konsentrasjon fra 5.6-127 ng/μl, mens svært få prøver oppnådde A260/A230- og A260/A280-forhold innenfor forventet normal. For rene DNA-produkt forventes et A260/A280-forhold på ~1.8, mens A260/A230 helst skal ligge et sted mellom 2.0-2.2.

Ved Nanodrop resulterte åtte av de 40 vannprøvene et A260/A280-forhold ved <0.15 fra forventete 1.8. Videre var det totalt 19 prøver som fikk et forhold som avviket mindre enn 0.2. Det var syv prøver som avviket mer enn 0.3. Et lavt A260/A280-forhold kan tyde på gjenværende reagens fra ekstraksjonsprotokoll, eller at nukleinsyrekonsentrasjonen er veldig lav, <10 ng/μl (Thermo Fisher Scientific, 2015). For de 39 prøvene som var lavere enn 1.8 viste bare tre av dem nukleinsyrekonsentrasjon <10ng/μl, og det ser ikke ut til å være en korrelasjon mellom nedgang i A260/A280-forhold mot nukleinsyrekonsentrasjon. Det kan derfor mistenkes en kontaminering av protein eller reagens som har blitt med fra ekstraksjonsprotokoll. Bare én prøve fikk et forhold på mer enn 1.8.

Ingen av prøvene fikk et A260/A230-forhold mellom, eller overskredet 2.0-2.2, og prøven nærmest normalverdi oppnådde ikke høyere verdi enn 1.54. Videre var 28 prøver lavere enn 1.0, og bare fire prøver oversteg 1.1. Sterke absorpsjoner ved 230nm, og videre lavt A260/A230-forhold, kan tyde på tilstedeværelse av humussyre (Thermo Fisher Scientific, 2011). Det er kjent at humussyre gjerne blir med gjennom ekstraksjon av vannprøver. Humussyre, ekstrahert sammen med DNA fra miljøprøver, virker som sterke hemmere for enzymer som Taq Polymerase brukt i PCR reaksjonsmiks for DNA-amplifisering (Matheson et al., 2014). Dette reflekterer en åpenbar bias-risiko innen eDNA-studier, og selv om den særlig er representert i jordbaserte miljøprøver kan den også være til stede i vannprøver der sedimentpartikler har medfulgt gjennom filtrering (McKee et al., 2015b; Sigsgaard et al., 2015).

Ved å studere Nanodrop-resultater strengt kan det se ut til at prøver har fått med seg reagens fra DNA-ekstraksjon, og/eller eventuelt karbohydrat, gjennom ekstraksjonsprotokoll. Thermo Fisher kommenterer at selv om renhets-forhold er en viktig indikator for prøvers kvalitet, er den beste indikatoren for DNA-kvalitet prøvens funksjonalitet i videre relevante applikasjoner. Det nevnes også at det på samme måte vil kunne være tilfeller der renhets-forhold er innenfor normalen, men at det likevel er problemer med prøven. Vi ser for resultater i videre qPCR-analyser at ingen negative kontroller har oppnådd positiv qPCR-amplifisering, og resultater fra faktisk vannprøver gir ingen grunn til å mistenke dårlige DNA-produkt. Det kan, med totalsikkerhet, likevel ikke avskrives at både qPCR-positive prøver

kunne oppnådd lavere Ct-verdier, så vel som at negative prøver kunne oppnådd positivitet, om disse potensielt svake DNA-produktene hadde fått renhetsverdier innenfor normalen.

BGI krevde en DNA-mengde på >1µg, og ved Qubit-målinger gjennomført ved UiA ble det oppnådd konsentrasjoner som varierte fra 12.5-47.5 µg/ml, Tabell 13. Det ble likevel valgt å sende samtlige prøver inn til sekvenseringsvurdering hos BGI, der 14 prøver ble kvalitetskvalifiserte for videre sekvenseringspreparasjoner.

Antall PCR sykluser i qPCR

Det ble kjørt qPCR med lakse- og ørretprimere ved 60 sykluser, selv om det i andre studier er oppnådd resultater ved 45 (Matejusová et al., 2008). Dette ble argumentert med at lave DNA-konsentrasjoner i miljø-prøver ville kunne forsinke fluorescenssignal til en senere Ct-verdi, svakere kurvestruktur og i verste fall føre til falske negativ resultater. I etterkant observeres det ingen Ct-verdier etter 45 sykluser, og det kan derfor tenkes at samme resultater kunne blitt oppnådd ved kjøring på 45 sykluser. Ved å ha de ekstra 15 syklusene får man likevel mer grunnlag for kurve-analyse på prøver med høy Ct-verdi. Bare én prøve oversteg Ct >40, men det var flere prøver ved Ct=35-40, og disse kan tenkes vanskeligere å kurve-analysere hvis det ble amplifisert på 45 sykluser.

Sammenslåing av replikater

Ved fortykning til laveste konsentrasjon oppnår man lik konsentrasjon for hele prøvesettet, og dette vil i mange tilfeller være fordelaktig. Det ble likevel valgt å ikke fortynne replikatsammenslåtte prøver til laveste konsentrasjon i prøvesett, ettersom eDNA er kjent for å inneholde svært lave DNA-konsentrasjoner. Prøvene skulle også sendes til sekvensering etter PCR-amplifisering, og BGIs krav om DNA-innhold på >1µg argumenterte også for å ikke fortynne prøver mer enn nødvendig. Et annet argument var at tilstedeværelse av ørret og laks var sjekket ved qPCR i forkant dette, og tre av lokalitetene gav negativ(e) prøver i tillegg til positiv(e). Det var også flere prøver som viste Ct-verdier mellom 35-40, og eventuelle fortykninger kunne i verste fall ha gjort gjeldende prøver falske negative nedstrøms fortykning. Det er også flere arter, sett bort fra ørret og laks, som tenkes svært sjeldne i lokalitetene i oppgavesettet, og ved eDNAs lave konsentrasjoner ble det dømt fordelsaktig og spare på konsentrasjonene. Prøvers DNA-konsentrasjon forteller heller ikke noe om i hvor stor grad det representerer fiskearter, og selv om ørret og laks ble påvist ved qPCR-amplifikasjon ble det representert som argumenterende i bestemmelsen.

Testing av Phusion Hot Start 2 High Fidelity Master Mix

Gel-elektroforese av PCR-produkt etter amplifisering med Phusion Hot Start 2 High Fidelity Master Mix ytret sammenlignbar båndlengde for positive prøver og negativ kontroll, og mastermiksen ble derfor valgt bort til fordel for TaqMan Environmental Master Mix. Årsaken for testing av High Fidelity er at den inkluderer proofreading-aktivitet som videre gir svært få feilinkorporeringer i DNA-syntesen. Thermo Fisher Scientific oppgir selv en 50-gangers reduksjon i feil under amplifisering ved bruk av Phusion DNA polymerase fra bruk av Taq polymerase. Det er likevel svært få feilinkorporeringer ved bruk av AmpliTaq Gold også, som er enzymet inkludert i TaqMan Environmental Master Mix.

Innsamling av vannprøver

Ved første lokalitet ble det ikke brukt engangsbeger- og trakt, og ble merket stor ugunstighet rundt vannprøvetakning og -overfør til filtreringspose uten trakt. Det var vanskelig å treffe

slangen ved vannoverføring, og det ble oppnådd store mengder luft i filtreringspose. I studier som inkluderer vannprøve-filtrering med Sterivex filterkapsler vil det absolutt anbefales å bruke trakt for å både gjøre overføringen til filtreringspose enklere, og for å redusere tilførsel av luft. Videre anbefales også bruk av engangsstyr, inkludert kopper, ettersom kontaminering mellom vassdrag representerer en relevant risiko som enkelt reduseres betydelig ved engangsbruk. Tilstrekkelig sterilisering krever arbeidskraft, og representerer samtidig en usikkerhet.

I siste steg av filtreringsprosedyre, rett i forkant tilsetning av Buffer ATL, ble det resterende vannet i kapsel filtrert gjennom ved kanyler og manuell utpress. Dette opplevdes, særlig ved prøver fra mindre partikkelrent vann, vanskelig å fullføre totalt til siste dråpe. Spens et al. (2016) kommenterer at bruk av hånd-heldte kanyler på filterkapsler kan føre til en arbeidskrevende flaskehals-situasjon ved håndtering av mange prøver, og at det kan være gunstig å bytte til batteridrevet pumpe fra Sterivex™.

Filtreringseffektivitet

Filtreringstid og –effektivitet ble diskutert underveis feltarbeid, ettersom ulike lokaliteter uttrykket store forskjeller. Det ble likevel observert en generell trend der mesteparten av volum ble filtrert i løpet av de første par minuttene. Det ble drøftet at det ved svært lav filtreringshastighet sier lite om filtreringseffektivitet, og at det ikke bør gå for lenge med tynt føringsnivå. Det ble derfor bestemt at filtrering i alle fall ikke burde overgå 30 minutter, og at det ikke nødvendigvis skulle gå like lenge hver gang. Det ble videre bestemt at hastighet for filtrering, og observasjon av tid før oppnådd visse volum skulle avklare når filtrering avsluttes. Ved flere av lokalitetene ble det oppnådd lite volum for filtrering av faktisk vannprøver, mens det ved negative kontroller ble oppnådd filtrert volum tilsvarende det tilførte vannvolum. Lav filtreringseffektivitet kom gjerne i sammenheng med mer luftoppsamling i filtreringspose. En lokal beboer ved Harkmarkvassdraget (Valand), en av bekkene som reflekterte lav filtrering, fortalte at bekken hadde blitt opplevd gromsete. Flere av de andre lokalitetene ved svært lav filtreringseffektivitet var også i nærhet av større konstruksjonsarbeid og/eller veiutbygging. Det tenkes at mye partikler i vannet vil kunne tette filtre, og videre reflektere lav filtreringshastighet. Det ble ved lokaliteter med lav filtereffektivitet også observert at det virket å dannes mer kondens i kolbe. I vann med mye alger eller høy turbiditet, kan filter-porer på 0.2µm være problematisk ettersom de kan gå tett og videre føre til et mindre vannvolum filtrert, og er foreslått løst ved å pre-filtrere eller å øke antallet filterreplikater (Turner et al., 2014; Robson et al., 2016). Det tenkes videre at det ved høy turbiditet og tette filtre vil kunne påvirke mengden DNA som blir med, og at det kan føre til økte mengden uønsket humussyre med videre i analyser.

DNA ekstraksjon

Ved første spinnkolonne-sentrifugering ved DNA-ekstraksjon var prøvene svært varierte i mengde bufferløsning hentet fra filterkapsler. De fleste prøver overgikk 600µl etter tilførsel av Buffer AL og EtOH, og overføring fra Eppendorfrør til spinnkolonner ble derfor gjort over flere omganger. De ulike prøvene reflekterte ulikt antall runder, og ulikt volum for siste runde. Dette gjorde protokoll knotete og tidkrevende ettersom siste pipettering fra hver prøve måtte tilpasses. Mer dramatisk, utgjorde volumvariasjonen en videre vektforskjell stor nok til å fremdrive ubalanse under sentrifugering. Det bør derfor reflekteres rundt ved oppsett av prøver slik at prøver av lignende volum kan sentrifugeres på best balansert måte. Det vil også fungere tidssparende å ha flere pipetter og/eller å planlegge pipettering, slik at endring av

pipetteringsvolum skjer så sjeldent som mulig. Det er alltid et poeng å korte ned tid ved laboratorie-prosedyrer så kjemikalier og prøvemateriale spares for oppbevaring i romtemperatur.

Det finnes alternative metodikker for eDNA-ekstraksjon fra filterkapsler som kan være aktuelle i lignende studier. Filterkapsel kan åpnes før eDNA ekstraheres direkte fra filter (Cruaud et al., 2017), og Qiagen har et kit (DNeasy® PowerWater® Sterivex™ Kit) for ekstraksjon fra filterkapsler der DNA-isolering skjer direkte i kapselen. Ved ekstraksjon i filterkapselen vil kontamineringsrisiko reduseres videre.

Konklusjon

Det ble her ønsket å undersøke om tilstedeværelse av laks og ørret kan kunne påvises ved molekylære analyser av eDNA ekstrahert fra vannprøver tatt i vassdrag på Sørlandskysten. Det ble ved qPCR-amplifikasjon med artsspesifikke primere og -prober påvist ørret i alle vassdrag som ble undersøkt. For laks ble det påvist tilstedeværelse i 12 av 20 vassdrag. Som kontroll ble vannprøver hentet i blant annet 12 vassdrag inkludert i et kartleggingsstudie ved elektrofiske i 2019. Av de 12 vassdragene undersøkt ved begge studier var det resultatlikhet ved 12/12 for ørret og 10/12 for laks. Dette kan vurderes svært likt, og videre kan det antas at metodikken ved analyse av eDNA har fungert. Ved metabarcoding ble det oppnådd en resultatslikhet ved 14/14 for ørret og 10/14 i forhold til qPCR, og det ble i tillegg påvist tilstedeværelse av en rekke andre arter. Arbeidet viser, i henhold til andre studier, at eDNA metodikk har et stort potensiale som kartleggings- og overvåkningsverktøy i akvatiske miljøer. Selv om eDNA for øyeblikket gir tilfredsstillende kvantitative bestandsmål, er det stort potensiale for bruk av denne metodikken innen kartlegging og overvåkning i akvatiske miljøer.

Vedlegg

Tabell 15: Samtlige Ct-verdier ved amplifisering med ørretprimer

Bekk	Kontroll(1)	Kontroll(2)	Kontroll(3)	Replikat 1 (1)	Replikat 1 (2)	Replikat 1 (3)	Replikat 2 (1)	Replikat 2 (2)	Replikat 2 (3)
Sjølingstadbekken	0	0	0	33,41	33,37	33,62	33,74	33,88	33,97
Budokka-bekken	0	0	0	30,36	30,31	30,39	29,96	30,08	30,05
Regevikbekken	0	0	0	32,89	32,53	32,96	32,4	32,49	32,47
Jåbekken	0	0	0	38,05	37,2	37,62	38,71	37,1	36,96
Kigebekken	0	0	0	31,78	31,79	31,67	30,75	30,67	30,59
Harkmarkvassdraget, Valand	0	0	0	35,87	36,05	36,18	38,63	37,97	39,34
Harkmarkvassdraget, Vatne	0	0	0	35,92	35,85	35,96	36,61	36,71	36,46
Tånevikbekken	0	0	0	32	32,08	31,87	31,97	32,39	32,26
Trysbekken	0	0	0	34,18	34,06	34,14	34,16	34,3	34,02
Trysbekken, øvre	0	0	0	33,43	33,55	33,3	33,54	33,54	33,37
Kleivsetelva	0	0	0	33,34	33,18	33,22	33,96	33,66	33,56
Lundeelva	0	0	0	31,98	31,87	31,81	33,01	32,87	33,06
Søgneelva	0	0	0	34,39	34,7	34,37	35,17	34,29	34,85
Kvernbekken	0	0	0	34,75	34,92	34,98	35,71	35,58	35,15
Fiskåbekken	0	0	0	32,32	32,16	32,3	32,1	32,13	32,3
Høyebekken	0	0	0	32,08	32,02	32,21	32,28	32,19	32,2
Høyebekken, over anadrom	0	0	0	31,38	31,35	31,23	31,42	31,22	31,51
Prestebekken	0	0	0	33,29	33,19	33,22	33,55	33,19	33,34
Justvikbekken	0	0	0	33,73	34,13	33,62	34,68	34,56	34,47
Timenesbekken	0	0	0	29,96	30,14	30,09	30,09	30,04	29,96

Tabell 16: Samtlige Ct-verdier ved amplifisering ved lakseprimer

Bekk	Kontroll(1)	Kontroll(2)	Kontroll(3)	Replikat 1(1)	Replikat 1(2)	Replikat 1(3)	Replikat 2(1)	Replikat 2(2)	Replikat 2(3)
Sjølingstadbekken	0	0	0	34,49	34,76	34,66	32,96	32,95	32,91
Budokka-bekken	0	0	0	38,15	35,21	34,95	35,66	37,68	34,87
Regevikbekken	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jåbekken	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kigebekken	0	0	0	0	0	0	0	0	38,97
Harkmarkvassdraget, Valand	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Harkmarkvassdraget, Vatne	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tånevikbekken	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trysbekken	0	0	0	36,87	34,65	35,19	34,4	35	34,62
Trysbekken, øvre	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kleivsetelva	0	0	0	36,01	38,38	36,57	39,98	0	38,67
Lundeelva	0	0	0	31,83	31,92	32,2	33,17	33,39	33,63
Søgneelva	0	0	0	32,21	32,41	31,86	32,55	33,15	32,75
Kvernbekken	0	0	0	36,71	36,54	36,36	36,84	36,72	38,13
Fiskåbekken	0	0	0	38,72	0	0	40,95	37,43	38,49
Høyebekken	0	0	0	32,48	32,87	33,12	32,83	32,72	32,69
Høyebekken, over anadrom	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Prestebekken	0	0	0	39,98	40,23	36,94	33,25	32,98	32,84
Justvikbekken	0	0	0	36,1	35,95	36,48	35,08	36,06	36,67
Timenesbekken	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Referanser

- Agilent Technologies. (2012). *Introduction to Quantitative PCR: Methods and Applications Guide*. Hentet fra https://www.agilent.com/cs/library/brochures/Brochure_Guide%20to%20QPCR_IN70200C.pdf
- Andersson, A. F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Backhed, F., Nyren, P., & Engstrand, L. (2008). Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One*, *3*(7), e2836. doi:10.1371/journal.pone.0002836
- Atkinson, S., Carlsson, J. E. L., Ball, B., Egan, D., Kelly-Quinn, M., Whelan, K., & Carlsson, J. (2018). A quantitative PCR-based environmental DNA assay for detecting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, *28*(5), 1238-1243. doi:10.1002/aqc.2931
- Baird, D. J., & Hajibabaei, M. (2012). Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology*, *21*(8), 2039-2044. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05519.x>
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2015). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, *17*(1), 1-17. doi:10.1007/s10592-015-0775-4
- Berg, O. K. (1985). The formation of non-anadromous populations of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Europe. *Journal of Fish Biology*, *27*(6), 805-815. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1985.tb03222.x>
- Bergman, P. S., Schumer, G., Blankenship, S., & Campbell, E. (2016). Detection of Adult Green Sturgeon Using Environmental DNA Analysis. *PLoS One*, *11*(4), e0153500. doi:10.1371/journal.pone.0153500
- Bjerknes, V., & Tjomslund, T. (2001). Flow and pH Modelling to Study the Effects of Liming in Regulated, Acid Salmon Rivers. *Water, Air, and Soil Pollution*, *130*(1), 1409-1414. doi:10.1023/A:1013984107710
- Boessenkool, S., Epp, L. S., Haile, J., Bellemain, E., Edwards, M., Coissac, E., . . . Brochmann, C. (2012). Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA. *Mol Ecol*, *21*(8), 1806-1815. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05306.x
- Bunce, M., Szulkin, M., Lerner, H. R., Barnes, I., Shapiro, B., Cooper, A., & Holdaway, R. N. (2005). Ancient DNA provides new insights into the evolutionary history of New Zealand's extinct giant eagle. *PLoS Biol*, *3*(1), e9. doi:10.1371/journal.pbio.0030009
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, *55*(4), 611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Chaput, G. (2012). Overview of the status of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the North Atlantic and trends in marine mortality. *ICES Journal of Marine Science*, *69*(9), 1538-1548. doi:10.1093/icesjms/fss013
- Chen, Y., Ye, W., Zhang, Y., & Xu, Y. (2015). High speed BLASTN: an accelerated MegaBLAST search tool. *Nucleic acids research*, *43*(16), 7762-7768. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv784>
- Chestnut, T., Anderson, C., Popa, R., Blaustein, A. R., Voytek, M., Olson, D. H., & Kirshtein, J. (2014). Heterogeneous occupancy and density estimates of the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in waters of North America. *PLoS One*, *9*(9), e106790. doi:10.1371/journal.pone.0106790
- Clair, T. A., Dennis, I. F., Amiro, P. G., & Cosby, B. J. (2004). Past and future chemistry changes in acidified Nova Scotian Atlantic salmon (*Salmo salar*) rivers: a dynamic modeling approach. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *61*(10), 1965-1975. doi:10.1139/f04-196
- Clair, T. A., & Hindar, A. (2005). Liming for the mitigation of acid rain effects in freshwaters: A review of recent results. *Environmental Reviews*, *13*(3), 91-128. doi:10.1139/a05-009
- Clusa, L., Ardura, A., Fernandez, S., Roca, A. A., & Garcia-Vazquez, E. (2017). An extremely sensitive nested PCR-RFLP mitochondrial marker for detection and identification of salmonids in eDNA from water samples. *PeerJ*, *5*, e3045. doi:10.7717/peerj.3045
- Crisp, D. T. (1981). A desk study of the relationship between temperature and hatching time for the eggs of five species of salmonid fishes. *Freshwater Biology*, *11*(4), 361-368. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1981.tb01267.x>
- Cruaud, P., Vigneron, A., Fradette, M.-S., Charette, S. J., Rodriguez, M. J., Dorea, C. C., & Culley, A. I. (2017). Open the Sterivex™ casing: An easy and effective way to improve DNA extraction yields. *Limnology and Oceanography: Methods*, *15*(12), 1015-1020. doi:10.1002/lom3.10221
- Davidson, W. S., Koop, B. F., Jones, S. J., Iturra, P., Vidal, R., Maass, A., . . . Omholt, S. W. (2010). Sequencing the genome of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genome Biol*, *11*(9), 403. doi:10.1186/gb-2010-11-9-403

- Davy, C. M., Kidd, A. G., & Wilson, C. C. (2015). Development and Validation of Environmental DNA (eDNA) Markers for Detection of Freshwater Turtles. *PLoS One*, *10*(7), e0130965. doi:10.1371/journal.pone.0130965
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., & Miaud, C. (2012). Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, *49*(4), 953-959. doi:10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x
- Direktoratet for Naturforvaltning. (2003). *Mulige skadevirkninger av vassdragskalking på biologisk mangfold*. (DN-utredning 2003-3. 32 s.)
- Driscoll, C. T., Baker, J. P., Bisogni, J. J., & Schofield, C. L. (1980). Effect of aluminium speciation on fish in dilute acidified waters. *Nature*, *284*(5752), 161-164. doi:10.1038/284161a0
- Einum, S., & Fleming, I. A. (1997). Genetic divergence and interactions in the wild among native, farmed and hybrid Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, *50*(3), 634-651. doi:https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1997.tb01955.x
- Elliott, J. M. (1994). *Quantitative ecology and the brown trout*. Oxford; New York: Oxford University Press.
- Elliott, J. M., & Hurley, M. A. (1998). An individual-based model for predicting the emergence period of sea trout fry in a Lake District stream. *Journal of Fish Biology*, *53*(2), 414-433. doi:https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb00990.x
- Ellison, S. L., 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). doi:10.1186/1472-6750-6-33
- Fehlmann, T., Reinheimer, S., Geng, C., Su, X., Drmanac, S., Alexeev, A., . . . Keller, A. (2016). cPAS-based sequencing on the BGISEQ-500 to explore small non-coding RNAs. *Clin Epigenetics*, *8*(123). doi:10.1186/s13148-016-0287-1
- Fleming, I. A., Hindar, K., Mjølnerod, I. B., Jonsson, B., Balstad, T., & Lamberg, A. (2000). Lifetime success and interactions of farm salmon invading a native population. *Proc Biol Sci*, *267*(1452), 1517-1523. doi:10.1098/rspb.2000.1173
- Forseth, T., Barlaup, B. T., Finstad, B., Fiske, P., Gjøsaeter, H., Falkegård, M., . . . Gibbs, M. (2017). The major threats to Atlantic salmon in Norway. *ICES Journal of Marine Science*, *74*(6), 1496-1513. doi:10.1093/icesjms/fsx020
- Forseth, T., Larsson, S., Jensen, A. J., Jonsson, B., Naslund, I., & Berglund, I. (2009). Thermal growth performance of juvenile brown trout *Salmo trutta*: no support for thermal adaptation hypotheses. *J Fish Biol*, *74*(1), 133-149. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.02119.x
- Friedland, K. D., Reddin, D. G., McMenemy, J. R., & Drinkwater, K. F. (2003). Multidecadal trends in North American Atlantic salmon (*Salmo salar*) stocks and climate trends relevant to juvenile survival. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *60*(5), 563-583. doi:10.1139/f03-047
- Gargan, L. M., Morato, T., Pham, C. K., Finarelli, J. A., Carlsson, J. E. L., & Carlsson, J. (2017). Development of a sensitive detection method to survey pelagic biodiversity using eDNA and quantitative PCR: a case study of devil ray at seamounts. *Marine Biology*, *164*(5). doi:10.1007/s00227-017-3141-x
- Georgiou, C. D., & Papapostolou, I. (2006). Assay for the quantification of intact/fragmented genomic DNA. *Anal Biochem*, *358*(2), 247-256. doi:10.1016/j.ab.2006.07.035
- 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. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.040
- Gustavson, M. S., Collins, P. C., Finarelli, J. A., Egan, D., Conchuir, R. O., Wightman, G. D., . . . Carlsson, J. (2015). An eDNA assay for Irish *Petromyzon marinus* and *Salmo trutta* and field validation in running water. *J Fish Biol*, *87*(5), 1254-1262. doi:10.1111/jfb.12781
- Haile, J., Froese, D. G., MacPhee, R. D. E., Roberts, R. G., Arnold, L. J., Reyes, A. V., . . . Willerslev, E. (2009). Ancient DNA reveals late survival of mammoth and horse in interior Alaska. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(52), 22352-22357. doi:10.1073/pnas.0912510106
- Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G. A., & Baird, D. J. (2011). Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS One*, *6*(4), e17497. doi:10.1371/journal.pone.0017497
- Hansen, L. P., & Youngson, A. F. (2010). Dispersal of large farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*, from simulated escapes at fish farms in Norway and Scotland. *Fisheries Management and Ecology*, *17*(1), 28-32. doi:10.1111/j.1365-2400.2009.00709.x

- Haraldstad, T., Höglund, E., Kroglund, F., Lamberg, A., Olsen, E. M., & Haugen, T. O. (2018). Condition-dependent skipped spawning in anadromous brown trout (*Salmo trutta*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 75(12), 2313-2319. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2017-0076>
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci*, 270 Suppl 1, S96-99. doi:10.1098/rsbl.2003.0025
- Herder, J., Valentini, A., Bellemain, E., Dejean, T., Delft, J., Thomsen, P., & Taberlet, P. (2014). *Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species*. DOI:10.13140/RG.2.1.4002.1208
- Herrmann, J., Erik, D., Almut, G., Catarina, J., Pär-Erik, L., & Ivar, P. M. (1993). Acid-Stress Effects on Stream Biology. *Ambio*, 22(5), 298-307. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4314093>
- Hesthagen, T., Fiske, P., & Skjelkvåle, B. L. (2008). Critical limits for acid neutralizing capacity of brown trout (*Salmo trutta*) in Norwegian lakes differing in organic carbon concentrations. *Aquatic Ecology*, 42(2), 307-316. doi:10.1007/s10452-008-9191-x
- Hesthagen, T., & Hansen, L. P. (1991). Estimates of the annual loss of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway due to acidification. *Aquaculture Research*, 22(1), 85-92. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1991.tb00497.x
- Hesthagen, T., & Jonsson, B. (1998). The relative abundance of brown trout in acidic softwater lakes in relation to water quality in tributary streams. *Journal of Fish Biology*, 52(2), 419-429. doi:https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb00808.x
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7276-7280. doi:10.1073/pnas.88.16.7276
- Höss, M., Kohn, M., & Pääbo, S. (1992). Excrement Analysis by PCR. *Nature*, 359(6392), 199. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/359199a0>
- Invitrogen (2011). *PureLink® PCR Purification Kit Userguide* (26 May 2011) 25-0715. Life Technologies. Hentet fra (http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_pcr_man.pdf)
- Invitrogen. (2010). *Qubit® 2.0 Fluorometer*. Catalog no. Q32866. Rev. Date: 4 October 2010. Hentet fra (<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/cell-tissue-analysis/qubit-all-file-types.par.0519.file.dat/qubit-2-fluorometer-user-manual.pdf>)
- Jane, S. F., Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Schwartz, M. K., Lowe, W. H., . . . Whiteley, A. R. (2015). Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Mol Ecol Resour*, 15(1), 216-227. doi:10.1111/1755-0998.12285
- Jensen, A. J., Zubchenko, A. V., Heggberget, T. G., Hvidsten, N. A., Johnsen, B. O., Kuzmin, O., . . . Økland, F. (1999). Cessation of the Norwegian drift net fishery: changes observed in Norwegian and Russian populations of Atlantic salmon. *ICES Journal of Marine Science*, 56(1), 84-95. doi:10.1006/jmsc.1998.0419
- Jensen, K. W., & Snekvik, E. (1972). Low pH Levels Wipe out Salmon and Trout Populations in Southernmost Norway. *Ambio*, 1(6), 223-225. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4311987>
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2011). "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4(2), 150-157. doi:10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x
- Jonsson, B., Forseth, T., Jensen, A., & Næsje, T. (2001). Thermal performance of juvenile Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. *Functional Ecology*, 15, 701-711. doi:10.1046/j.0269-8463.2001.00572.x
- Jonsson, B., & Jonsson, N. (2004). Factors affecting marine production of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61(12), 2369-2383. doi:10.1139/f04-215
- Jonsson, B., & Jonsson, N. (2009a). Migratory timing, marine survival and growth of anadromous brown trout *Salmo trutta* in the River Imsa, Norway. *J Fish Biol*, 74(3), 621-638. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.02152.x
- Jonsson, B., & Jonsson, N. (2009b). A review of the likely effects of climate change on anadromous Atlantic salmon *Salmo salar* and brown trout *Salmo trutta*, with particular reference to water temperature and flow. *J Fish Biol*, 75(10), 2381-2447. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02380.x
- Jonsson, B., & Jonsson, N. (2011). *Ecology of Atlantic salmon and Brown Trout: Habitat as A Template For Life Histories*. Springer, Dordrecht (Vol. 33).

- Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., & Crowder, L. B. (2014). Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm. *PLoS One*, *9*(1). doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086175
- Keskin, E. (2014). Detection of invasive freshwater fish species using environmental DNA survey. *Biochemical Systematics and Ecology*, *56*, 68–74. doi:10.1016/j.bse.2014.05.003
- Klemetsen, A., Amundsen, P.-A., Dempson, J. B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M. F., & Mortensen, E. (2003). Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish*, *12*(1), 1-59. doi:https://doi.org/10.1034/j.1600-0633.2003.00010.x
- Klobucar, S. L., Rodgers, T. W., & Budy, P. (2017). At the forefront: evidence of the applicability of using environmental DNA to quantify the abundance of fish populations in natural lentic waters with additional sampling considerations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *74*(12), 2030-2034. doi:10.1139/cjfas-2017-0114
- Korostin D, Kulemin N, Naumov V, Belova V, Kwon D, et al. (2020). Comparative analysis of novel MGISEQ-2000 sequencing platform vs Illumina HiSeq 2500 for whole-genome sequencing. *PLOS ONE* *15*(3), e0230301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230301>
- Kroglund, F., & Finstad, B. (2003). Low concentrations of inorganic monomeric aluminum impair physiological status and marine survival of Atlantic salmon. *Aquaculture*, *222*(1-4), 119-133. doi:10.1016/s0044-8486(03)00106-6
- Kroglund, F., Finstad, B., Stefansson, S. O., Nilsen, T. O., Kristensen, T., Rosseland, B. O., . . . Salbu, B. (2007). Exposure to moderate acid water and aluminum reduces Atlantic salmon post-smolt survival. *Aquaculture*, *273*(2-3), 360-373. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.10.018
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., . . . Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, *27*(2-3), 95-125. doi:10.1016/j.mam.2005.12.007
- Kubista, M., Stalberg, A., & Bar, T. (2001). Light-up-probe-based real-time Q-PCR. *SPIE Proceedings*, *4264*. doi: [10.1117/12.424589](https://doi.org/10.1117/12.424589)
- Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., . . . Hedgpeth, J. (2000). 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*, *28*(2), 655-661. doi:10.1093/nar/28.2.655
- Li, Q., Zhao, X., Zhang, W., Wang, L., Wang, J., Xu, D., . . . Jiang, Y. (2019). Reliable multiplex sequencing with rare index mis-assignment on DNB-based NGS platform. *BMC Genomics*, *20*(1), 215. doi:10.1186/s12864-019-5569-5
- Loeza-Quintana, T., Abbott, C. L., Heath, D. D., Bernatchez, L., & Hanner, R. H. (2020). Pathway to Increase Standards and Competency of eDNA Surveys (PISCeS)—Advancing collaboration and standardization efforts in the field of eDNA. *Environmental DNA*, *2*(3), 255-260. doi:10.1002/edn3.112
- Lydolph, M. C., Jacobsen, J., Arctander, P., Gilbert, M. T., Gilichinsky, D. A., Hansen, A. J., . . . Lange, L. (2005). Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA. *Appl Environ Microbiol*, *71*(2), 1012-1017. doi:10.1128/AEM.71.2.1012-1017.2005
- Martellini, A., Payment, P., & Villemur, R. (2005). Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Res*, *39*(4), 541-548. doi:10.1016/j.watres.2004.11.012
- Marttunen, M., & Vehanen, T. (2004). Toward adaptive management: the impacts of different management strategies on fish stocks and fisheries in a large regulated lake. *Environ Manage*, *33*(6), 840-854. doi:10.1007/s00267-003-3021-7
- Masuda, R., Shiba, M., Yamashita, Y., Ueno, M., Kai, Y., Nakanishi, A., . . . Tanaka, M. (2010). Fish assemblages associated with three types of artificial reefs: Density of assemblages and possible impacts on adjacent fish abundance. *Fishery Bulletin*, *108*.
- Matejusová, I., Doig, F., Middlemas, S. J., Mackay, S., Douglas, A., Armstrong, J. D., . . . Snow, M. (2008). Using quantitative real-time PCR to detect salmonid prey in scats of grey Halichoerus grypus and harbour Phoca vitulina seals in Scotland - an experimental and field study. *Journal of Applied Ecology*, *45*(2), 632-640. doi:10.1111/j.1365-2664.2007.01429.x
- Matheson, C. D., Gurney, C., Esau, N., & Lehto, R. (2014). Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, *3*(1), 38-45. doi:10.2174/1874940201003010038
- McCormick, S. D., Keyes, A., Nislow, K. H., & Monette, M. Y. (2009). Impacts of episodic acidification on in-stream survival and physiological impairment of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *66*(3), 394-403. doi:10.1139/f09-002

- McGinnity, P., Jennings, E., DeEyto, E., Allott, N., Samuelsson, P., Rogan, G., . . . Cross, T. (2009). Impact of naturally spawning captive-bred Atlantic salmon on wild populations: depressed recruitment and increased risk of climate-mediated extinction. *Proc Biol Sci*, 276(1673), 3601-3610. doi:10.1098/rspb.2009.0799
- McKee, A. M., Calhoun, D. L., Barichivich, W. J., Spear, S. F., Goldberg, C. S., & Glenn, T. C. (2015a). Assessment of Environmental DNA for Detecting Presence of Imperiled Aquatic Amphibian Species in Isolated Wetlands. *Journal of Fish and Wildlife Management*, 6(2), 498-510. doi:10.3996/042014-jfwm-034
- McKee, A. M., Spear, S. F., & Pierson, T. W. (2015b). The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples. *Biological Conservation*, 183, 70-76. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.031
- Meusnier, I., Singer, G. A., Landry, J. F., Hickey, D. A., Hebert, P. D., & Hajibabaei, M. (2008). A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, 9, 214. doi:10.1186/1471-2164-9-214
- Miljødirektoratet. (2012). *Tiltaksovervåkning: Kalking i laksevassdrag skadet av sur nedbør*. Hentet fra (<https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/m18/m18.pdf>)
- Miljødirektoratet. (2020). *Tilstandsrapport: Redusert vannkvalitet, særlig på Sørlandet*. Hentet fra (<https://miljostatus.miljodirektoratet.no/tema/forurensning/sur-nedbor/>)
- Minamoto, T., Yamanaka, H., Takahara, T., Honjo, M. N., & Kawabata, Z. i. (2011). Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 13(2), 193-197. doi:10.1007/s10201-011-0362-4
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., . . . Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R Soc Open Sci*, 2(7), 150088. doi:10.1098/rsos.150088
- Morillo, J. M., Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., & Silva, A. (2003). Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*, 38(5), 518-524. doi:https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2003.00684.x
- Mullis, K. B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)*, 48(8), 579-582.
- Nakayama, Y., Yamaguchi, H., Einaga, N., & Esumi, M. (2016). Pitfalls of DNA Quantification Using DNA-Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PLoS One*, 11(3), e0150528. doi:10.1371/journal.pone.0150528
- NASCO. (2019). *The State of North Atlantic Salmon Report*. Hentet fra (<https://nasco.int/atlantic-salmon/state-of-salmon/>)
- Norris, A. T., Bradley, D. G., & Cunningham, E. P. (1999). Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture*, 180(3), 247-264. doi:https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00212-4
- Patterson, J., Carpenter, E. J., Zhu, Z., An, D., Liang, X., Geng, C., . . . Wong, G. K. (2019). Impact of sequencing depth and technology on de novo RNA-Seq assembly. *BMC Genomics*, 20(1), 604. doi:10.1186/s12864-019-5965-x
- Poinar, H. N., Hofreiter, M., Spaulding, W. G., Martin, P. S., Stankiewicz, B. A., Bland, H., . . . Pääbo, S. (1998). Molecular Coproscopy: Dung and Diet of the Extinct Ground Sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science*, 281(5375), 402-406. doi:10.1126/science.281.5375.402
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., Gough, K. C., & Crispo, E. (2014). REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5), 1450-1459. doi:10.1111/1365-2664.12306
- Reist, J. D., Wrona, F. J., Prowse, T. D., Power, M., Dempson, J. B., Beamish, R. J., . . . Sawatzky, C. D. (2006). General Effects of Climate Change on Arctic Fishes and Fish Populations. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 35(7), 370-380. doi:10.1579/0044-7447(2006)35[370:Geocco]2.0.Co;2
- Riaz, T., Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P., & Coissac, E. (2011). ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res*, 39(21), e145. doi:10.1093/nar/gkr732
- Robson, H. L., Noble, T. H., Saunders, R. J., Robson, S. K., Burrows, D. W., & Jerry, D. R. (2016). Fine-tuning for the tropics: application of eDNA technology for invasive fish detection in tropical freshwater ecosystems. *Mol Ecol Resour*, 16(4), 922-932. doi:10.1111/1755-0998.12505

- Rosseland, B. O., & Skogheim, O. (1984). A comparative study on salmonid fish species in acid aluminium- rich water. II. Physiological stress and mortality of one- and two- year old fish. *Report - Institute of Freshwater Research, Drottningholm*, 61, 186-194.
- Rosseland, B. O., Skogheim, O. K., Abrahamsen, H., & Matzow, D. (1986). Limestone Slurry Reduces Physiological Stress and Increases Survival of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in an Acidic Norwegian River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43(10), 1888-1893. doi:10.1139/f86-233
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/1696982>
- Samejima, H., Ong, R., Lagan, P., & Kitayama, K. (2012). Camera-trapping rates of mammals and birds in a Bornean tropical rainforest under sustainable forest management. *Forest Ecology and Management*, 270, 248-256. doi:10.1016/j.foreco.2012.01.013
- Sandøy, S., & Langåker, R. M. (2001). Atlantic Salmon and Acidification in Southern Norway: A Disaster in the 20th Century, but a Hope for the Future? *Water, Air, and Soil Pollution*, 130(1), 1343-1348. doi:10.1023/A:1013966209102
- Sandøy, S., & Romundstad, A. J. (1995). Liming of acidified lakes and rivers in Norway. *Water, Air, and Soil Pollution*, 85(2), 997-1002. doi:10.1007/BF00476960
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- Schneider, C., Laizé, C. L. R., Acreman, M. C., & Flörke, M. (2013). How will climate change modify river flow regimes in Europe? *Hydrology and Earth System Sciences*, 17(1), 325-339. doi:10.5194/hess-17-325-2013
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & John, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*, 113(5), 1014-1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Sedlackova, T., Repiska, G., Celec, P., Szemes, T., & Minarik, G. (2013). Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biol Proced Online*, 15(1), 5. doi:10.1186/1480-9222-15-5
- Shokere, L. A., Holden, M. J., & Ronald Jenkins, G. (2009). Comparison of fluorometric and spectrophotometric DNA quantification for real-time quantitative PCR of degraded DNA. *Food Control*, 20(4), 391-401. doi:10.1016/j.foodcont.2008.07.009
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol*, 21(8), 1794-1805. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x
- Shu, L., Ludwig, A., & Peng, Z. (2020). Standards for Methods Utilizing Environmental DNA for Detection of Fish Species. *Genes (Basel)*, 11(3). doi:10.3390/genes11030296
- 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. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.023
- Simmons, M., Tucker, A., Chadderton, W. L., Jerde, C. L., Mahon, A. R., & Taylor, E. (2016). Active and passive environmental DNA surveillance of aquatic invasive species. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 73(1), 76-83. doi:10.1139/cjfas-2015-0262
- Skjelkvåle, B. L., Evans, C., Larssen, T., Hindar, A., & Raddum, G. G. (2003). Recovery from Acidification in European Surface Waters: A View to the Future. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 32(3), 170-176. Hentet fra [https://doi.org/10.1579/0044-7447\(2003\)032\[0170:RFAIES\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1579/0044-7447(2003)032[0170:RFAIES]2.0.CO;2)
- Skogheim, O. K., & Rosseland, B. O. (1986). Mortality of smolt of atlantic salmon, *Salmo salar* L., at low levels of aluminium in acidic softwater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(1), 258-265. doi:10.1007/BF01607759
- Smart, A., Tingley, R., Weeks, A., Rooyen, A., & McCarthy, M. (2015). Environmental DNA sampling is more sensitive than a traditional survey technique for detecting an aquatic invader. *Ecological Applications*, 25, 1944-1952. doi:10.1890/14-1751.1
- Snyder, D. E. (2003). Invited overview: conclusions from a review of electrofishing and its harmful effects on fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13(4), 445-453. doi:10.1007/s11160-004-1095-9
- Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., . . . Herndl, G. J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 12115-12120. doi:10.1073/pnas.0605127103
- Solberg, M. F., Skaala, O., Nilsen, F., & Glover, K. A. (2013). Does domestication cause changes in growth reaction norms? A study of farmed, wild and hybrid Atlantic salmon families exposed to environmental stress. *PLoS One*, 8(1), e54469. doi:10.1371/journal.pone.0054469

- Soulsby, C., Youngson, A. F., Moir, H. J., & Malcolm, I. A. (2001). Fine sediment influence on salmonid spawning habitat in a lowland agricultural stream: a preliminary assessment. *Sci Total Environ*, 265(1-3), 295-307. doi:10.1016/S0048-9697(00)00672-0
- Spens, J., Evans, A. R., Halfmaerten, D., Knudsen, S. W., Sengupta, M. E., Mak, S. S. T., . . . Yu, D. (2016). 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
- Staumes, M., Hansen, L. P., Fugelli, K., & Haraldstad, Ø. (1996). Short-term exposure to acid water impairs osmoregulation, seawater tolerance, and subsequent marine survival of smolts of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(8), 1695-1704. doi:10.1139/f96-099
- Stoeckle, M. Y., Soboleva, L., & Charlop-Powers, Z. (2017). Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary. *PLoS One*, 12(4), e0175186. doi:10.1371/journal.pone.0175186
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012b). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789-1793. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012a). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), 2045-2050. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x
- Takahara, T., Minamoto, T., & Doi, H. (2013). Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS One*, 8(2), e56584. doi:10.1371/journal.pone.0056584
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., & Kawabata, Z. (2012). Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One*, 7(4), e35868. doi:10.1371/journal.pone.0035868
- Taranger GL, Svåsand T, Bjørn PA, Jansen PA and others (2012) *Forslag til førstegenerasjons målemetode for miljøeffekt (effektindikatorer) med hensyn til genetisk påvirkning fra oppdrettsfisk til villaks, og påvirkning av lakselus fra oppdrett på viltlevende laksebestander*. Rapport fra Havforskningsinstituttet. Institute of Marine Research, Bergen.
- Temple, G. M. and T. N. Pearsons. (2007). *Electrofishing: backpack and drift boat*. Pages 95- 132 in D. H. Johnson et al., editors. *Salmonid Field Protocols Handbook: Techniques for assessing status and trends in salmon and trout populations*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Thermo Fisher Scientific. (2021). *NanoDrop One, User Guide*. 269-309102, Revision C (March 2021). Hentet fra (<https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/manuals/nanodrop-one-user-guide-EN-309102.pdf>)
- Thermo Fisher Scientific. (2015). Wilmington, MA, USA. *Assesment of Nucleic Acid Purity* . Hentet fra (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>)
- Thermo Fisher Scientific. (2010). *Nucleic Acid*. Revised 11/2010. Hentet fra (<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Thermo-Scientific-NanoDrop-Products-Nucleic-Acid-Technical-Guide-EN.pdf>)
- Thodesen, J., Grisdale-Helland, B., Helland, S. J., & Gjerde, B. (1999). Feed intake, growth and feed utilization of offspring from wild and selected Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 180(3), 237-246. doi:https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00204-5
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T., . . . Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol Ecol*, 21(11), 2565-2573. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x
- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4-18. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.019
- Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., Lodge, D. M., & Gilbert, M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(7), 676-684. doi:10.1111/2041-210x.12206

- Ugedal, O., Næsje, T. F., Thorstad, E. B., Forseth, T., Saksgård, L. M., & Heggberget, T. G. (2008). Twenty years of hydropower regulation in the River Alta: long-term changes in abundance of juvenile and adult Atlantic salmon. *Hydrobiologia*, *609*(1), 9-23. doi:10.1007/s10750-008-9404-2
- Ushio, M., Murakami, H., Masuda, R., Sado, T., Miya, M., Sakurai, S., . . . Kondoh, M. (2018a). Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics*, *2*, e23297. Hentet fra <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.23297>
- Ushio, M., Fukuda, H., Inoue, T., Makoto, K., Kishida, O., Sato, K., . . . Miya, M. (2017). Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Mol Ecol Resour*, *17*(6), e63-e75. doi:10.1111/1755-0998.12690
- Ushio, M., Murata, K., Sado, T., Nishiumi, I., Takeshita, M., Iwasaki, W., & Miya, M. (2018b). Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Sci Rep*, *8*(1), 4493. doi:10.1038/s41598-018-22817-5
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol Evol*, *24*(2), 110-117. doi:10.1016/j.tree.2008.09.011
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., . . . Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol*, *25*(4), 929-942. doi:10.1111/mec.13428
- Valiere, N., & Taberlet, P. (2000). Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Molecular Ecology*, *9*(12), 2150-2152. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.11142.x>
- Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., de Souza, P. R. E., de Albuquerque Tavares Carvalho, A., & Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, *40*(1), 1-11. doi:10.1590/S1517-83822009000100001
- Willerslev, E., Hansen, A. J., Binladen, J., Brand, T. B., & et al. (2003). Diverse plant and animal genetic records from holocene and pleistocene sediments. *Science*, *300*(5620), 791-795. Hentet fra <https://search.proquest.com/scholarly-journals/diverse-plant-animal-genetic-records-holocene/docview/213585261/se-2?accountid=45259>
- Wood, J., & Budy, P. (2009). The Role of Environmental Factors in Determining Early Survival and Invasion Success of Exotic Brown Trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, *138*(4), 756-767. doi:10.1577/t08-123.1
- Yamamoto, S., Minami, K., Fukaya, K., Takahashi, K., Sawada, H., Murakami, H., . . . Kondoh, M. (2016). Correction: Environmental DNA as a 'Snapshot' of Fish Distribution: A Case Study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS One*, *11*(4), e0153291. doi:10.1371/journal.pone.0153291
- Yamamoto, S., Masuda, R., Sato, Y., Sado, T., Araki, H., Kondoh, M., . . . Miya, M. (2017). Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Sci Rep*, *7*, 40368. doi:10.1038/srep40368
- Zhan, A., Hulák, M., Sylvester, F., Huang, X., Adebayo, A. A., Abbott, C. L., . . . Pond, S. K. (2013). High sensitivity of 454 pyrosequencing for detection of rare species in aquatic communities. *Methods in Ecology and Evolution*, *4*(6), 558-565. doi:10.1111/2041-210x.12037
- Zhang, H., DiBaise, J. K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., . . . Krajmalnik-Brown, R. (2009). Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(7), 2365-2370. doi:10.1073/pnas.0812600106

