

1476

NINA Rapport

Bruk av miljø-DNA til overvåkning av små- og storsalamander

Annette Taugbøl, Børre K. Dervo, Rolf Sivertsgård, Hege Brandsegg og Frode Fossøy.



NINAs publikasjoner

NINA Rapport

Dette er NINAs ordinære rapportering til oppdragsgiver etter gjennomført forsknings-, overvåkings- eller utredningsarbeid. I tillegg vil serien favne mye av instituttets øvrige rapportering, for eksempel fra seminarer og konferanser, resultater av eget forsknings- og utredningsarbeid og litteraturstudier. NINA Rapport kan også utgis på annet språk når det er hensiktsmessig..

NINA Temahefte

Som navnet angir behandler temaheftene spesielle emner. Heftene utarbeides etter behov og serien favner svært vidt; fra systematiske bestemmelsesnøkler til informasjon om viktige problemstillinger i samfunnet. NINA Temahefte gis vanligvis en populærvitenskapelig form med mer vekt på illustrasjoner enn NINA Rapport.

NINA Fakta

Faktaarkene har som mål å gjøre NINAs forskningsresultater raskt og enkelt tilgjengelig for et større publikum. Faktaarkene gir en kort framstilling av noen av våre viktigste forskningstema.

Annen publisering

I tillegg til rapporteringen i NINAs egne serier publiserer instituttets ansatte en stor del av sine vitenskapelige resultater i internasjonale journaler, populærfaglige bøker og tidsskrifter.

Bruk av miljø-DNA til overvåkning av små- og storsalamander

Annette Taugbøl
Børre K. Dervo
Rolf Sivertsgård
Hege Brandsegg
Frode Fossøy

Taugbøl, A., Dervo, B.K., Brandsegg, H., Sivertsgård, R. Fossøy, F. 2018.
Bruk av miljø-DNA til overvåking av små- og storsalamander. NINA
Rapport 1476. Norsk institutt for naturforskning.

Lillehammer, Mars 2018

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-3207-4

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

Åpen

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

REDAKSJON

Annette Taugbøl

KVALITETSSIKRET AV

Kim Magnus Bærum

ANSVARLIG SIGNATUR

Forskningsjef Jon Museth (sign.)

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Miljødirektoratet

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

M-974|2018

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Ingrid Regine Reinkind

FORSIDEBILDE

Annette Taugbøl

NØKKEWORD

- Norge, Akershus, Buskerud, Lier
- *Triturus cristatus*
- *Lissotriton vulgaris*
- Amfibier
- Artspåvisning
- Overvåking
- Bestandsberegning
- Miljø-DNA

KEY WORDS

- Norway
- Great crested newt
- Smooth newt
- Stock assessment
- e-DNA
- Surveillance
- Amphibians

KONTAKTOPPLYSNINGER

NINA hovedkontor

Postboks 5685 Torgarden
7485 Trondheim
Tlf: 73 80 14 00

NINA Oslo

Gaustadalléen 21
0349 Oslo
Tlf: 73 80 14 00

NINA Tromsø

Postboks 6606 Langnes
9296 Tromsø
Tlf: 77 75 04 00

NINA Lillehammer

Vormstuguvegen 40
2624 Lillehammer
Tlf: 73 80 14 00

NINA Bergen

Thormøhlensgate 55
5006 Bergen
Tlf: 73 80 14 00

www.nina.no

Sammendrag

Taugbøl, A., Dervo, B.K., Brandsegg, H., Sivertsgård, R. Fossøy, F. 2018. Bruk av miljø-DNA til overvåkning av små- og storsalamander. NINA Rapport 1476. Norsk institutt for naturforskning.

I denne rapporten oppsummerer vi resultatene fra uttesting av miljø-DNA som en metode for overvåkning av småsalamander og storsalamander i Akershus fylke og Lier kommune. Miljø-DNA er definert som alt DNA som har blitt tilført omgivelsene fra ulike arter, via bl.a. hudrester, spytt og avføring. Ved hjelp av miljø-DNA kan man påvise tilstedeværelse av arter uten direkte observasjon.

Resultater fra en tidligere uttesting av miljø-DNA fra salamanderdammer viste stor variasjon i DNA-konsentrasjon mellom punktprøver tatt i samme dam. Det ble derfor testet ut ulike prøve-oppsett for innsamling av vann i to dammer i første testrunde for denne rapporten; forskjellige filter, preserveringsmetoder og vannvolum. Etter sammenligning av disse resultatene konkluderte vi med å bruke en 0,5 liter vannprøve fra en oppsamlingskanne (totalt 15 liters blandeprøve fra 15 stasjoner) filtrert igjennom 0.45 µm filter preservert i 1400 µl ATL-buffer for oppbevaring frem mot ekstraksjon.

For hver dam ble det samlet inn minimum en oppsamlingskanne, som ble filtrert for minimum en prøve. Det ble også samlet inn flere oppsamlingskanner på samme tidspunkt for flere dammer, opptil tre oppsamlingskanner og seks DNA-prøver for et tidspunkt. Vi finner noe variasjon mellom prøver samlet inn fra samme oppsamlingskanne og noe variasjon mellom oppsamlingskanner samlet inn fra samme dam til samme tidspunkt, men totalt sett er det god sammenheng i DNA konsentrasjonen mellom prøvene tatt med denne innsamlingsmetoden.

Alle de kjønnsmodne salamanderne oppholder seg i yngledammen ca. to uker etter at isen har gått og er der hovedsakelig frem til midten av juli. Ved å samle inn flere dammer igjennom sesongen kan vi få et innblikk i hvordan DNA konsentrasjonen endrer seg over tid, selv om denne også kan variere pga. variasjon i temperatur og med økt parrings adferd. For begge disse faktorene forventer vi en økning av mengden DNA i vannet. Et utvalg av dammene i denne rapporten ble undersøkt opptil fire ganger. Resultatene indikerer ikke en jevn økning gjennom sesongen, men heller en økning før en reduksjon, så en ny økning. Det trengs mer utprøving før resultatene viser at vi kan konkludere med at dette er en trend eller en ren tilfeldighet.

Småsalamander har høyere konsentrasjon av miljø-DNA enn storsalamander i denne undersøkelsen, og dette er også reflektert i fangst per innsats (CPUE) for begge områdene. Selv om det er en forholdsvis god sammenheng mellom mengdeforholdet av de to artenes miljø-DNA og fangstdata for de ulike dammene, er det usikkerheter rundt hvordan vi bør omregne den lavere kroppsstørrelsen til småsalamander og mengden av dennes miljø-DNA.

Vi konkluderer med at miljø-DNA er en svært godt egnet metode for påvisning av amfibier. Ved å videreutvikle metoden er det stor grunn til å tro at miljø-DNA vil kunne være en kostnadseffektiv metode for påvisning av samtlige amfibiarter, og metoden vil også kunne gi indikasjoner på bestandsstørrelsen til de ulike artene i dammene som prøvetas.

Forfattere:

- Annette Taugbøl¹, Annette.Taugbol@nina.no
 - Børre K. Dervo¹, Borre.Dervo@nina.no
 - Rolf Sivertsgård², Rolf.Sivertsgard@nina.no
 - Hege Brandsegg², Hege.Bransegg@nina.no
 - Frode Fossøy², Frode.Fossoy@nina.no
- 1) NINA Lillehammer, Fakkalgården, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer
 2) NINA Trondheim, Postboks 5685, Sluppen, 7485 Trondheim

Abstract

Taugbøl, A., Dervo, B.K., Brandsegg, H., Sivertsgård, R. Fossøy, F. 2018. Bruk av miljø-DNA til overvåkning av små- og storsalamander. NINA Rapport 1476. Norsk institutt for naturforskning.

This rapport summarizes the findings of using environmental DNA (eDNA) as a tool for monitoring the two present newts in Norway, the common newt and the crested newt. eDNA is all the genetic material obtained directly from environmental samples without necessarily direct observation or sampling of the species. The total amount of DNA shredded from animals present in the environment, through e.g. skin, saliva and feces, is isolated, and the targeted species is amplified with species-specific primers. The samples collected for this report were water samples from two municipalities in Norway, Akershus and Buskerud.

Results from earlier testing of eDNA in water ponds inhabited by newts identified a large variation in DNA abundance between samples collected from the same pond. We wanted to decrease the variation between samples taken from the same pond, so we first tested a variety of water volume, filters and storage-methods of the filters in the first field sampling in 2017. This resulted in a standardized sampling method of first collecting 1 L of water at 15 sites spread across a certain distance, we then sampled two replicated samples of 0,5 L water from the 15 L batch for filtration, the water was filtrated through a 0.45 µm filter and stored in 1400 µl ATL buffer until the filter was processed in the lab.

We sampled a total of 30 ponds, where many ponds were sampled more than one time. For each pond and sampling time, we collected one-three 15 L batch of water and filtered at least 2 replicated samples from each batch. The results indicate some variation between replicated samples filtered from the same batch, and some variation between samples filtrated from separate batches, but the total variation between replicated samples and batches was low.

As all the mature newts are inhabiting the ponds about two weeks after the ice breaks and stays in the ponds until mid-July, we could compare how the eDNA concentration in the ponds changes with factors such as reproductive activity and seasonal temperature, where we expected an increase in the amount of eDNA with increased mating behavior, that again are linked to temperature. As some of the ponds were sampled several times during the season, we could check for any such correlations. The results indicate that there is an increase in the amount of eDNA toward late May, until it increases again toward our latest sampling in late June. As we only have a small subset of ponds that were sampled multiple times, we need to check this trend by more careful sampling in the future.

There was a higher abundance of eDNA from the common newt compared to the crested newt, and this is also reflected by catch per unit effort data for the same ponds. We do not, however, know if the shredding rate of the two species reflect their size, as this would indicate that the eDNA of the common newt should be about half that of the crested newt. More careful studies are needed in order to quantify species specific differences in eDNA quantity of the two species.

This report identifies eDNA as a promising tool for future monitoring, both to identify new ponds with presence/absence, but also to indicate the number of individuals that inhabits each pond.

Authors:

- Annette Taugbøl¹, Annette.Taugbol@nina.no
 - Børre K. Dervo¹, Borre.Dervo@nina.no
 - Rolf Sivertsgård², Rolf.Sivertsgard@nina.no
 - Hege Brandsegg², Hege.Bransegg@nina.no
 - Frode Fossøy², Frode.Fossoy@nina.no
- 3) NINA Lillehammer, Fakkelgården, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer
4) NINA Trondheim, Postboks 5685, Sluppen, 7485 Trondheim

Innhold

Sammendrag	3
Abstract	4
Innhold	5
Forord	6
1 Innledning	7
1.1 Tradisjonell overvåkning av salamander i Norge	7
1.2 Miljø-DNA, avlesning av et molekylært fotavtrykk fra miljøet.....	7
1.3 Salamandere og miljø-DNA	7
1.4 Problemstilling og mål med rapporten	9
2 Materialer og metoder	11
2.1 Utvelgelse av dammer i Lier, Oslo og Akershus.....	11
2.2 Utprøving av mengde vann, filtre og lagring for senere prosessering i lab.....	12
2.3 DNA ekstraksjon og ddPCR	13
2.4 Resultater fra testrunden	13
2.5 Standardisering av innsamlingsmetode.....	15
2.6 Innsamlingsplan av vann igjennom sesongen	16
3 Resultater	18
3.1 Variasjon i miljø-DNA konsentrasjon mellom prøver og kanner	18
3.2 Variasjon i dammene over tid	21
3.3 Variasjon mellom prøver før og etter grovfiltrering av te-filter.....	22
3.4 Forskjell mellom Akershus og Lier i mengde miljø-DNA.....	23
3.5 Sammenligninger mellom miljø-DNA og rusefangstdata	23
4 Diskusjon	25
4.1 Variasjon mellom prøver og oppsamlingskanner.....	25
4.2 Variasjon mellom prøvetidspunkt	25
4.3 Korrelasjon mellom miljø-DNA og felle-fangst	26
4.4 Oppsummering og videre anbefalinger.....	27
5 Referanser	29
6 Vedlegg	30

Forord

I dette prosjektet har vi testet ut miljø-DNA som metode for se om den egner seg til å påvise og overvåke små- og storsalamander i Norge. Samtidig med dette så har vi også utviklet miljø-DNA som metode for å påvise forekomsten av soppen *Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)* i de samme dammene som inngikk i denne undersøkelsen. Påvisningen av Bd er tidligere publisert i NINA-rapport med tittelen "Første påvisning av *Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)* i Norge; bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter (NINA rapport 1399). Miljø-DNA prosjektet ble gjennomført parallelt med den nasjonale overvåkingen av storsalamander i 2017. Det betyr at alle lokalitetene som er brukt i dette miljø-DNA-prosjektet er dammer som inngår i den nasjonale overvåkingen.

Prosjektet har vært finansiert av Miljødirektoratet og ledet av undertegnede med god hjelp fra Børre K. Dervo. Sistnevnte er ansvarlig for den nasjonale overvåkingen for salamander. Frode Fossøy og Rolf Sivertsgård har tilrettelagt for innsamlingen av vannet og vært pådrivere for metodeuttesting, og DNA- analysene er utført av Hege Brandsegg ved NINAs genetikklab i Trondheim. Vi ønsker å takke Hilde-Marit Dervo for hjelp i felt og Ingrid Regine Reinkind hos Miljødirektoratet for god tilrettelegging av prosjektet.

Lillehammer, mars 2018

Annette Taugbøl
Prosjektleder



Utvalg av bilder fra diverse feltdager, fra øverst til høyre: prosjektleders første møte med storsalamander og første salamanderselfie, full-lasset feltbil, storsalamander (foto: Børre K. Dervo); fra nederst til venstre: småsalamander, småsalamander (foto: Børre K. Dervo), Børre K. Dervo i felt og dammen Ottarsrud i Akershus.

1 Innledning

1.1 Tradisjonell overvåkning av salamander i Norge

Det nasjonale overvåkingsprogrammet for storsalamander ble startet opp i 2013, med årlig fangst i 50 ynglelokaliteter i Akershus, 15 ynglelokaliteter i Hordaland og 20 ynglelokaliteter i Midt-Norge (Dervo et al. 2014, Tilseth & Skei 2013). Metoden som er brukt i denne nasjonale overvåkingen er fellefangst med små fiskeruser. Dette omfattende overvåkingsprogrammet ble avsluttet i 2015, men enkelte dammer ble også undersøkt i Akershus i 2016 (20 stk) og 2017 (25 stk). Målet med det nasjonale overvåkingsprogrammet har vært å avdekke bestandsendringer for storsalamander på et tidligst mulig tidspunkt (Dervo et al. 2012). Overvåkingsprogrammet er evaluert av Dervo et al. i 2017, der konklusjonen er at fellefangst med tilstrekkelig innsats, gir et godt bilde på endringer i bestander i et område og for enkeltlokaliteter.

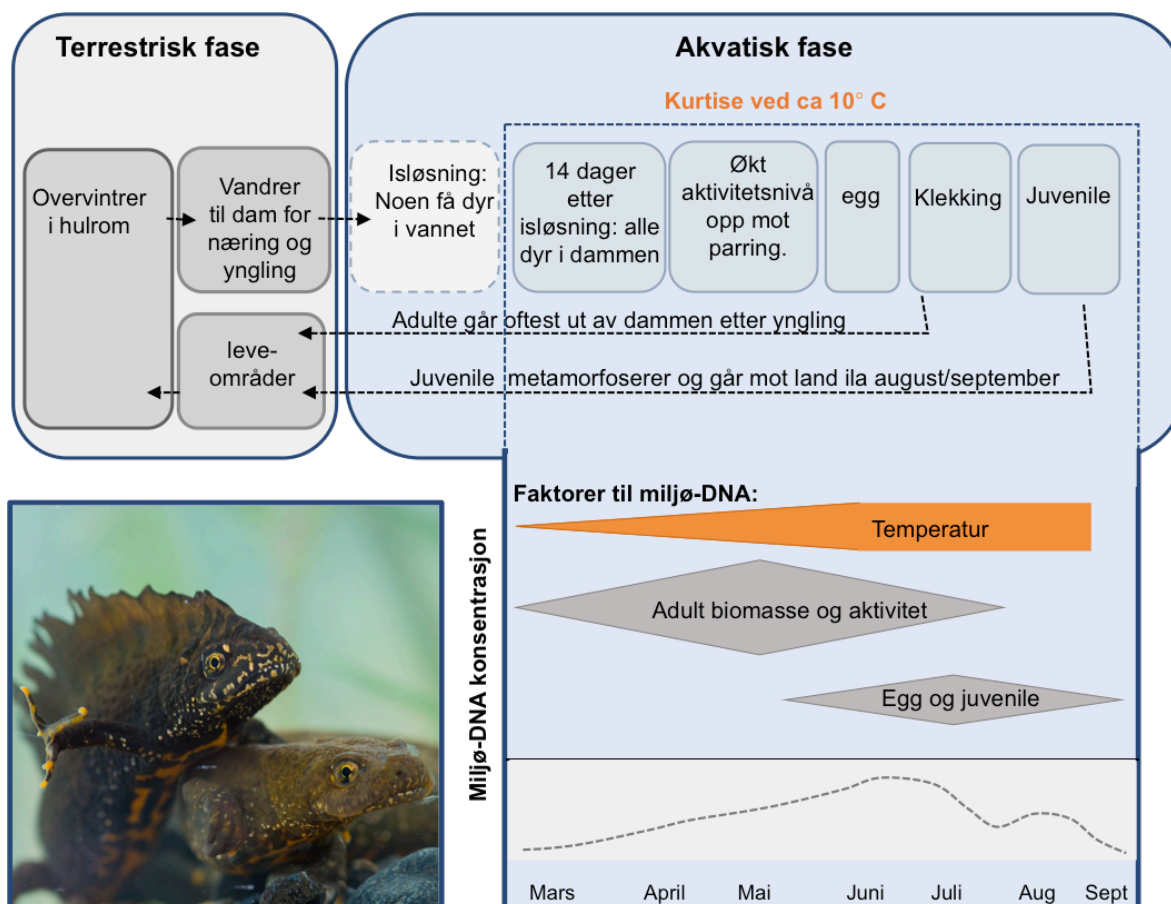
En arts tilstedeværelse i et økosystem kan måles på mange ulike måter, der rapporteringene kan svinge fra kun rapportering av positive funn (tilstedeværelse av en art) til faktiske populasjonsdata. For mange arter kan det være krevende å dokumentere tilstedeværelse med tanke på arbeidsinnsats og økonomi. Dette kan også gjelde for vannlevende dyr, der estimater og påvisning av arter kan avvike fra faktiske forhold på grunn av lav fangbarhet eller sesongbetonte adferdsvariasjoner. Det er viktig å vite arters utbredelse, slik man bedre forstår artenes økologiske krav og hva endringer i økologiske forhold kan forårsake over tid.

1.2 Miljø-DNA, avlesning av et molekylært fotavtrykk fra miljøet

Miljø-DNA, fra det engelske *environmental DNA* (eDNA), brukes i denne rapporten om alt DNA isolert fra jord, vann og luft. Dette er en kompleks blanding av DNA-fragmenter fra ulike organismer i det gitte miljøet (Thomsen et al. 2012). Miljø-DNA representerer ideelt sett alle arter i et bestemt økosystem, der det isolerte DNAet kan avleses med arts-spesifikke genetiske markører om arten er tilstede i miljøet, og DNAet fra denne er fanget opp i prøven. Påvisning av arter er den metoden som er mest brukt i dag. Mengde DNA fra artene kan også brukes til å estimere antall individer eller biomasse av arten i lokaliteten men dette er i mindre grad testet ut i naturlige systemer. Siden mengde DNA for en art i praksis avhenger av individenes kroppsstørrelse, "DNA-lekkasje", aktivitetsnivå, habitatvalg og temperatur kan ulike prøver tatt ved ulike tidspunkt igjennom sesongen eller ved ulike steder innen habitatet gi svært variable resultater med hensyn på populasjonsberegninger. For de fleste akvatiske dyr har man funnet ut at mengde miljø-DNA øker ved høyere tetthet, temperatur og aktivitet. Samtidig blir miljø-DNAet brutt ned av sollys (UV-lys), extracellulære enzymer og ulike kjemikalier, og vil også sedimenteres fra vannsøylen.

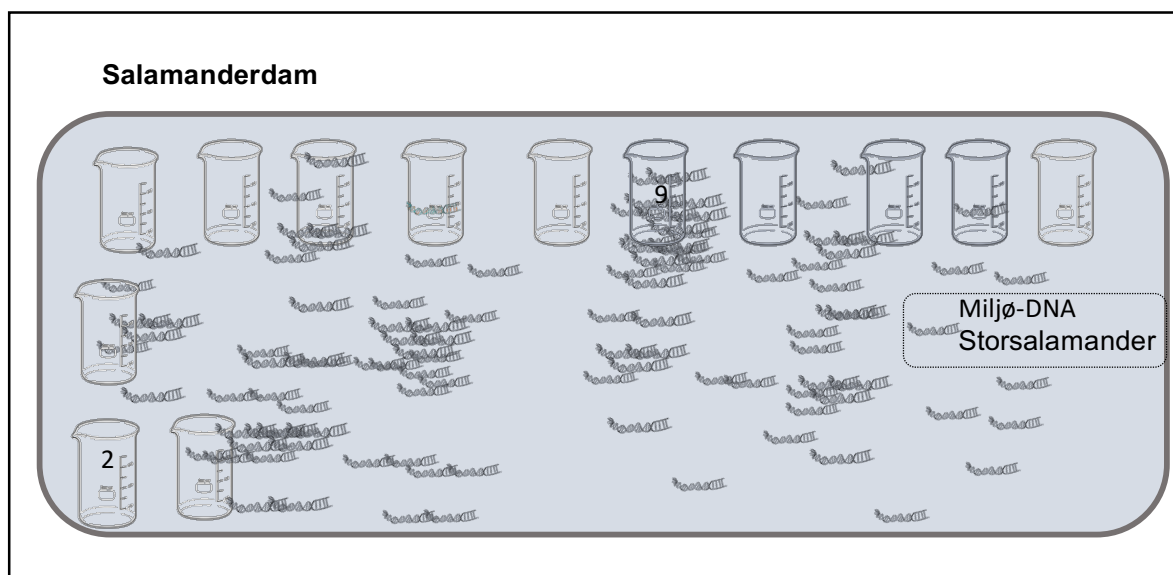
1.3 Salamandere og miljø-DNA

Salamandere i Norge har en semi-akvatisk livssyklus ved at de veksler mellom et liv i vann og et liv på land (**figur 1.1**). Denne livsstilen kan påvirke konsentrasjonen av miljø-DNA i en dam. Miljø-DNA konsentrasjonen øker sannsynligvis med økt temperatur og aktivitetsnivå frem mot parring og kan være avtagende mot egglegging (Buxton et al. 2017). Egg og yngre salamandere vil sannsynligvis avgi mindre miljø-DNA enn voksne salamandere, men hvis de yngre salamandrene øker sitt aktivitetsnivået utover sesongen kan dette trolig igjen avgi større mengder miljø-DNA. Ut fra dette forventer vi to topper av mengde miljø-DNA fra salamandere, hvor den første toppen er rundt slutten av mai, mens den siste toppen opptrer rundt slutten av august (**figur 1.1**)



Figur 1.1. Oversikt over livshistoriehendelser for storsalamander og liten salamander og forventet mengde miljø-DNA fra disse i en dam i perioden fra mars til september. Salamandere har en todelt livssyklus, der de foretrekker å overvintrere i frostfrie hulrom i trær eller i bakken på land frem til tidlig vår. Salamanderne kryper da ut av overvintringsplassene sine og voksne reproduktive dyr vandrer til et akvatisk miljø for der å kunne forplante seg. En økning i temperaturen øker aktivitetsnivået til salamanderne mot parring, som sannsynligvis øker mengden av miljø-DNA i dammen mot juli. Mengden miljø-DNA vil sannsynligvis reduseres når adulte dyr forlater dammen for fasen den har på land. Salamanderne som klekkes i løpet av juni vil fortsatt ha lav biomasse når de voksne forlater vannet. Mengde miljø-DNA i dammen vil sannsynligvis øke noe igjen etterhvert som larvene vokser opp. Den stiplede linjen nederst til høyre som illustrerer mengde miljø-DNA fra mars til september er ikke basert på data, men på antagelser gitt de tre hovedfaktorene som kilde. Figuren er utarbeidet av Annette Taugbøl basert på litteratur fra Dervo (2012) og Buxton et al. (2017). Bilde nederst til venstre er av storsalamander i parringsdrakt (Foto: Børre K. Dervo ©).

I 2016 ble det samlet inn miljø-DNA-prøver i totalt 12 dammer i Lier. Det ble tatt tre ulike punktprøver per dam, som for hver dam gav svært variable resultater med hensyn på mengde DNA i vannet (Taugbøl et.al., akseptert manus i Vann 2018). En av grunnene til forskjellene mellom punktprøvene var trolig uttak av kun 0,5 liter vann pr prøve og et fåtallig og tilfeldig utvalg av stasjoner i lokalitetene. Salamanderne er ofte klumpvis fordelt i en lokalitet, noe som trolig fører til opphopninger av vevsmateriale, celleklumper eller skinnrester nær slike fortetninger av dyr (**figur 1.2.**). Hvis miljø-DNA skal brukes til å beregne størrelser på bestander, er det viktig å enten innhente mange punktprøver fra hver lokalitet eller innhente vannprøver fra mange nok stasjoner som samles fra en lokalitet som det så tas en eller flere miljøDNA-prøver fra. Andre metoder for å forsøksvist fjerne de største klumpene av DNA kan være å filtrere vannet for å trekke ut de største celleklumpene.



Figur 1.2. Figuren illustrerer utfordringer ved å ta punktprøver fra en dam, spesielt om bare en eller to punktprøver tas. Resultatet kan i verste fall gi inntrykk av ingen eller svært lav mengde miljø-DNA (prøve 2) til veldig høye konsentrasjoner (prøve 9). For enkelthets skyld er det kun tegnet inn et tenkt eksempel av miljø-DNA for storsalamander, mens det i virkeligheten vil være miljø-DNA fra omtrent samtlige arter som lever i dammen i hver prøve.

1.4 Formålet med undersøkelsen

I den nasjonale overvåkingen av storsalamander brukes i dag fellefangst med ruser (Dervo et al. 2017). Fordelene med denne metoden er at man i tillegg til å få tall for relativ tetthet av dyr, også kan si noe om kjønnsfordelinger og generell tilstand for individene. Andre erfaringer er at fangst med ruser til dels er tidskrevende, ved at dammer må oppsøkes både ved utsetting og tømning av ruser. Det kan til dels være kunnskapskrevende å skille ulike arter i felt og det er også til dels utstyrskrevende om mange lokaliteter skal kartlegges eller overvåkes samtidig. Det brukes et minimum av 10 ruser per lokalitet. Dette er ruser som må desinfiseres ved bruk mellom dammer, for å hindre spredning av uønskede organismer fra en lokalitet til en annen, f.eks. den nylige påviste soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge (Taugbøl et al. 2017).

Det kreves også en del arbeid for å standardisere metoden for ulike typer feller for å få kvantitative sammenlignbare data (Dervo et al. 2017). I tillegg til dette er det også stor variasjon i fangbarhet av dyrene ved ulike temperaturer, da rusefangst fungerer best når forplantningsaktiviteten er størst. Det vil derfor si at en må være parat når forholdene ligger til rette for fangst, og da helst fange i alle lokalitetene som har optimale forhold innen forholdsvis kort tid. Rusefangst fungerer dårlig utover sommeren (Dervo et al. 2017).

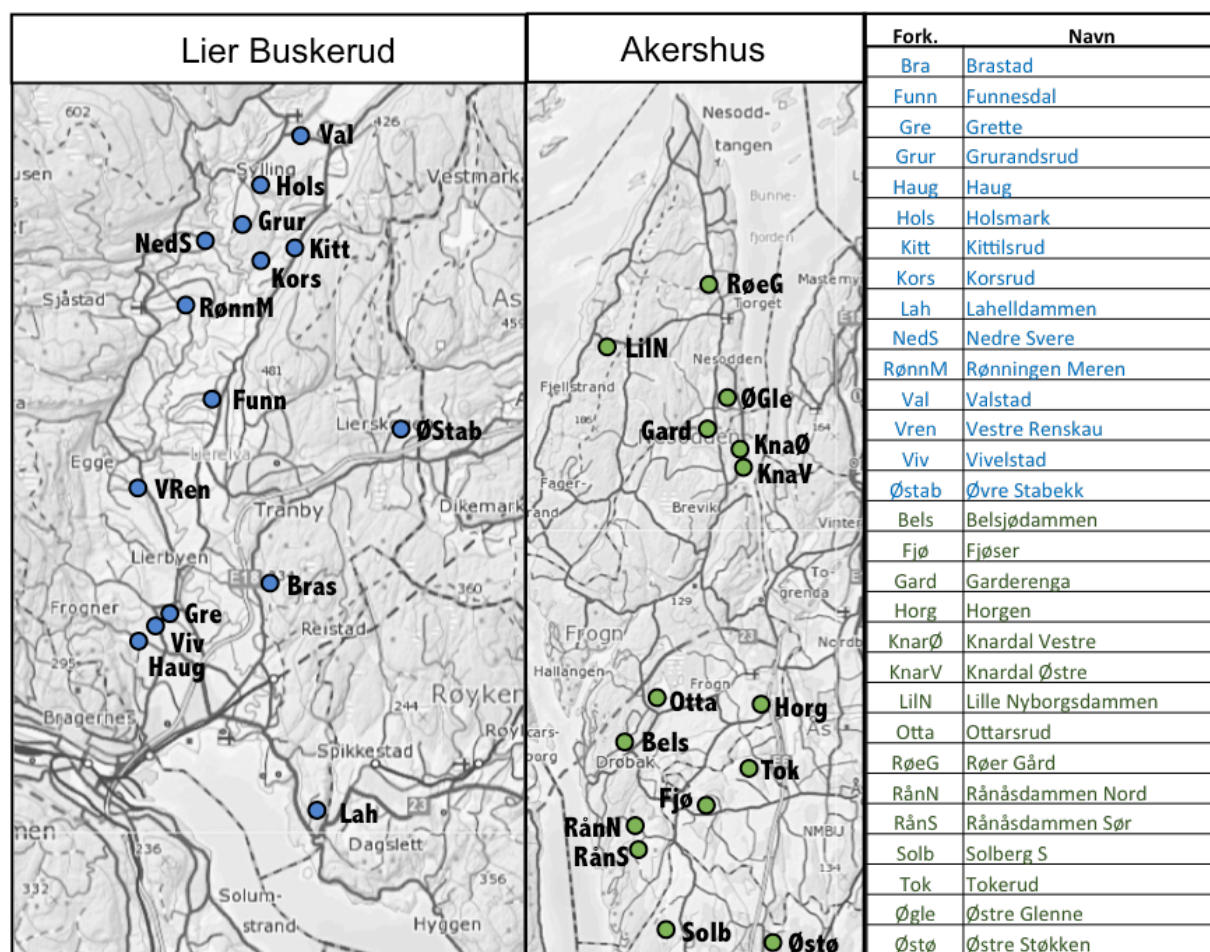
Formålet med undersøkelsen var å videreutvikle miljø-DNA som metode for bestandsestimeringer av småsalamander og storsalamander. Dette er kunnskap som også skal kunne videreføres for andre amfibearter som bruker små dammer og tjern som sin ynglelokalitet. Ut fra dette er rapporten delt inn i fire hovedtemaer:

- 1) Uttesting av optimal filterstørrelse, preservering og vannvolum for filtrering av miljø DNA-prøver til bruk i overvåkning av småsalamander og storsalamander
- 2) Variasjon i mengden DNA fra småsalamander og storsalamander mellom ulike oppsamlingskanner med vannprøver samlet fra samme dam på samme dag
- 3) Variasjon i mengden DNA fra småsalamander og storsalamander mellom ulike prøvetidspunkt gjennom sesongen
- 4) Sammenligning av miljø-DNA som et nytt verktøy kontra tradisjonell rusefangst for bruk i overvåkingen av småsalamander og storsalamander for data fra 2017

2 Materialer og metoder

2.1 Utvelgelse av dammer i Lier, Oslo og Akershus

Femten dammer i Lier kommune i Buskerud og femten dammer i kommunene Nesodden, Frogn og Ås i Oslo og Akershus ble valgt ut for innsamling av vannprøver for analyse av miljø-DNA. (figur 2.1 og tabell 2.2). Lokalitetene i Lier ble valgt ut fra 21 lokaliteter som er overvåket med ruser siden 2009 og lokalitetene i Akershus ble valgt ut fra det nasjonale overvåkingsprogrammet som ble startet i 2013. I tillegg ble det også filtrert vann til miljø-DNA-analyse fra to dammer i Lier der det ikke er noen kjent forekomst av salamander samt vann fra tappekran på flaske (negative kontroll). Ingen av dammene (Damtjern og Gullaug) eller vannflaskene gav utslag på salamander.



Figur 2.1. Kart over lokalitetene i Lier og Akershus. Lokalitetene i Lier er merket blått, mens lokalitetene i Akershus er merket grønt. Det ble også tatt vannprøver fra Damtjern og Gullaug i Lier som ikke har kjent forekomst av salamander (ikke avmerket på kartet).

2.2 Uttesting av metode

Ved å teste ut ulike filtreringsmetoder og oppbevaring av filtre tidlig i sesongen kunne vi redusere innsatsen og øke kvaliteten på prøvene tatt senere i prosjektet. Etter den første prøvetakingsrunden den 11. og 12. mai 2017 i Lahelldammen og Vivelstad evaluerte vi innsamlingsmetodikken. Vann fra de to utvalgte dammene er lett tilgjengelig, men det kan være stor variasjon mellom enkeltprøver tatt fra samme lokalitet til samme tid (illustrert i **figur 1.2**, Taugbøl et.al., akseptert manus i Vann 2018). Derfor er det viktig å samle vannprøver fra mange nok stasjoner fordelt over et representativt område i en dam. På begge lokalitetene ble det valgt ut 15 stasjoner langs kanten av dammen. På disse stasjonene ble det samlet inn 0,9-1,1 L vann i en oppsamlingskanne som rommet mellom 14,5-15,5 L vann. Fra denne oppsamlingskannen ble tre metoder utprøvd; 1) filtrering av 0.5 L vann gjennom et 0.45 µm filter (Thermo Scientific Neglene CN 145-0045 0,45 µm) som ble preservert i en ATL-buffer, 2) filtrering av 0.5 L vann gjennom samme 0,45 µm filter med lagring på silica kuler, 3) filtrering av 4 L vann gjennom et 2 µm glassfiberfilter (Merc Millipore glassfiber filter) og preservert i ATL-buffer (**tabell 2.1**). Denne metoden ble repetert for tre oppsamlingskanner i Lahelldammen og fire oppsamlingskanner i Vivelstad, se **tabell 2.1**. for variasjon mellom oppsamlingskanner mhp forfiltrering for å forsøksvis unngå celleklumper og omrøring i vannet ved utsetting av feller.

Tabell 2.1: Oversikt over metodetesting. Oppsett for prøvetakning innsamlet fra lokalitetene (Lok) Lahelldammen (Lah.) og Vivelstad (Viv.), nummer på blandekanne (kanne), type forfilter ved forfiltrering, type filter brukt (filter), mengde vann filtrert (Filtrert, i L), preserveringsmåte, DNA kit ved isolering av DNA og om det var satte ut feller eller ikke i vannet før prøven til blandekannen ble tatt (merknader). Det ble filtrert to prøver fra hvert oppsett for hver blandekanne.

Lok.	Kanne	Forfilter	Filter	Filtrert	Preserv.	DNA kit	Merknader
Lah.	1	100 ul	0.45	0.5	1440 ATL	Qiagen	Stille vann
Lah.	1	100 ul	0.45	0.5	Silica	Qiagen	Stille vann
Lah.	1	100 ul	2	4	4500 ATL	MP BioM.	Stille vann
Lah.	2	ingen	0.45	0.5	1440 ATL	Qiagen	Satt ut feller
Lah.	2	ingen	0.45	0.5	Silica	Qiagen	Satt ut feller
Lah.	2	ingen	2	4	4500 ATL	MP BioM.	Satt ut feller
Lah.	3	ingen	0.45	0.5	1440 ATL	Qiagen	Alle feller ute
Lah.	3	ingen	0.45	0.5	Silica	Qiagen	Alle feller ute
Lah.	3	ingen	2	4	4500 ATL	MP BioM.	Alle feller ute
Viv	1	100 ul	0.45	0.5	1440 ATL	Qiagen	Stille vann
Viv	1	100 ul	0.45	0.5	Silica	Qiagen	Stille vann
Viv	1	100 ul	2	4	4500 ATL	MP BioM.	Stille vann
Viv	2	100 ul	0.45	0.5	1440 ATL	Qiagen	Stille vann
Viv	2	100 ul	0.45	0.5	Silica	Qiagen	Stille vann
Viv	2	100 ul	2	4	4500 ATL	MP BioM.	Stille vann
Viv	3	100 ul	0.45	0.5	1440 ATL	Qiagen	Stille vann
Viv	3	100 ul	0.45	0.5	Silica	Qiagen	Stille vann
Viv	3	100 ul	2	4	4500 ATL	MP BioM.	Stille vann
Viv	4	100 ul	0.45	0.5	1440 ATL	Qiagen	Alle feller ute
Viv	4	100 ul	0.45	0.5	Silica	Qiagen	Alle feller ute
Viv	4	100 ul	2	4	4500 ATL	MP BioM.	Alle feller ute

2.3 DNA ekstraksjon og ddPCR

DNAet oppsamlet i 0.45 µl filtrere ble isolert ved hjelp av DNA Blood and Tissue kit (Qiagen) mens det ble brukt FastDNA™ SPIN kit (MP Biomedicals) for glassfiberfiltrere. Dette er isoleringskit som tidligere har vist seg å gi god DNA-kvalitet og kvantitet fra vannprøver (Fossøy et al. 2017). For å detektere, samt kvantifisere stor og liten salamander ble det kjørt ddPCR på artsspesifikke primere. ddPCR er en PCR metode som gir en absolutt måling av DNA molekyler i prøven. I motsetning til qPCR (kvantitativ PCR) der prøven kjøres i en reaksjon og konsentrasjonen av DNA-innputtet måles ved avlesning av økt PCR-produkt på en kurve, vil prøven i ddPCR deles opp i inntil 20 000 små oljedråper der det i hver oljedråpe foregår en PCR-reaksjon. Etter endt PCR-reaksjon blir hver dråpe avlest som et positiv (1) eller negativt (0) resultat (ingen DNA molekyler i dråpen).

Det er flere fordeler med en ddPCR analyse, både at resultatene er lite påvirket av effektiviteten til PCR-reaksjonen og de genetiske markørene og at flere PCR-reaksjoner kan slås sammen slik at man kan få bedre avleste prøver mhp totalkonsentrasjon av originalt DNA-innputt. Ved å kombinere flere kjøringar vil man anta at antall DNA-kopier per dråpe vil danne en Poisson fordeling gitt ved:

$$\text{Ligning 1) } [DNA] = \frac{-\log(\text{antall negative dråper}) / (\text{totalt antall dråper})}{\text{dråpevolum}}$$

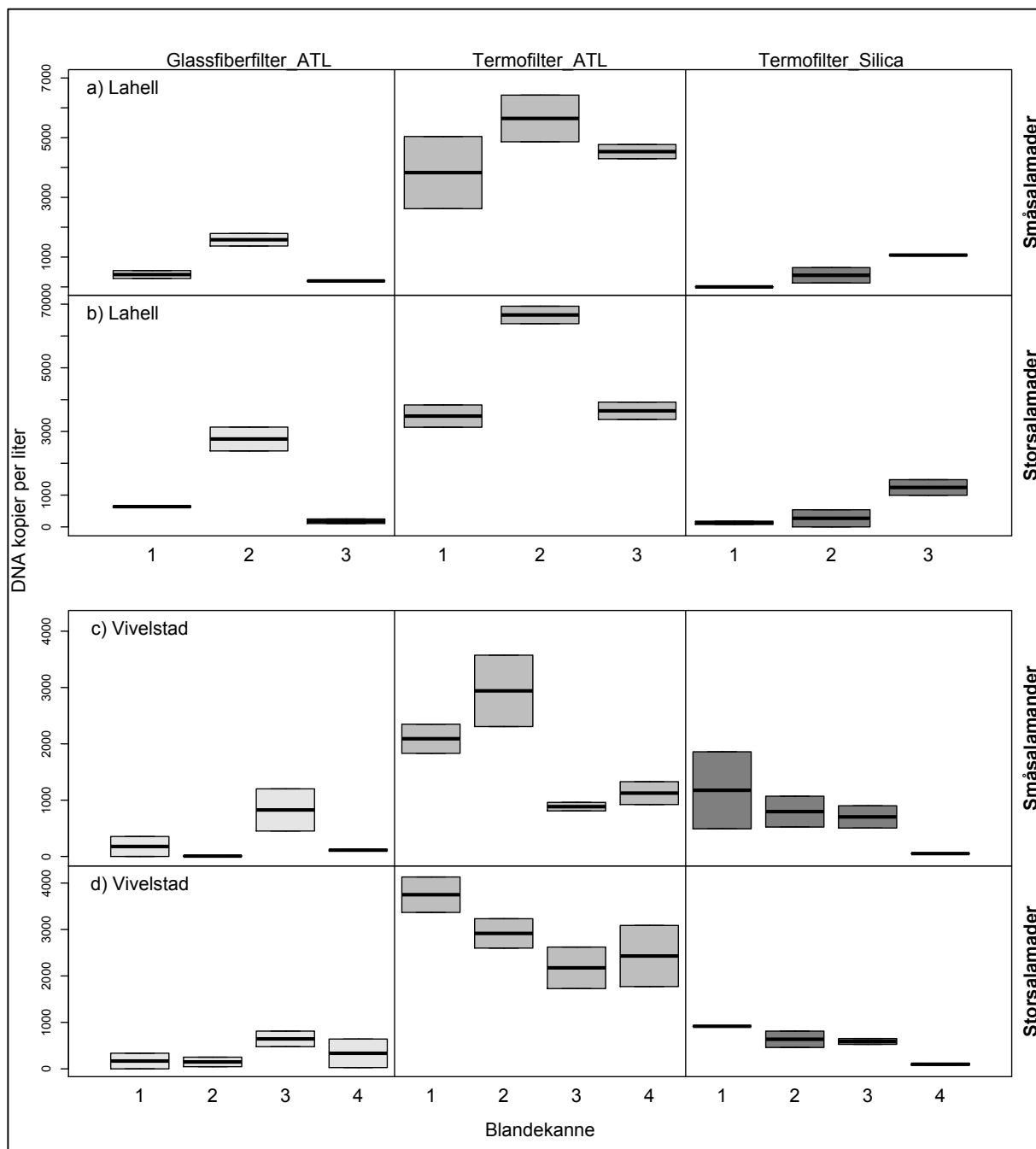
Videre, for å kunne kontrollere for filtrert vannvolum og mengde DNA-ekstrakt brukt i hver analyse har vi laget et mål på antall DNA kopier per liter gitt ved:

$$\text{Ligning 2) } DNA \text{ kopier pr L vann} = \frac{[DNA] / (\text{ddPCR volum} * \text{DNA ekstrakt volum})}{\text{mengde vann}}$$

Ved å bruke ligning 2) oppnås et standardisert mål på DNA-mengde i prøve kontrollert for filtrert vannvolum, samt ulike volumendringer og fortyninger i lab. Det er spesielt viktig å kontrollere for mengde vann filtrert for prøver samlet inn i salamanderdammer da dette ofte er vann med variabelt innhold av partikler. Vi bruker derfor dette målet gjennomgående i denne rapporten for å gjøre tolkningen av dataene lettere. For å unngå falske positive signaler, har vi satt en grense på minst fire positive dråper i analysen. Alle prøver med 1-3 positive dråper er altså antatt negative i våre analyser. Dette er en grense som har blitt satt ut i fra tidligere erfaringer fra negative kontroller på laben der det har vist seg at disse noen ganger kan ha en eller i sjeldne tilfeller to positive dråper.

2.4 Resultater fra metodeutprøving

Resultater fra testrunden i Lahelldammen og Vivelstad viste at metoden som gav de høyeste verdiene for salamander var filtrering av 0.5 L vann igjennom et 0.45 µl termofilter lagret i ATL-buffer før DNA-ekstraksjon ($F_{2\&81} = 57.84$, $P < 0.001$ for begge lokaliteter og arter slått sammen) se **figur 2.2** for en visuell oppsummering av lokalitetene oppdelt i art). Denne metoden gav i snitt 2708.5 og 2699.5 flere DNA molekyler per liter sammenlignet med henholdsvis glassfiberfilter og termofilter lagret på silicakuler, selv om det ble filtrert hele 4 liter igjennom glassfiberfilteret.

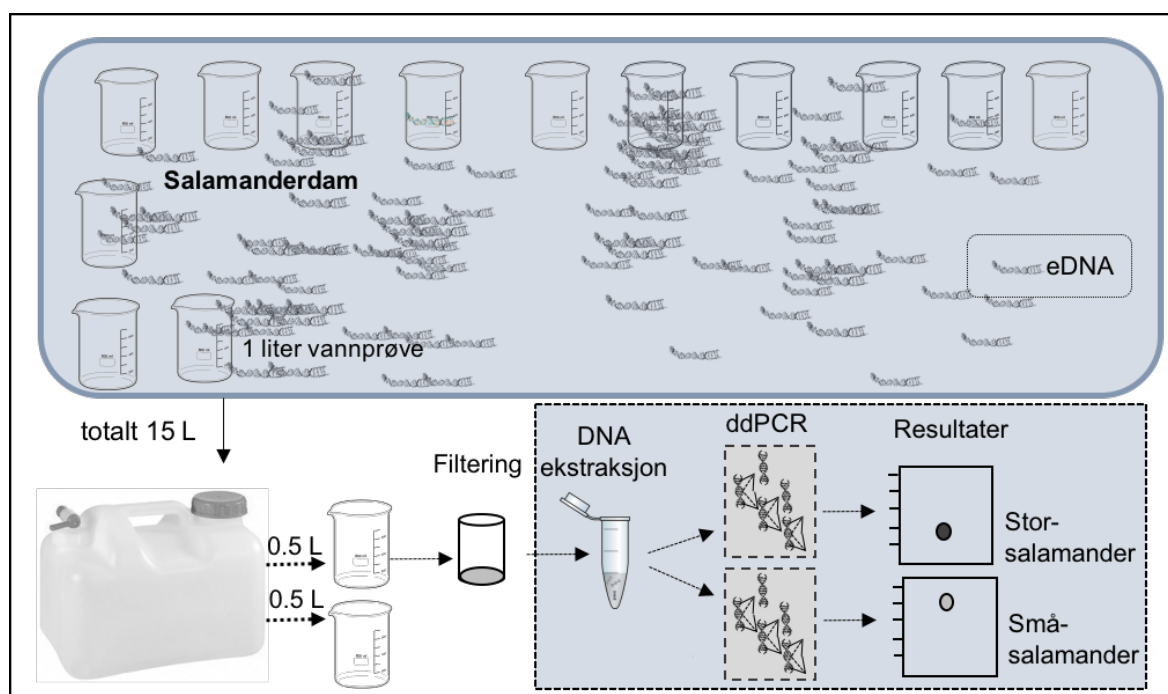


Figur 2.2. Resultater fra metodeutprøving. Det ble tatt vannprøver fra Lahelldammen (a og b, totalt 3 blandekanner) og Vivelstad (c og d, totalt 4 blandekanner), der tre ulike oppsamlingsmetoder for DNA ble benyttet; glassfiberfilter lagret i ATL buffer, termofilter lagret i ATL eller silicakuler (se **tabell 2.1** for oversikt). Som det kommer frem av plottene gav filtrering av vann igjennom et termofilter som så ble lagret på ATL buffer best resultat, og dette ble derfor standardisert som innsamlingsmetode for samtlige dammer samlet inn for denne rapporten. Begge dammene er plottet på samme skala slik at de to artene blir direkte sammenlignbare.

2.5 Standardisering av innsamlingsmetode

Innsamlingsmetoden for samtlige dammer samlet inn for denne rapporten ble som følger:

- Det ble samlet inn 1L vann fra 15 stasjoner til en oppsamlingskanne langs samme bredden der det tidligere var fangstet salamander med ruser.
- Innsamlingen av vannet ble gjennomført i «uforstyrret» vann, slik at det blir minst mulig variasjon mellom dammene. Det ble samlet inn 1-3 oppsamlingskanner per dam.
- Grunnen til at det samles inn vann fra flere stasjoner er å forsøksvis redusere naturlig variasjon mellom prøver, se **figur 1.2 og 2.3** der målebeger 2 som punktprøve ville gitt en unøyaktig lav verdi av DNA konsentrasjon for dammen, mens målebeger 9 som punktprøve ville gitt en unøyaktig høy verdi.
- Fra hver oppsamlingskanne ble det tatt ut to halvliter (0.5 L) vann som ble filtrert igjennom hvert sitt 0.45 µl termofilter ved hjelp av en manifoil og en peristaltpumpe drevet av et bilbatteri, se **figur 2.4**.
- Hvis filteret tettet seg før det 0.5 L hadde blitt filtrert ble mengde filtrert vann notert.
- Filtrene ble lagret på 1400 ATL buffer i 2 ml merkede eppendorfrør.



Figur 2.3: Illustrasjon av innsamlingsmetode. Det ble samlet inn 1 liter vann fra 15 stasjoner i samme område av dammen som det settes ut ruser ved overvåkning. Ved å fordele innsamlingen av vann over 15 stasjoner var målet å jevne ut eventuelle opphopninger av miljø-DNA, og forhåpentligvis få gode repeterbare resultater. Stasjonene for innsamling av vann ble valgt ut der det var forholdsvis enkelt å samle inn langs kanten uten å få med for mye partikler, og ble jevnt fordelt langs damkanten. Ved innsamling av flere oppsamlingskanner (1-3 per dam per runde) ble det samlet inn vann fra de samme punktene, med noe naturlig variasjon i valg av nøyaktig stasjon i vannet. Av hver oppsamlingskanne ble det tatt ut 0.5 L vannprøver (2 per kanne) som ble filtrert i felt og lagret på ATL-buffer. Prøvene ble senere ekstrahert for miljø-DNA og kjørt på ddPCR med kjente markører for små- og storsalamander i lab. Merk, det illustrerte miljø-DNAet kan komme fra alle artene som har vært i dammen ved et tidligere tidspunkt eller oppholder seg i dammen ved prøvetagnings-tidspunktet.

2.6 Innsamlingsplan av vann igjennom sesongen

For å teste om innsamlingsmetoden gav repeterbare resultater, ble resultatene sammenlignet mellom prøver tatt fra samme oppsamlingskanne og mellom to eller tre oppsamlingskanner innsamlet fra samme lokalitet ved samme tidspunkt (**Tabell 2.2**). Gjennomsnittsdata fra de ulike oppsamlingskannene som var samlet inn fra de samme lokalitetene ved ulike tidspunkt ble også sammenlignet for å se hvordan konsentrasjonen av miljø-DNA endret seg gjennom sesongen.

Antall dyr i dammen forventes å være konstant igjennom innsamlingsperioden for dette prosjektet. For å redusere ujevnhet av partikler mellom replikerte prøver ble det også testet ut om grovfiltrering gjennom et tefilter kunne jevne ut eventuell variasjon mellom prøver. Grunnen til at dette ble testet ut var at det ble observert en nesten konsekvent økt mengde partikler i et av filterene. Dette kom av at det først ble tappet en liter fra oppsamlingskannen, som senere ble delt i to der hovedparten av partiklene ble igjen i det første målebegeret. En betydelig økt andel biologiske partikler i en av prøvene kan f.eks. kanskje gi utslag i redusert mengde isolert DNA av forsøksorganismene der en forventer forholdsvis små mengder DNA i utgangspunktet. Innsamlingsdata for de ulike dammene er oppsummert i **Tabell 2.2**.



Figur 2.4 Bilder fra feltarbeid. a) Lahelldammen, b) Vivelstad, c) replikate vannprøver fra samme oppsamlingskanne, d) illustrerer målefeil ved oppmåling, e) oppsett i bil med oppsamlingskanne i forkant av bilen, manifoil og filter på hvit kasse med utløpslange drevet av et bilbatteri.

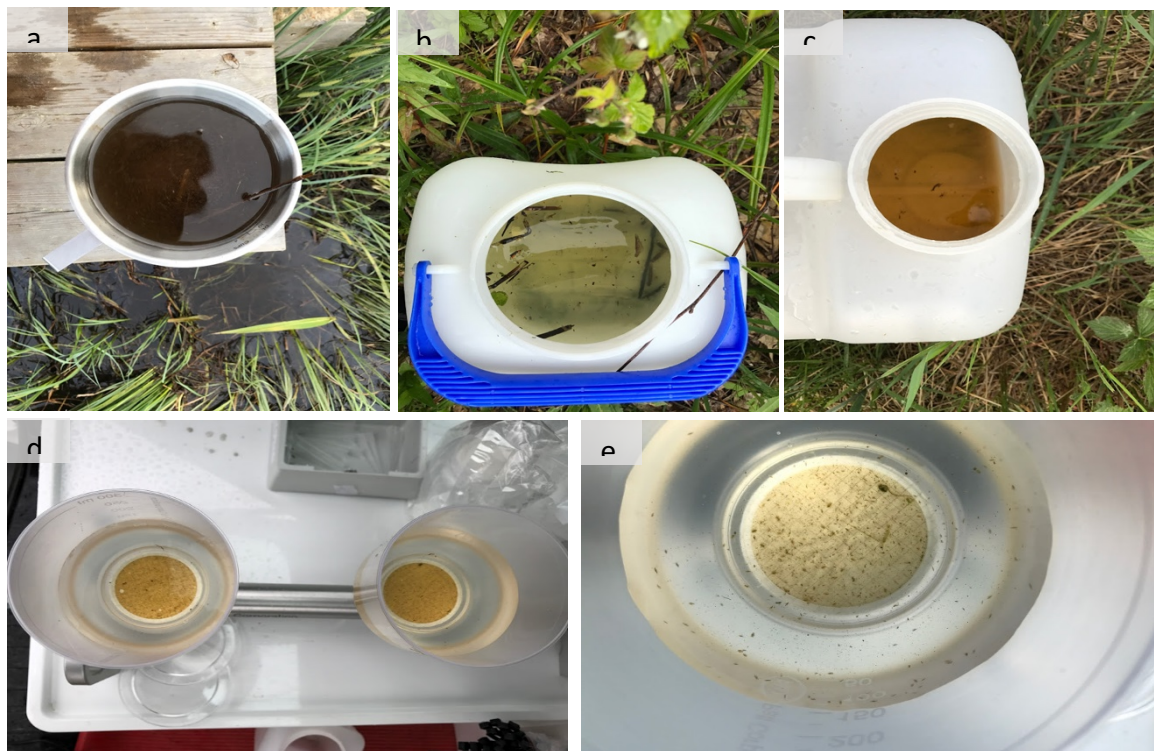
Tabell 2.2: Oversikt over lokalitetene. Navn på dammene, område (1= Lier, 2= Akershus) og innsamlingsrunder (1-4) inndelt i faktiske datoer. Fargekode indikerer antall oppsamlingsskanner og replikate prøver som ble samlet inn på hver lokalitet; oransje= 3 oppsamlingsskanner og 6 prøver, gul) 2 oppsamlingsskanner og 4 prøver, grå= 1 oppsamlingsskanne og 2 prøver.

Innsamlingsrunde:		1		2			3			4
Navn	Område	11.05	12.05	20.05	21.05	22.05	30.05	31.05	01.06	16.06
Brastad	1							X		
Funnesdal	1						X			
Grette	1							X		
Grurandsrud	1						X			
Haug	1							X		
Holsmark	1						X			X
Kittilsrud	1						X			
Korsrud	1							X		
Lahelldammen	1	X				X		X		X
Nedre Svere	1						X			X
Rønningen Meren	1						X			
Valstad	1						X			X
Vestre Renskau	1						X			X
Vivelstad	1		X			X		X		X
Øvre Stabekk	1							X		
Belsjødammen	2				X					
Fjøser	2			X						X
Garderenga	2								X	
Horgen	2			X						
Knardal Vestre	2								X	
Knardal Østre	2								X	
Lille Nyborgsdam	2								X	
Ottarsrud	2				X				X	X
Røer Gård	2								X	
Rånåsdammen N.	2								X	
Rånåsdammen S.	2								X	
Solberg S	2			X						
Tokerud	2				X					
Østre Glenne	2								X	
Østre Støkken	2									X

3 Resultater

3.1 Variasjon i miljø-DNA konsentrasjon mellom prøver og kanner

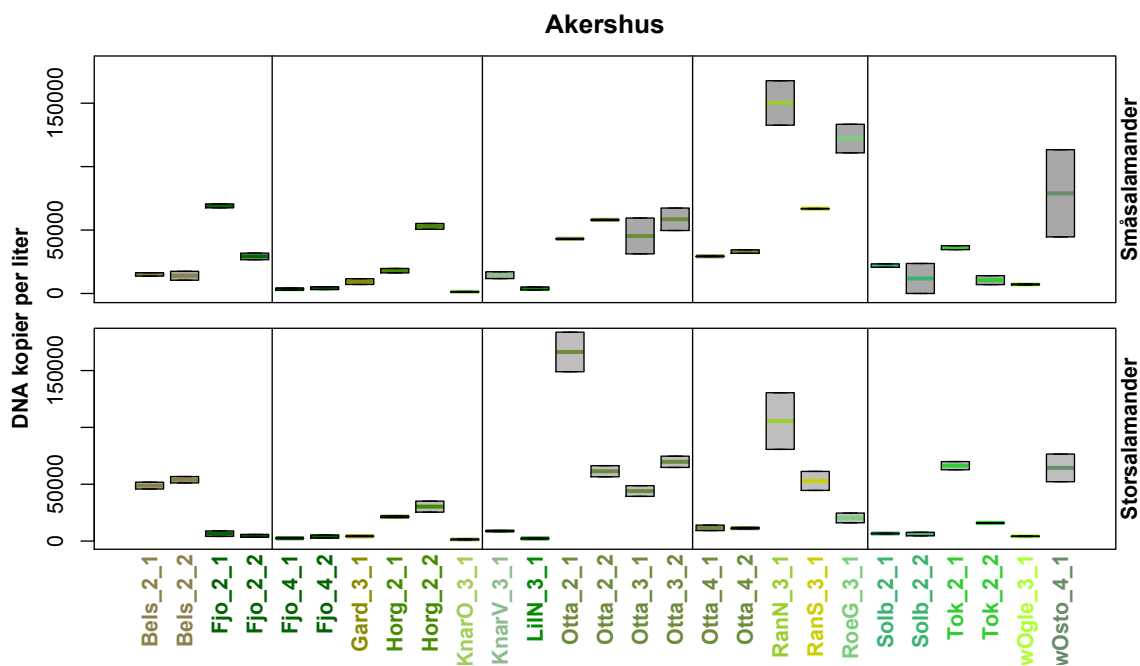
Det var stor variasjon i hvor enkelt det var å samle inn vann fra dammene uten å få med uønskede partikler, som leirpartikler, planter og zooplankton. Vannkvaliteten varierte fra dam til dam mht. farge (**figur 3.1**).



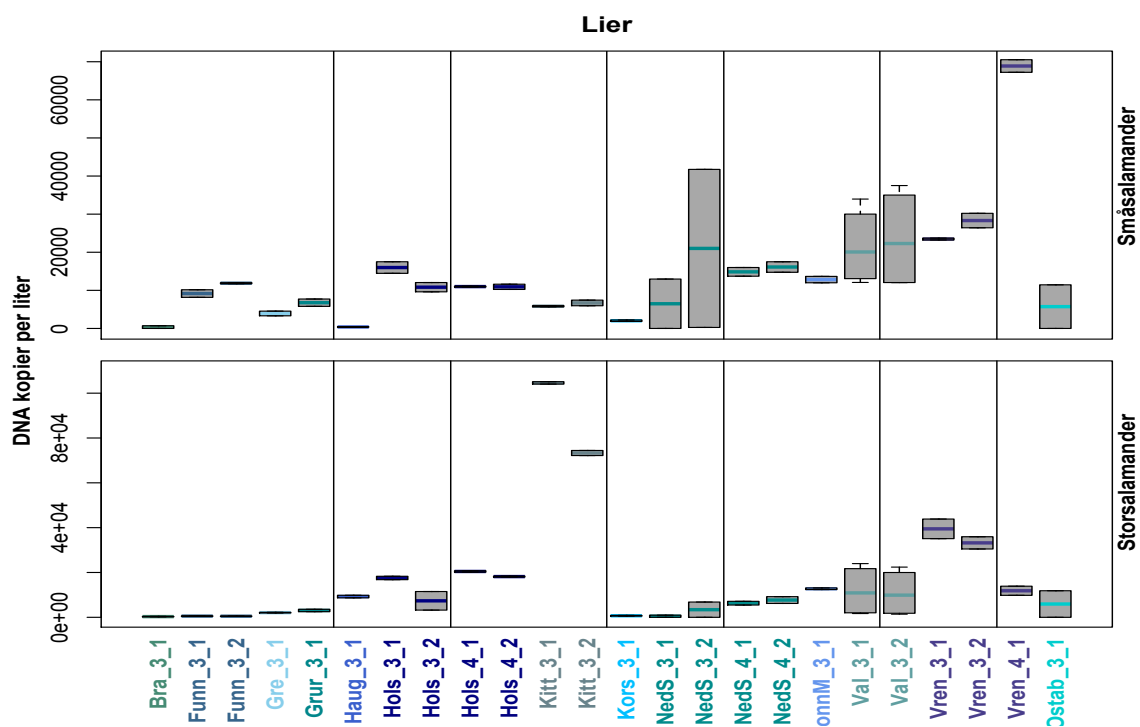
Figur 3.1 Illustrasjon over vannkvalitet og farge i damvannet som ble innsamlet til filtrering. a) meget mørk farge på vannet (Rånåsdammen S), b) mye partikler i vannet, c) brunfarget vann, d) farge på filtere etter filtrering og e) zooplankton i vannet.

Det ble samlet inn minimum en oppsamlingskanne med to filtrerte prøver per lokalitet. Resultatene fra hver kanne er plottet i **figur 3.1- 3.4** og gjennomsnittene med standardfeil er rapportert i **Vedlegg 1**. Variasjonen i gjennomsnittlig miljø-DNA per liter i Akershus varierte fra 1 352 (Knardal øst) til 15 0162 (Rånåsdammen Nord) for småsalamander og 1 430 (Knardal øst) til 16 6364 (Ottarsrud) for storsalamander. I Lier varierte mengde miljø-DNA fra 356 (Brastad) til 68 880 (Vestre Renskau) for småsalamander og fra 143 (Vivelstad) til 10 4584 (Kittilsrud) for storsalamander.

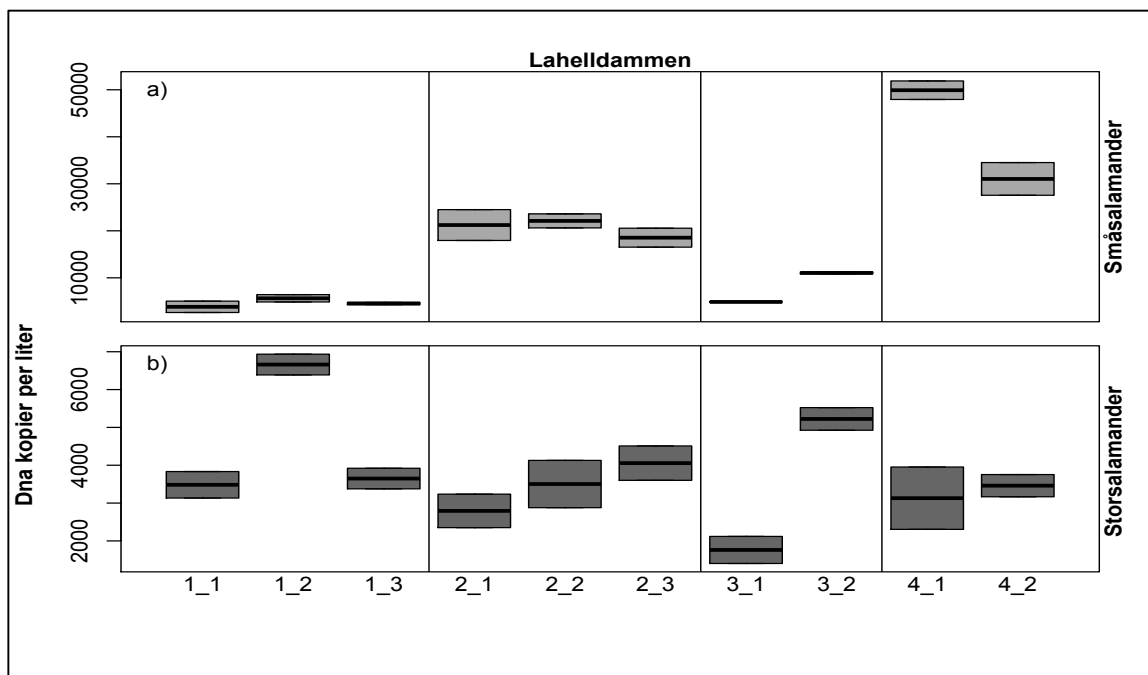
Det var stor variasjon i standardfeil mellom prøver tatt fra samme kanne, der stor standardfeil indikerer en høyere usikkerhet i gjennomsnittet. Som det kommer frem av **figur 3.1**, er det spesiell stor spredning i prøvene tatt fra Østre Støkken ($\pm 34\ 370$), Rånåsdammen Nord ($\pm 17\ 538$) og Ottarsrud_3_1 ($\pm 14\ 136$) for småsalamaner, og Rånåsdammen Nord ($\pm 24\ 920$), Ottarsrud 2_1 ($\pm 17\ 407$) og Østre Støkken ($\pm 12\ 170$) for storsalamander. Det at de samme lokalitetene går igjen med stor spredning for både småsalamander og storsalamander reflekterer trolig klumpete materiale, slik at opphopninger av "DNA-klumper" øker konsentrasjonen.



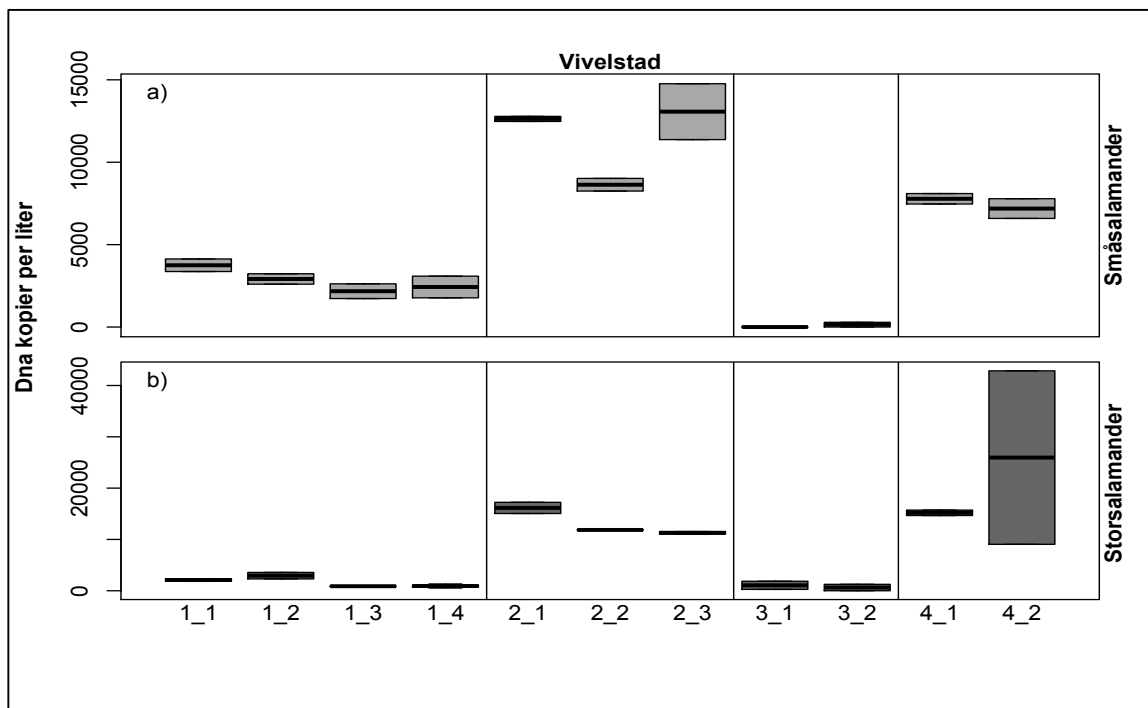
Figur 3.2 Resultater fra vannprøver i Akershus oppgitt som kopier av DNA per liter for småsalamander og storsalamander plottet på samme skala. Alle lokalitetene er plottet på alfabetisk rekkefølge, med indikasjon til innsamlingsrunde og oppsamlingskanne på x-aksen, slik at navnet på dammen kommer først, så innsamlingsrunde så oppsamlingskanne. Figuren er oppdelt i horisontale støttelinjer.



Figur 3.3 Resultater fra vannprøver i Lier oppgitt som kopier av DNA per liter for småsalamander og storsalamander, merk, resultatene er ikke plottet på samme skala. Resultatene fra Lahelldammen og Vivelstad er illustrert i egen figur (**figur 3.4 og 3.5**). Alle lokalitetene er plottet på alfabetisk rekkefølge, med indikasjon til innsamlingsrunde og oppsamlingskanne på x-aksen, slik at navnet på dammen kommer først, så innsamlingsrunde så oppsamlingskanne. Figuren er oppdelt i horisontale støttelinjer.



Figur 3.4 Resultater fra vannprøver i Lahelldammen oppgitt som kopier av DNA per liter for a) småsalamander og b) storsalamander. Prøvene er oppdelt i innsamlingsrunde (horisontale støttelinjer) og oppsamlingskanne på x-aksen (innsamlingsrunde oppsamlingskanne). Innsamlingsrunde 1-4 var henholdsvis 11.05, 22.05, 31.05 og 16.06 (se **tabell 2.1**).

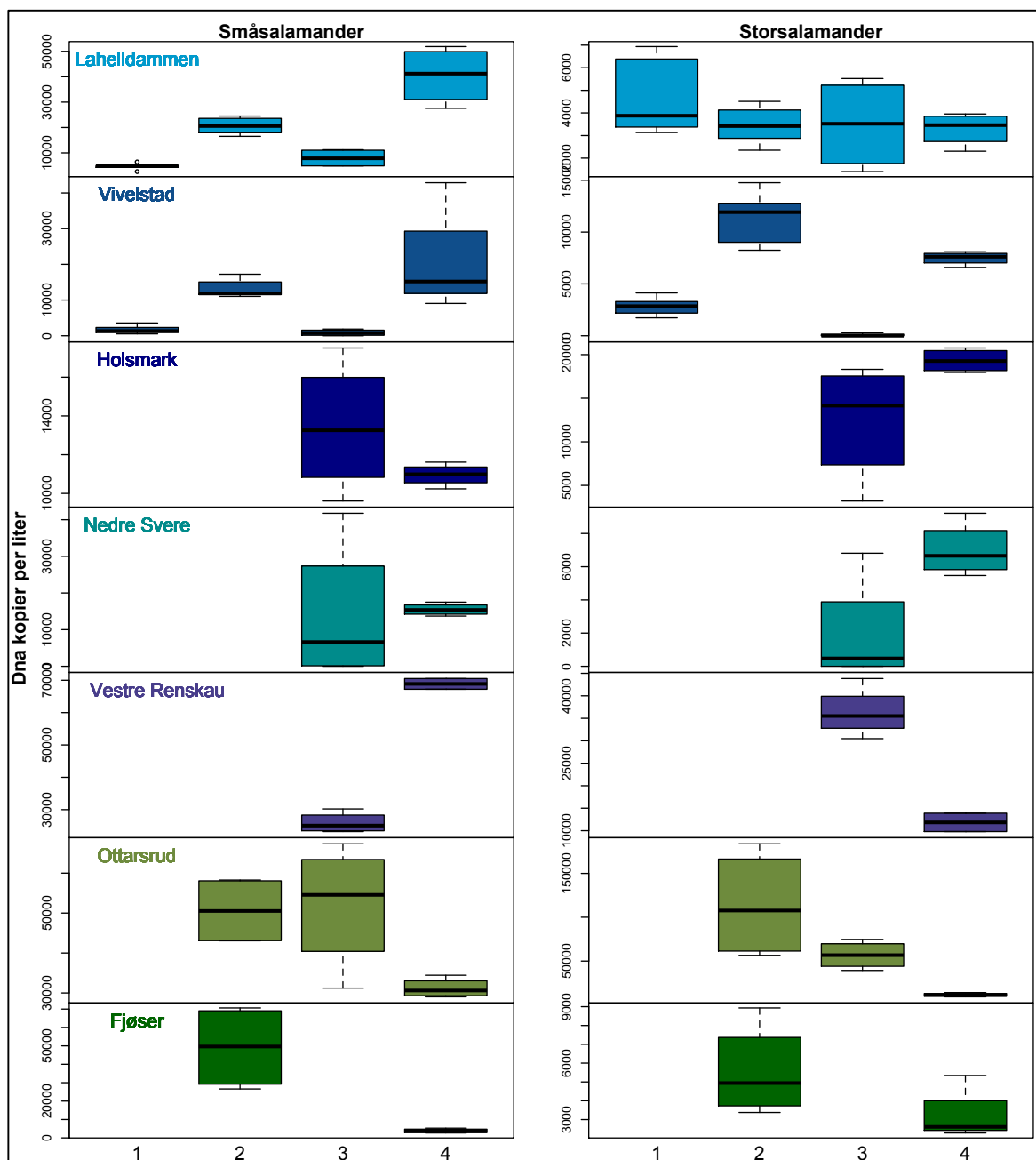


Figur 3.5 Resultater fra vannprøver i Vivelstad oppgitt som kopier av DNA per liter for a) småsalamander og b) storsalamander. Prøvene er oppdelt i innsamlingsrunde (horisontale støttelinjer) og oppsamlingskanne på x-aksen (innsamlingsrunde_ oppsamlingskanne). Innsamlingsrunde 1-4 var henholdsvis 11.05, 22.05, 31.05 og 16.06 (se **tabell 2.1**).

3.2 Variasjon i dammene over tid

Det skjer en god del endringer i en dam fra sen vår til tidlig sommer. Det blir blant annet varmere, og når det gjelder temperatur var forventningen at mengde miljø-DNA til småsalamander og storsalamander skulle øke med økt temperatur pga. økt aktivitet hos dyrene.

Det var kun et utvalg av dammer som ble prøvetatt flere ganger, se **tabell 2.2**. Det ble samlet inn fire ganger i Lahelldammen og Vivelstad, tre ganger i Ottarsrud og to ganger i Holsmark, Nedre Svere, Vestre Renskau og Fjøser (**figur 3.6**).



Figur 3.6 Variasjon av DNA kopier per liter for småsalamander og storsalamander gjennom sesongen for de lokalitetene som er samlet inn flere enn en gang. Boksplottene summerer opp innsamlingsrunden (1-4) som 25-75% kvartilene (boksene), medianen er tegnet opp som en horisontal linje og 95% konfidensintervallene som stiplede linjer.

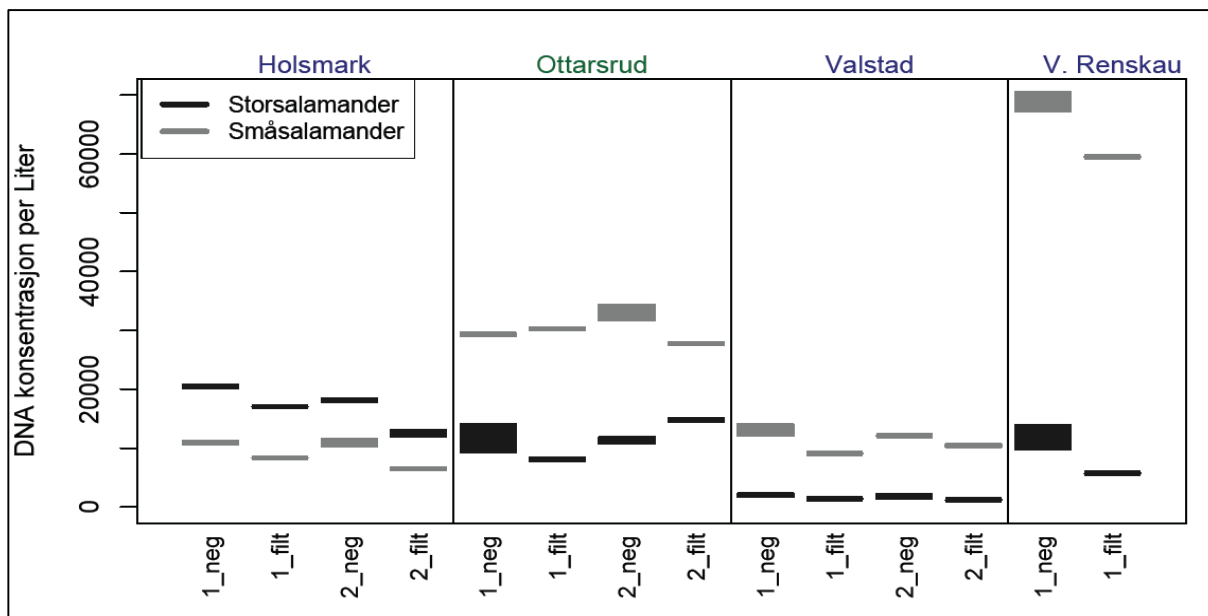
3.3 Variasjon mellom prøver før og etter grovfiltrering av te-filter

Siden det ofte ble ujevnt med bunnfall av diverse organisk materiale i de to filtrene som ble filtrert ut av samme oppsamlingskanne, ble det gjort et forsøk på å redusere potensiell variasjon med filtrering av vann igjennom et engangs tefilter før filtrering. Dette ble gjort for totalt 8 prøver, som ble sammenlignet mot totalt 12 prøver innsamlet i de samme dammene på samme tidspunkt (16.06).

Ut i fra **tabell 3.1** og **figur 3.7** kan det se ut til at det er en svak tendens til at filtrering av vann igjennom et tefilter gir noe lavere DNA konsentrasjoner (gjennomsnittlig lavere antall DNA kopier var 2 769 for småsalamander og 6 709 for storsalamander for alle lokaliteter), men dette var ikke signifikant ($P=0.28$, $R^2= 16\%$ når art er tatt med som forklaringsvariabel). Filtrering ga nesten alltid høyere standardfeil (**tabell 3.1**), men dette kommer av at det ble tatt flere prøver uten te-filtrering.

Tabell 3.1. Gjennomsnitt (Gjsnitt) og standardfeil av DNA konsentrasjon for småsalamander (smås) og storsalamander (stors) ved direkte filtrering av vann (neg) og filtrering av vann (filtr) igjennom et te-filter, oppsummert på lokalitet (blandekanner slått sammen).

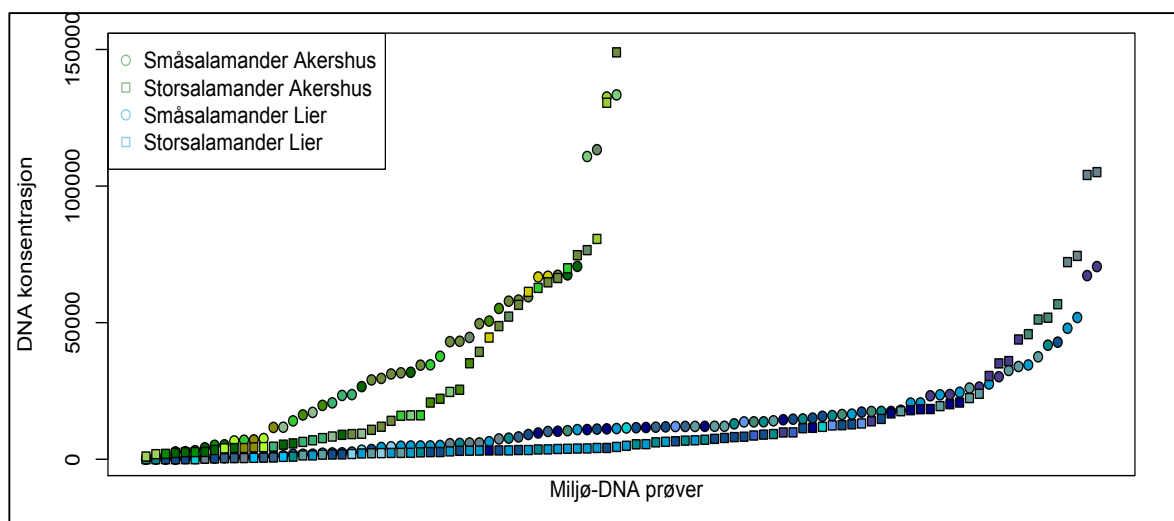
		Holsmark		Ottarsrud		Valstad		V.Renskau	
		Smås.	Stors.	Smås.	Stors.	Smås.	Stors.	Smås.	Stors.
Gjsnitt	Neg	10 958	19 312	31 176	11 486	12 560	1 899	68 880	11 844
	Filtr	7 113	14 047	29 034	11 443	9 974	1 229	59 489	5 678
Standardfeil	Neg	286	676	1 224	1 020	504,0	217	1 654	2 038
	Filtr	631	1 533	1 250	3 349	469	49	-	-



Figur 3.7. Resultater uten (neg) og med forfiltrering (filt) av te-filter for storsalamander (svart) og småsalamander (grå) i fire ulike lokaliteter; Holsmark, Ottarsrud, Valstad og Vestre Renskau. Nummerering 1 og 2 på x-aksen refererer til oppsamlingskanne 1 og 2 samlet inn ved samme innsamlingstidspunkt 4 (16.juni). Som det kommer frem av figuren er det en meget svak tendens (ikke signifikant) til at filtrering gir et noe lavere resultat, men dette har også høyere standardfeil grunnet skjevt antall prøver med og uten tefiltrering (se tabell 3.1.).

3.4 Forskjell mellom Akershus og Lier i mengde miljø-DNA

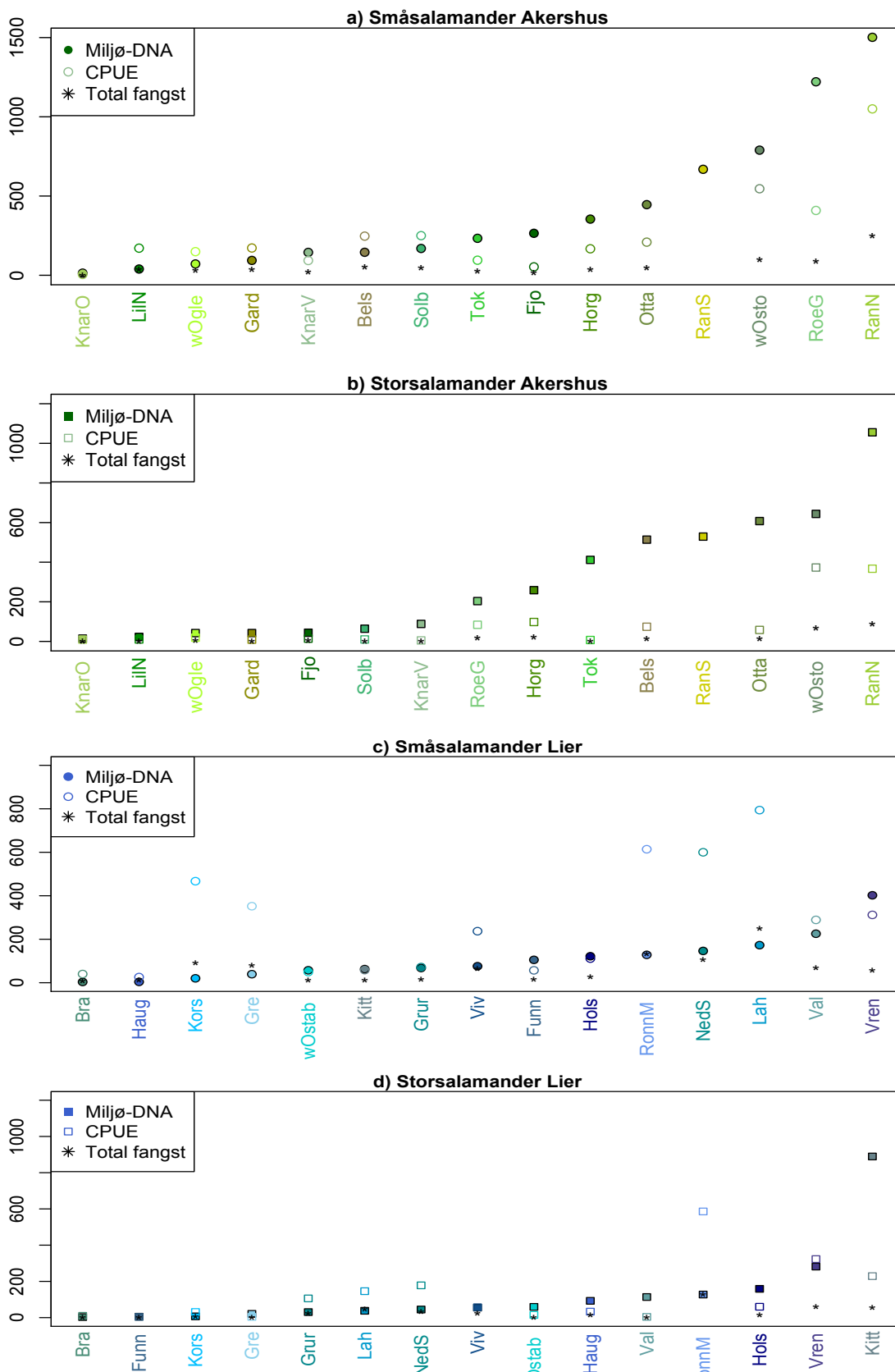
Akershus og Lier har noe ulike mengder av miljø-DNA for de to salamanderartene (**figur 3.7-3.9**), da gjennomsnittet av DNA molekyler per liter i Akershus ligger på 37 330 ($\pm 5\,077$) for småsalamander og 33 181 ($\pm 5\,301$) for storsalamander, mens de samme tallene er 13 613 ($\pm 1\,448$) og 11 123 ($\pm 1\,944$) i Lier (\pm standardfeil), der Kittilsrud drar opp snittet veldig for storsalamander (gjennomsnitt på 88 943) og gjennomsnittet uten Kittilsrud er på 7 411 DNA kopier per liter. Gjennomsnittlig mengde av miljø-DNA for de to artene reflekterer gjennomsnittlig tall for fangst per innsats i 2017, som ligger på 0,258 og 0,081 for småsalamander og storsalamander i Akershus, og 0,272 og 0,0120 i småsalamander og storsalamander Lier (tall for fangst per rusetime, CPUE, er hentet fra Dervo m. fl. 2017).



Figur 3.7 plott av de ulike miljø-DNA prøvene, sortert på DNA konsentrasjon av småsalamander (sirkler) og storsalamander (firkanter) i Akershus (grønn) og Lier (Blå). Som det kommer frem av figuren har Akershus et høyere gjennomsnitt av miljø-DNA sammenlignet med Lier.

3.5 Sammenligninger mellom miljø-DNA og rusefangstdata

Ved å plote stigende miljø-DNA konsentrasjon (gjennomsnitt for alle prøver samlet inn for hver enkelt dam) sammen med fangsttall (CPUE; fangst per rusetime/innsats) for småsalamander og storsalamander i Akershus og Lier (**figur 3.8**), er det to hovedtrender som kommer frem; dammene med lav miljø-DNA konsentrasjon har også lave fangstverdier (CPUE), og for dammene med høy miljø-DNA konsentrasjon er det større variasjon mellom miljø-DNA og fangst. I Akershus er CPUE alltid lavere enn miljø-DNA konsentrasjonen, mens det varierer i Lier. Rusefangsten for 2017 i Lier var under mer optimale forhold temperaturmessig enn det i Akershus, så gitt de høyere anslagene med miljø-DNA kan det være at rusefangsten i Akershus er lavere enn de reelle populasjonsstørrelsene, mens fangstdataene for Lier kan gi indikasjon på at populasjonsstørrelsen er høyere. Det er midlertidig viktig å understreke at dette er data fra en sesong, der miljø-DNAet for en dam er oppgitt som et gjennomsnitt av alle innsamlede prøver, mens det for fangstdataene kun er vist data for et år. For å få bedre oversikt over hvordan mengde miljø-DNA til de to salamanderartene henger sammen med antall individer må vi få mer data på faktiske populasjonsstørrelser i flere dammer enn de to vi har data på i dag (Lahelldammen og Vivelstad).



Figur 3.8 Sammenligninger mellom miljø-DNA (i dl., fylte punkter), CPUE (ganget med 1000, åpne punkter) og faktiske fangsttall på antall individer (*), plottet som stigende miljø-DNA konsentrasjoner.

4 Diskusjon

4.1 Variasjon mellom prøver og oppsamlingskanner

En av utfordringene med å samle inn vannprøver er å få tatt en prøve som representerer kilden det er tatt fra. Tidligere testing viste at punktprøver tatt på samme tid og sted kunne være svært variable med hensyn på miljø-DNA konsentrasjonen for de to salamanderartene (Taugbøl et al., akseptert manus i Vann 2018). Årsakene til dette er trolig flere, der enkeltårsaker kan være klumpvis fordeling av salamander som kan gi opphopninger av miljø-DNA enkelte steder, tilfeldig oppsamling av celleklumper eller tilfeldig innsamling av vann som ikke inneholder salamander i det hele tatt, selv om de er tilstede i dammen.

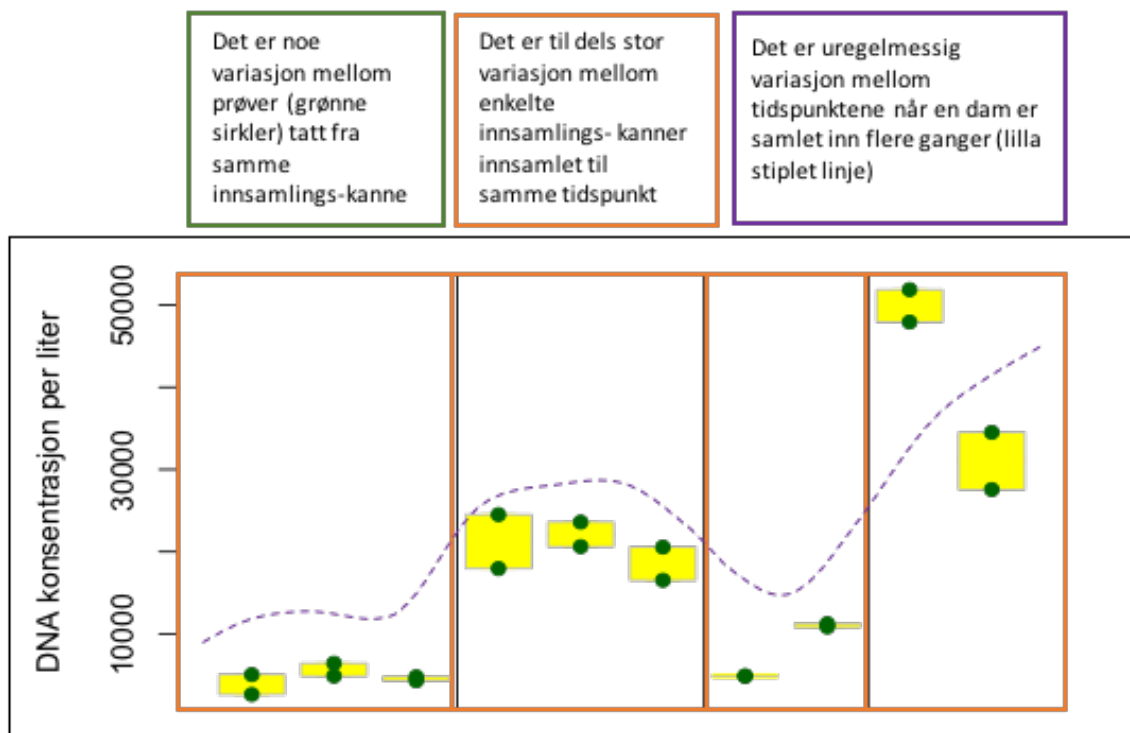
Ved å utvikle en ny innsamlingsmetode, der vi samlet inn vann fra flere punktprøver opp i en oppsamlingskanne, klarte vi å redusere variasjonen betraktelig. Variasjonen mellom prøver tatt fra samme oppsamlingskanne var stort sett veldig liten for prøvene samlet inn for 2017. Det samme var tilfellet for de ulike oppsamlingskannene samlet inn på samme tidspunkt. Det er derfor trolig forholdsvis lite å hente på å samle inn mange samlekanner i felt. For framtidig innsamling vil det antakelig være mest å hente på å unngå målefeil og variasjon i mengde filtrert vann, ved at det f.eks. heller blir standard å veie vannet man filtrerer. Det er også til dels stor variasjon mellom prøver kjørt på ddPCR fra samme prøve (ikke testet ut for dette prosjektet). En måte å teste ut replikerbarheten til prøvene kan være å kjøre prøvene flere ganger i lab, f.eks. i ulike fortyninger for å se om dette kan redusere variasjon mellom kjøringene. Se grønne punkter på **figur 4.1** for en oppsummering av variasjon i prøvene og gule bokser på **figur 4.1** for en oppsummering av variasjon mellom oppsamlingskannene.

4.2 Variasjon mellom prøvetidspunkt

Miljø-DNA frigitt fra en organisme blir værende i vannmiljøet en viss tid (Rees et al. 2014). Faktorer som påvirker hvor lang tid DNAet oppholder seg i vannmiljøet er blant annet mengde organiske og uorganiske partikler i vannet som DNAet kan feste seg på, ultrafiolett stråling (UV lys), nedbrytende bakterier og sopp og sammensetningen av bunnssubstratet (Andruszkiewicz et al. 2017, Barnes et al. 2014). Flere studier har vist at lengre DNA-sekvenser er mer pålitelige når det kommer til hva som faktisk oppholder seg i miljøet, da korte DNA molekyler har lang levetid og kan påvises i lengre tid etter at organismen har forlatt området i forhold til lengre DNA fragmenter. Et eksempel på dette er fra storsalamander, der korte DNA fragmenter ble påvist så lenge som 2 uker etter at dyrene hadde blitt fjernet fra forsøksstankene (Thomsen et al. 2012), og opptil 4 uker for Amerikansk oksefrosk og stør (Dejean et al. 2011).

De fleste kjønnsmodne salamanderne er i dammen rundt to uker etter at isen har gått og antall individer er mer eller mindre konstant i dammen gjennom hele innsamlingsperioden (Dervo et al. 2012, Dervo et al. 2013). Det var derfor forventet at mengde miljø-DNA skulle øke gjennom sesongen fram mot parring, ved at økt aktivitet gitt økt temperatur skulle avgi mer DNA i perioden det ble samlet inn miljø-DNA for i denne rapporten (Buxton et al. 2017). Konsentrasjonen av miljø-DNA for dammene i dette prosjektet følger ingen slik trend, og er til dels ulik for de to artene (**figur 3.6**). Av dammene vi samlet inn flere enn 3 ganger var det kun Lahelldammen og Vivelstad som var fri for patogetet Bd, der en infeksjon av Bd i seg selv kan ha påvirket mengde miljø-DNA av småsalamander og storsalamander i dammen (Taugbøl et al. 2017). Videre er det kun storsalamander i Lahelldammen som har en

forholdsvis jevn mengde miljø-DNA gjennom innsamlingsperioden (ikke økende som forventet), mens småsalamander og storsalamander i Vivelstad følger en "bølgete kurve" (se lilla stiplet linje i **figur 4.1**). Vi vet ikke hvorfor det er mindre miljø-DNA i innsamlingsrunde 3 i forhold til runde 2 i Lahelldammen og Vivelstad (**figur 3.6**), om det kan komme av at prøvene ble oppbevart på en annen måte eller at det reflekterer faktiske forhold som redusert aktivitet. Dette bør testes ut videre ved å samle inn flere dammer gjennom sesongen med kortere intervaller mellom innsamlingsrundene.



Figur 4.1 illustrerer en oppsummering av prøvevariasjonen for prøvene samlet inn i 2017. De grønne prikkene på figuren representerer en prøve fra en blande-kanne (gul), samlet inn ved fire ulike tidspunkt (oppdelt med lilla). Selv om det er noe variasjon mellom prøver tatt fra samme oppsamlingskanne, er den temporære variasjonen mye større.

4.3 Korrelasjon mellom miljø-DNA og felle-fangst

Selv om det er variasjon mellom resultatene for fangst per innsats og DNA kopier av småsalamander og storsalamander i dammene, er det til dels godt samsvar mellom dataene der det trolig er lav tetthet av individer (basert på erfaringer fra fellefangst). Ved direkte sammenligninger av trender for fellefangst og miljøDNA med hensyn på mengdeforholdet mellom de to artene ser dette ut til å stemme overens for de to metodene. Men, dette er trolig en forenkling av resultatene, både ved at småsalamander er omtrent halvparten så stor som storsalamander og slik trolig har lavere mengde miljøDNA i vannet per dyr på grunn av størrelsen alene, og ved at artene trolig har en ulik "lekkasje" av DNA. Dette er faktorer som bør testes ut videre i egnede forsøk, slik at mengde DNA og biomasse av dyr kan korreleres for i videre tester.

Totalt sett er det vanskelig å gjøre populasjonsberegninger på grunnlag av de dataene vi har i dag da vi ikke vet hvorfor miljø-DNA mengden varierer gjennom sesongen, eller hvor mye DNA hver art i gjennomsnitt avgir til miljøet. Det trengs flere dammer med tettere prøvetakning av miljø-DNA og temperaturmålinger for å se om det er aktivitet, våromrøringer i dammen eller andre faktorer som kan forklare hvorfor DNA konsentrasjonen endrer seg i takt med sesongen, slik resultatene i denne rapporten indikerer. Dette må også korreleres mot rusefangst og faktiske populasjonsberegninger for å få bedre generelle estimater på mengde miljøDNA og antall dyr i dammene.

4.4 Oppsummering og videre anbefalinger

I denne rapporten har vi testet miljø-DNA som metode for overvåkning av småsalamander og storsalamander. Metoden ble videreutviklet fra filtrering av punktpøver som tidligere gav svært variable resultater innen en dam (Taugbøl et.al., akseptert manus i Vann 2018), til en innsamling av vann fra flere stasjoner til en oppsamlingskanne. Ved å filtrere flere prøver fra samme kanne og ta flere oppsamlingskanner på samme tidspunkt, kunne vi fastslå at den nye metoden både gav betydelig mindre variasjon mellom prøver og oppsamlingskanner, enn ved direkte filtrering av punktpøver.

Mange av dammene inneholdt vann med mye partikler. Noe av disse partiklene er trolig pollen, alger og ulike sedimentpartikler. Mye partikler førte til svært lang filtreringstid for mange av dammene, og i enkelte tilfeller helt tett filter der det ikke var praktisk mulig med fornuftig tidsbruk å filtrere 0,5 l vann. For-filtrering av vann igjennom et filter med større porer ble testet ut i testrunden, og dette førte til noe redusert filtertid ved selve prøvetakning, men det tok imidlertid svært lang tid å for-filtrere vannet. En metode for å standardisere mellom dammer kan være å filtrere en mindre mengde vann, eller kun å for-filtrere prøvevannet igjennom et filter med større maskevidde. Eventuelle endringer som innføres bør også settes i samsvar kontamineringspotensiale hvis filtrene ikke er pakket enkeltvis og det bør inkluderes testing av ulike DNA isolerings kitt på lab hvis selve filtertypen som sendes inn til analyse endres.

Selv om miljø-DNA som metode virker svært lovende for å kalkulere biomasse, er det per i dag utfordringer med å koble miljøDNA til antall dyr i dammen. Her trengs det mer utprøving og kalibrering av metoden mot faktiske bestandsstørrelser. En av fordelene med salamander er at variasjonen i biomassen mellom voksne dyr er meget lav og at antall dyr i dammen stor sett er konstant igjennom ynglesesongen (**figur 1.1**). Det vil derfor være andre faktorer, som temperatur, aktivitet, DNA "lekkasjen" og levetiden til DNAet som fører til variasjon av miljøDNA konsentrasjonen i tidsrommet vi har samlet inn prøver for til dette prosjektet. Vi har per i dag samlet inn for få dammer ved gjentatte tidspunkt for å kunne trekke tydelige konklusjoner på hvilke faktorer som utgjør størst variasjon. Vi vil derfor anbefale å samle inn et større antall dammer, gjentatte ganger i samme område med temperaturmålinger, for å få et mer helhetlig bilde av variasjonen slik vi rapporterer den i denne rapporten.

Totalt sett er miljøDNA en meget gunstig metode som bør brukes sammen med andre overvåkings-metoder. Det er en meget hjelpsom metode for å få rask informasjon om artssammensetninger, spredning og til dels populasjonsstørrelser, men resultatene må alltid brukes i samsvar med biologisk forståelse og kunnskap.

Videre anbefalinger

1. Enkel for-filtrering av prøve-vannet slik at plankton og andre partikler trekkes ut før prøven blir konserveret.

- 2.** Prøvene bør kjøres i ulike fortynninger på labben i ddPCR reaksjoner for å se om dette kan redusere variasjonen mellom ulike prøver.
- 3.** Flere dammer må samles inn igjennom sesongen, ved minimum fem innsamlingsrunder. Antall prøver per tidspunkt kan nedjusteres til en oppsamlingskanne med uttak av to prøver.
- 4.** Ved å få et bedre kjennskap til faktisk populasjonsstørrelse i flere dammer får man et bedre utgangspunkt for å kalibrere miljøDNA mengden opp mot populasjonsstørrelse. Dette kan fås ved å merking med PIT og gjenfangst, gjennomføring av enkel populasjonsgenetikk eller fangst gjenfangst med bukmøster- gjenkjennelse i utvalgte dammer.

5 Referanser

- Andruszkiewicz, E.A., Sassoubre, L.M. & Boehm, A.B. 2017. Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight. PLOS ONE 12(9).
- Barnes, M.A., Turner, C.R., Jerde, C.L., Renshaw, M.A., Chadderton, W.L. & Lodge, D.M. 2014. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. Environmental Science & Technology 48(3): 1819-1827.
- Buxton, A.S., Groombridge, J.J., Zakaria, N.B. & Griffiths, R.A. 2017. Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. Scientific Reports 7.
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P. & Miaud, C. 2011. Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. Plos One 6(8).
- Dervo, B.K., Bærum, K.M. & Diserud, O.H. 2017. Bruk av overvåkingsdata til beregning av bestandsutvikling hos storsalamander *Triturus cristatus* og småsalamander *Lissotriton vulgaris* i Norge. NINA rapport 1408, 55 s.
- Dervo, B.K., Skei, J.K., van der Kooij, J. & Skurdal, J. 2013. Bestandssituasjon og opplegg for overvåkning av storsalamander (*Triturus cristatus*) i Norge. Vann(4): 480-490.
- Dervo, B.K., Museth, J., Skurdal, J., Berg, O.K. & Kraabøl, M. 2014. Comparison of active and passive sampling methods for detecting and monitoring the smooth newt (*Lissotriton vulgaris*) and the endangered northern crested newt (*Triturus cristatus*). Herpetology Notes 7: 265-272.
- Dervo, B.K., Skei, J.K., J, V.d.K., Olstad, K., Sloreid, S. & Kraabøl, M. 2012. Nasjonalt overvåkingsprogram for storsalamander. Fylkesmannen i Oslo og Akershus, Miljøvernavdelingen 9/2012.
- Fossøy, F., Dahle, S., Eriksen, L.B., Spets, M.H., Karlsson, S. & Hesthagen, T. 2017. Bruk av miljø-DNA for overvåking av fremmede fiskearter. Utvikling av artsspesifikke markører for gjedde, mort og ørekyt. NINA Rapport 1299, 33 sider.
- Rees, H.C., Maddison, B.C., Middleditch, D.J., Patmore, J.R.M. & Gough, K.C. 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.
- Taugbøl, A., Dervo, B.K., Bærum, K.M., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., Ytrehus, B., Miller, A. & Fossøy, F. 2017. Første påvisning av den patogene soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge. Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter. NINA Rapport 1399, 25 sider.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Moller, P.R., Rasmussen, M. & Willerslev, E. 2012. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. PLoS ONE 7.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L. & Willerslev, E. 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Molecular Ecology 21(11): 2565-2573.
- Tilseth, E. & Skei, J.K. 2013. Kartlegging av storsalamanderlokaliteter i Sør-Trøndelag. Rapport for 2013

6. Vedlegg

Vedlegg 1: Oppsummeringstabell for de to ulike innsamlingsområdene, Akershus og Lier, delt inn i småsalamander og storsalamander. Gjennomsnittet og standardfeil er regnet ut for de to replikate prøvene tatt per innsamlingsrunde (runde) og oppsamlingskanne (bøtte).

Lokalitet	Runde	Bøtte	Småsalamander		Storsalamander		Lokalitet	Runde	Bøtte	Småsalamander		Storsalamander	
			GjennSn.	St.feil	GjennSn.	St.feil				GjennSn.	St.feil	GjennSn.	St.feil
Fjo	2	1	69048,25	1559,80	6507,39	2425,55	Bels	2	1	15034,12	1340,67	48807,18	3010,89
Fjo	2	2	29210,18	2616,03	4587,56	1210,51	Bels	2	2	13962,07	3514,09	53955,59	2803,36
Fjo	4	1	3445,15	757,86	2474,73	186,32	Bra	3	1	356,16	356,16	315,30	114,78
Fjo	4	2	4210,17	1075,33	3953,48	1389,71	Funn	3	1	9162,39	999,71	529,47	113,61
Gard	3	1	9371,39	2275,05	4221,21	124,14	Funn	3	2	11875,81	133,21	490,65	89,22
Horg	2	1	17970,37	1756,84	21441,83	691,14	Gre	3	1	3931,07	617,54	2075,90	161,60
Horg	2	2	52893,17	2300,66	30294,24	4849,40	Grur	3	1	6762,80	962,82	3048,42	529,87
KnarO	3	1	1352,22	182,87	1430,80	427,90	Haug	3	1	391,54	36,70	9259,12	568,92
KnarV	3	1	14435,55	2709,60	8831,98	512,88	Hols	3	1	15987,36	1520,13	17549,20	761,51
LiIN	3	1	3940,08	1172,93	2291,63	320,31	Hols	3	2	10829,62	1220,85	7355,61	4147,77
Otta	2	1	43121,60	66,27	166364,93	17407,90	Hols	4	1	10989,44	123,02	20454,62	304,09
Otta	2	2	58068,19	200,25	61439,77	4910,12	Hols	4	2	10926,97	689,34	18170,16	210,65
Otta	3	1	45351,29	14136,12	44030,03	4719,20	Kitt	3	1	5831,15	152,35	104584,78	524,43
Otta	3	2	58488,02	8857,29	69734,44	4964,53	Kitt	3	2	6696,68	739,91	73302,25	1135,99
Otta	4	1	29311,59	279,19	11635,78	2424,95	Kors	3	1	2026,32	188,57	690,29	176,18
Otta	4	2	33040,71	1400,61	11338,08	571,53	Lah	1	1	3830,59	1208,92	3483,12	350,38
RanN	3	1	150162,97	17538,85	105575,82	24920,88	Lah	1	2	5644,48	781,94	6661,18	274,59
RanS	3	1	66859,52	137,68	52915,13	8364,81	Lah	1	3	4533,29	239,13	3648,17	272,58
RoeG	3	1	122104,29	11275,43	20356,57	4292,90	Lah	2	1	21226,16	3282,25	2793,50	442,93
Solb	2	1	21994,83	1356,46	6643,86	292,18	Lah	2	2	22106,14	1490,08	3503,40	624,95
Solb	2	2	11829,12	11829,12	6166,10	1570,74	Lah	2	3	18538,00	2017,00	4055,93	454,27
Tok	2	1	36119,56	1567,30	66319,04	3597,39	Lah	3	1	4869,81	11,74	1761,16	357,78
Tok	2	2	10517,15	3538,57	15995,93	88,31	Lah	3	2	11041,05	198,68	5223,63	299,28
Øgle	3	1	7134,73	436,89	4211,19	230,23	Lah	4	1	49907,08	1970,97	3129,34	823,95
Østo	4	1	78956,29	34370,42	64378,76	12170,16	Lah	4	2	31036,31	3478,83	3459,90	293,86
							NedS	3	1	6482,03	6482,03	474,77	474,77
							NedS	3	2	21006,63	20742,34	3406,33	3406,33
							NedS	4	1	14853,46	1144,30	6301,24	831,52
							NedS	4	2	16124,98	1381,26	7701,00	1518,07
							RonnM	3	1	12824,39	841,15	12737,91	358,70
							Val	3	1	21543,70	5164,20	11855,53	5762,59
							Val	3	2	23526,87	6705,57	10892,34	5346,13
							Viv	1	1	2090,68	258,52	3749,04	381,71
							Viv	1	2	2940,62	633,76	2915,94	316,33
							Viv	1	3	885,12	75,83	2174,65	447,26
							Viv	1	4	924,92	232,21	2429,62	658,25
							Viv	2	1	16145,22	1091,52	12628,67	153,73
							Viv	2	2	11849,67		8634,32	383,85
							Viv	2	3	11284,39	253,26	13067,88	1695,55
							Viv	3	1	1059,62	796,42	0,00	0,00
							Viv	3	2	627,37	627,37	143,44	143,44
							Viv	4	1	15189,71	531,55	7781,67	317,11
							Viv	4	2	25954,70	16905,10	7188,16	598,67
							Vren	3	1	23463,85	240,03	39466,69	4376,70
							Vren	3	2	28318,25	1900,65	33207,77	2729,07
							Vren	4	1	68880,50	1654,77	11844,75	2038,87
							Østab	3	1	5726,63	5726,63	5928,36	5928,36

Norsk institutt for naturforskning, NINA, er ein uavhengig stiftelse som forskar på natur og samspelet natur–samfunn.

NINA vart etablert i 1988. Hovudkontoret er i Trondheim, med avdelingskontor i Tromsø, Lillehammer, Bergen og Oslo. I tillegg driv NINA Sæterfjellet avlsstasjon for fjellrev på Oppdal, og forskingsstasjonen for vill laksefisk på lms i Rogaland.

NINA driv både med forskning og utgreiing, miljøovervaking, rådgjeving og evaluering. Instituttet har stor breidde i kompetanse og erfaring, med både naturvitarar og samfunnsvitarar i staben. Vi har kunnskap om artane, naturtypene, menneska sin bruk av naturen og korleis dei store drivkreftene i naturen verkar.

ISSN:1504-3312
ISBN: 978-82-426-3207-4

Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovudkontor

Postadresse: Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim

Besøks-/leveringsadresse: Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim

Telefon: 73 80 14 00, Telefaks: 73 80 14 01

E-post: firmapost@nina.no

Organisasjonsnummer 9500 37 687

<http://www.nina.no>



Samarbeid og kunnskap for framtidens miljøløsninger