

Delrapport 1

# Felt-analyse av Miljø-DNA

## Svensk-norsk handlingsplan för sötvattenkräftor

**SVENSK-NORSK**  
innsats for  
edelkreps/flodkräftor 



Statsforvalteren i Oslo og Viken



Länsstyrelsen  
Värmland



Vannområde Glomma  
Grensevassdragene



Aurskog-Høland  
kommune

Havs  
och Vatten  
myndigheten



Statsforvalteren i Innlandet



Utmarksavdelingen  
Akershus og Østfold

**Interreg**  
Sverige-Norge

Europeiska regionala utvecklingsfonden



EUROPEISKA UNIONEN

# Om projektet

Detta är en delrapport inom projektet Svensk-norsk handlingsplan för sötvattenkräftor. Länsstyrelsen Värmland tillsammans med Statsforvalteren i Oslo og Viken står bakom projektet som projektledare. Ytterligare projektdeltagare: Vannområde Glomma Grensevassdragene, Aurskog – Høland kommune, Statsforvalteren i Innlandet och Utmarksavdelningen Akershus og Østfold

Medfinansiering av Havs- och vattenmyndigheten, Miljødirektoratet och Europeiska regionala utvecklingsfonden. Projektet är ett Interreg Sverige-Norge projekt.

Författare:

David A. Strand, Marit Måsøy Amundsen & Stein I. Johnsen

# Innehåll

<b>1</b>	<b>Innledning</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Metodikk</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Resultater</b> .....	<b>4</b>
3.1	Uttesting av Biomeme-plattform .....	4
3.2	Sammenlikning av filter .....	5
3.3	Sammenlikning av påvisning i felt .....	6
<b>4</b>	<b>Konklusjon</b> .....	<b>6</b>
<b>5</b>	<b>Referanser</b> .....	<b>7</b>

# 1 Innledning

Miljø-DNA overvåking er en overvåkingsmetode som benyttes for å påvise mikro og makro organismer i miljøet (vann, sedimenter, jord osv.) uten å fange selve organismen, men ved å fange og påvise organismens DNA i miljøet (Thomsen and Willerslev, 2015). Fra vannprøver er det dermed mulig å gi ett øyeblikksbilde om hvilke organismer som er tilstede i vannet. Miljø-DNA verktøy er utviklet og testet for overvåking av krepsepest, stedegen edelkreps og invasiv signalkreps (Strand et al., 2014; Strand et al., 2019; Johnsen et al., 2020b). Miljø-DNA benyttes i det nasjonale overvåkingsprogrammet for krepsepest (Strand et al., 2021) og det nasjonale overvåkingsprogrammet for edelkreps og spredning av signalkreps (Johnsen et al., 2020a). Rask påvisning av krepsepest og signalkreps kan bidra til rask handling og begrenning av økologisk skadeomfang. Selv om miljø-DNA prøver kan analyseres raskt på laboratoriet, slik at man har et svar i løpet av et par dager, vil muligheten for å gjennomføre analysen i felt åpne for adaptiv prøvetaking. Da kan man ut i fra resultater direkte i felt, fortløpende vurdere behovet for antall prøver og prøvelokasjoner. Biomeme (Philadelphia, USA) er et av få selskaper som leverer en komplett plattform for miljø-DNA analyse i felt. Biomeme leverer et enkelt og raskt DNA kit for ekstraksjon av DNA fra filter, reagenser for qPCR, Franklin™ mobile qPCR thermocycler (Thomas et al., 2020), samt en nettsky hvor man kan laste opp resultater fortløpende fra felt.

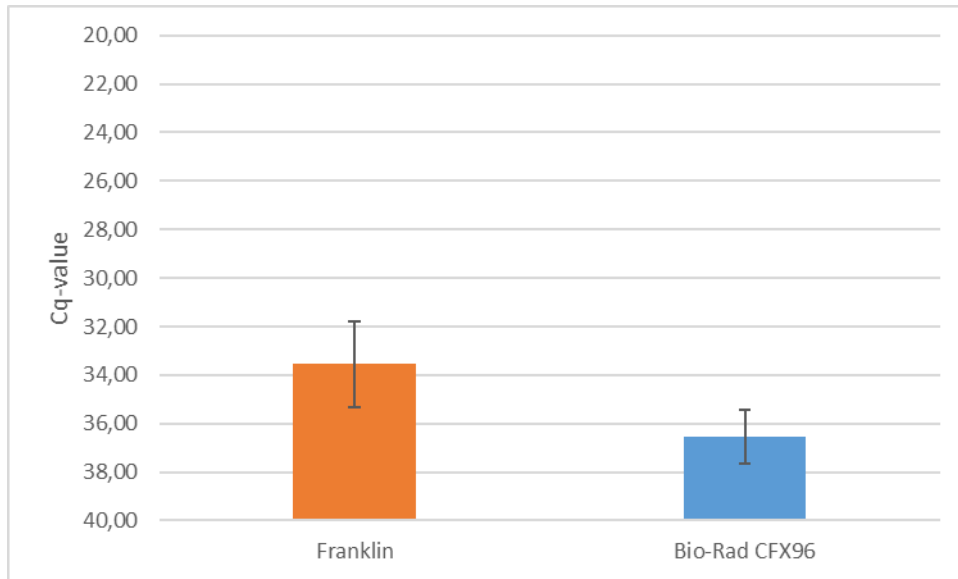
## 2 Metodikk

Vi har sammenlignet Biomeme-plattformen, med vår standard miljø-DNA metodikk for miljø-DNA overvåking av ferskvannskreps og krepsepest. Ved standard overvåking filtreres av vann direkte i felt, hvor ca. 5L filtreres med et millipore glassfiber filter (2µm pore størrelse) ved hjelp av en peristaltisk pumpe. Filteret puttes på et falkonrør med 5 ml ATL buffer. DNA isoleres på laboratoriet i henhold til publisert protokoll, se Fossøy et al. (2019). DNA ekstraktet analyseres så med publiserte qPCR assay for artsspesifikk påvisning av edelkreps, signalkreps og krepsepest (Vrålstad et al., 2009; Rusch et al., 2020) på Bio-Rad CFX qPCR askin. For Biomeme metoden benyttes direkte filtrering i felt på et mixed cellulose ester filter (5µm pore størrelse), da glassfiberfilter ikke fungerer optimalt med felt DNA isoleringskittet. DNA isoleres fra filteret med Biomeme M1 sample prep cartridge kit (DNA-HI & Homogenisation kit) i henhold til protokoll ute i felt. Deretter analyseres DNA prøvene med de samme artsspesifikke qPCR assayene på Franklin™ mobile qPCR thermocycler. Vi har testet og sammenliknet effekt av filter, effekt av DNA-isoleringsmetode og effekt av qPCR thermocycler på deteksjon av miljø-DNA fra relevante organismer, samt testet plattformen ute i felt.

## 3 Resultater

### 3.1 Uttesting av Biomeme-plattform

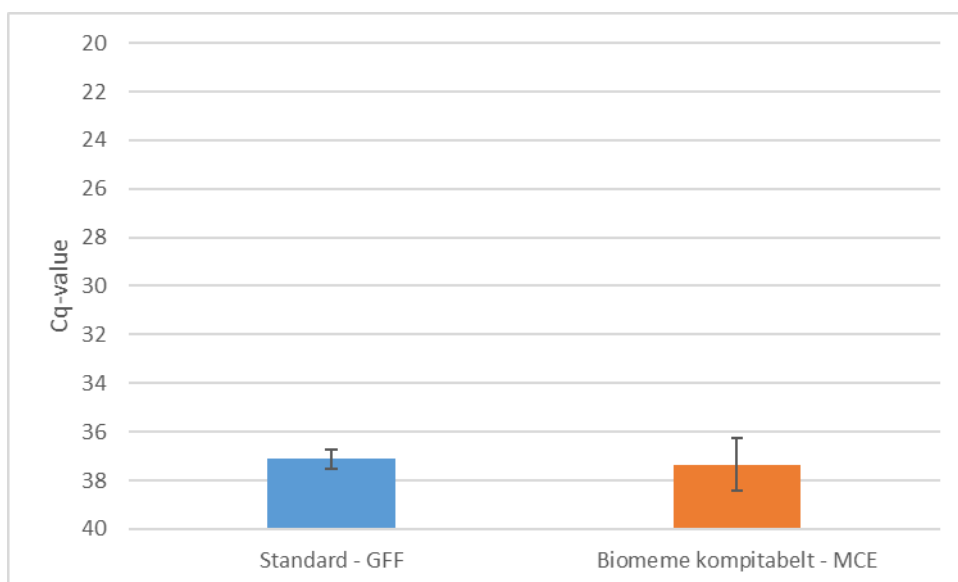
Miljø-DNA prøver fra innsjø med signalkreps ble isolert med standard DNA isolerings metode, og deretter analysert med et artsspesifikt assay for signalkreps på Bio-Rad CFX96 Touch og på Franklin™ mobile qPCR thermocycler. Påvisning i miljø-prøver var lik for begge plattformer, men det var litt høyere Cq-verdi på prøvene kjørt på CFX96, sammenliknet med prøvene kjørt på Franklin™ (fig. 1). Forskjell i Cq-verdier mellom to forskjellige maskiner kan skyldes forskjellig setting av terskelverdi og ikke nødvendigvis forskjell i sensitivitet. Disse resultatene og lignende kjøring med andre target (ikke presentert her), viser at Franklin™ mobile qPCR thermocycler presterer like godt som qPCR som benyttes på laboratoriet.



Figur 1. Sammenlikning av Cq-verdier fra samme prøver kjørt på Franklin™ og CFX96 qPCR maskiner.

### 3.2 Sammenlikning av filter

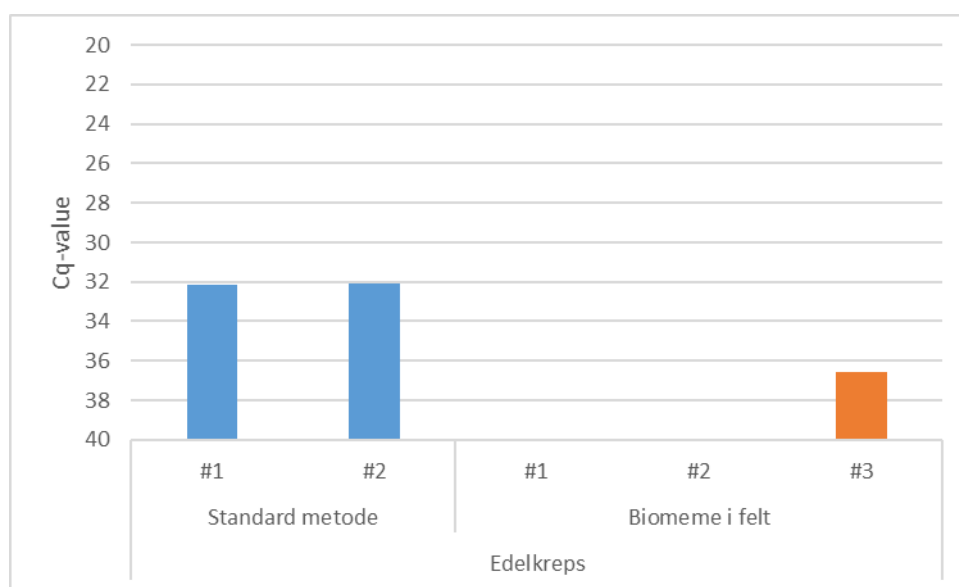
Glassfiber-filter (GFF, 2µm porestørrelse) og Mixed Cellulose Esters membran-filter (MCE, 5µm porestørrelse) ble brukt til å filtrere 5L vann pr filter, fra en lokalitet med en kjent signalkreps populasjon. DNA ble isolert fra filtrerne med standard metode og analysert for miljø-DNA fra signalkreps på samme qPCR maskin (CFX96). Miljø-DNA fra signalkreps ble påvist i alle prøver fra begge type filter og med lik Cq-verdi (fig. 2), noe som tyder på at begge type filter var like effektive til å fange miljø-DNA.



Figur 2. Sammenlikning av Cq-verdier fra prøver filtrert med forskjellige filter fra samme lokasjon.

### 3.3 Sammenlikning av påvisning i felt

Miljø DNA prøver ble tatt i felt i Finnsrudselva i Eidskog med standard metode (glassfiber filter), disse ble bragt tilbake på laboratoriet for videre analyse. I tillegg ble filtrert prøver på MCE filter til biomeme plattformen, hvor DNA isolering (Biomeme M1 sample prep. kit) og qPCR analyse (Franklin™) ble gjennomført i felt. Prøvene ble analysert for edelkreps, med artsspesifikke markører. Begge prøvene analysert på laboratoriet (standard metode) var positive for miljø-DNA fra edelkreps med Cq-verdi ~32, mens kun en av tre prøver analysert i felt (Biomeme metode) var positiv for miljø-DNA fra edelkreps med Cq-verdi 36.5 (fig. 3). Dette tyder på lavere påvisning frekvens med Biomeme-plattformen sammenlignet med standard analyse på laboratoriet. Dette samsvarer med resultater fra lignende forsøk på laboratoriet og i felt, hvor vi ser at dette skyldes dårligere DNA utbytte med Biomeme's DNA isoleringsmetode i forhold til DNA isoleringsmetoder benyttet på laboratoriet.



Figur 3. Sammenlikning av Cq-verdier fra miljø-DNA av edelkreps fra prøver (#1-2) tatt med full standard metode og prøver (#3-5) tatt med full Biomeme metode.

## 4 Konklusjon

Biomeme leverer en komplett plattform for isolering av DNA/RNA fra diverse prøvemateriale direkte i felt, med etterfølgende qPCR analyse og opplasting av resultater i en nettsky. Protokollene isolering og analysering er veldig enkle å følge og kan gjennomføres av de fleste. I tillegg er protokollene raske, slik at man kan få svar på opptil ni prøver i løpet av et par timer etter at de er tatt. Resultatene våre viser at man kan påvise mål-organismen i felt, i dette tilfellet edelkreps, med Biomeme metoden, men at den ikke er like sensitiv som standard metode hvor prøvene analyseres på laboratoriet. Resultater fra lignende studier utført på veterinærinstituttet med uttesting av Biomeme, viser at utbyttet av DNA fra Biomeme's DNA isoleringskit er over 90 % lavere enn DNA isoleringsmetodene vi benytter på laboratoriet (David Strand, upublisert). Hovedgrunnen til dette er at man ikke får ut like mye DNA fra prøvematerialet med Biomeme metoden, som men DNA isoleringsmetodene vi benytter på laboratoriet. Vi har fått liknende resultater fra parallelt pågående tester for andre organismer, hvor vi også har benyttet Biomeme metoden. Franklin™ mobile qPCR

thermocycler presterer like godt som qPCR maskinene vi benytter på laboratoriet. Slik Biomeme-plattformen er i dag vil man kunne påvise miljø-DNA fra organismer med høy tilstedeværelse i vassdraget, mens organismer med lav tilstedeværelse vil være vanskelig å påvise dersom Biomeme's DNA isoleringskit for feltbruk benyttes. For overvåking av miljø-DNA fra ferskvannskreps kommer Biomeme-plattformen derfor mest sannsynlig til kort, da kreps ofte gir fra seg mindre miljø-DNA enn f.eks fisk (Fossøy et al., 2020). Ved et krepsepest utbrudd kan Biomeme-plattformen klare å påvise miljø-DNA fra *A. astaci* da mengden sporer i vann ofte er høy. I 2018 demonstrerte vi at det er mulig å påvise miljø-DNA fra *A. astaci* under et aktivt utbrudd av krepsepest, hvor vi den gang gjennomførte full Biomeme-prosedyre i felt (Veterinærinstituttet 2018). Derfor vil Biomeme-plattformen kunne benyttes ved et aktivt krepsepest utbrudd til å lokalisere områder med høy smittefare.

## 5 Referanser

Fossøy, F., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., Pettersen, O., Sandercock, B.K., Solem, Ø., et al. 2019. Monitoring presence and abundance of two gyrodactylid ectoparasites and their salmonid hosts using environmental DNA. *Environmental DNA* 2(1), 53-62. doi: 10.1002/edn3.45.

Fossøy, F., Strand, D.A., Sandercock, B.K. & Johnsen, S.I. 2020. "Miljø-DNA: Uttesting av innsamlingsmetodikk og labanalyser for påvisning av kreps og fisk i ferskvann", in: *NINA Rapport*. (Norway: Norsk institutt for naturforskning).

Johnsen, S.I., Strand, D.A., Rusch, J. & Vrålstad, T. 2020a. "National surveillance of noble crayfish and the spread of signal crayfish – presentation of surveillance data and population status (In Norwegian)", in: *NINA report*.

Johnsen, S.I., Strand, D.A., Rusch, J.C. & Vralstad, T. 2020b. Environmental DNA (eDNA) Monitoring of Noble Crayfish *Astacus astacus* in Lentic Environments Offers Reliable Presence-Absence Surveillance - But Fails to Predict Population Density. *Frontiers in Environmental Science* 8. doi: ARTN 612253. 10.3389/fenvs.2020.612253.

Rusch, J.C., Mojzisova, M., Strand, D.A., Svobodova, J., Vrålstad, T. & Petrusek, A. 2020. Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. *Neobiota* (58), 1-32. doi: 10.3897/neobiota.58.49358.

Strand, D.A., Johnsen, S.I., Rusch, J. & Vrålstad, T. 2021. "The surveillance programme for *Aphanomyces astaci* in Norway 2020", in: *Annual Report. Norwegian Veterinary Institute*.

Strand, D.A., Johnsen, S.I., Rusch, J.C., Agersnap, S., Larsen, W.B., Knudsen, S.W., et al. 2019. Monitoring a Norwegian freshwater crayfish tragedy - eDNA snapshots of invasion, infection and extinction. *Journal of Applied Ecology* 56(7), 1661-1679. doi: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13404>.

Strand, D.A., Jussila, J., Johnsen, S.I., Viljamaa-Dirks, S., Edsman, L., Wiik-Nielsen, J., et al. 2014. Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *Journal of Applied Ecology* 51(2), 544-553. doi: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12218>.

Thomas, A.C., Tank, S., Nguyen, P.L., Ponce, J., Sinnesael, M., & Goldberg, C.S. 2020. A system for rapid eDNA detection of aquatic invasive species. *Environmental DNA* 2(3), 261-270. doi: <https://doi.org/10.1002/edn3.25>.

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: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>.

Vrålstad, T., Knutsen, A.K., Tengs, T., & Holst-Jensen, A. 2009. A quantitative TaqMan (R) MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology* 137(1-2), 146-155. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.022>.

Veterinærinstituttet 2018: Ny mobilteknologi kan påvise krepsepestsmitte direkte i felt (vetinst.no)