

8129-2025

Sammenligning af filter- enheder for artsspecifik overvågning af miljø-DNA i marine vandprøver



Rapport

NIVA Danmark

Løbenummer: 8129-2025

ISBN 978-82-577-7868-2
NIVA-rapport
ISSN 1894-7948

Denne rapporten er
kvalitetssikret iht. NIVAs
kvalitetssystem og
godkendt af:

Steen W. Knudsen
Projektleder og
hovedforfatter

Helle Sommer
Kvalitetssikrer

Forside af Steen W.
Knudsen

© Norsk institut for vand-
forskning. Publikasjonen
kan citeres frit med kilde-
angivelse.

www.niva.no

Titel

Sammenligning af filterenheder for
artsspecifik overvågning af miljø-DNA i
marine vandprøver

Sider

34 + bilag

Dato

10.09.2025

Forfatter(e)

Steen W. Knudsen¹, Peter Rask Møller²
og Jesper H. Andersen¹
1) NIVA Danmark
2) Statens Naturhistoriske Museum

Fagområde

Marinbiologi

Distribution

Åben

Opdragsgiver

Miljøstyrelsen

Kontaktpersoner hos opdragsgiver

Martin Søndergaard Jørgensen

Udgivet af NIVA

Projektnummer 240106

Sammendrag

Med over seks års overvågning af miljø-DNA fra ikke-hjemmehørende arter i danske farvande, er der endnu ikke afprøvet forskellige filtertyper med forskellige membran- og porestørrelser. Det er muligt at andre filterenheder kan hjælpe til bedre overvågning af miljø-DNA. Få studier har fokuseret på at afprøve filterporestørrelser i forbindelse med detektion af miljø-DNA fra ikke-hjemmehørende arter. Her afprøves ti forskellige filtertyper med forskellig porestørrelse og forskellig membrantyper. Filterenhederne afprøves på vand fra Øresundsakvariet i Helsingør. Alle filterprøver analyseres for miljø-DNA fra seks marine arter, på samme facon med samme ekstraktion og ensartet opsætning af digital droplet Polymerase Chain Reaction. Miljø-DNA fra både hjemmehørende og ikke-hjemmehørende arter analyseres i nærværende studie. De 'Sterivex'-filtre, der benyttes i det nuværende NOVANA-program, er indkapslet i en beskyttende plastikcylinder. Men der findes andre filtertyper med andre porestørrelser, der ikke er indkapslet i en plastikcylinder. De andre filtertyper, forøger arbejdstiden for filtrering, da de fordrer mere håndtering. Ud af de seks arter, der blev forsøgt detekteret, var det kun miljø-DNA fra torsk, der kunne pege på filtertypen med 3,0 µm porestørrelse som mere fordelagtig. Den største porestørrelse på 0,45 µm i 'Sterivex'-modellen, var ikke forskellig fra 0,22 µm 'Sterivex'-modellen. Det vil kræve flere prøver fra flere akvarier, at komme nærmere et bud på om andre filtertyper er mere fordelagtige for overvågning af miljø-DNA fra ikke-hjemmehørende arter. Ud fra kun en enkelt art med mere miljø-DNA tilbageholdt på et 3,0 µm porestørrelse filter, kan nærværende ikke studie ikke konkludere om det kan svare sig at skifte filterenhed for indsamling i danske farvande.

Emneord: miljø-DNA, ddPCR, artsspecifik sporing, invasive arter, filter, nylonfiltre, polykarbonatfiltre

Keywords: environmental DNA, monitoring of non-indigenous species, Sterivex filters, polycarbonate filters, Nylon filters

Indholdsfortegnelse

Forord	4
1 Introduktion	5
2 Metode	9
2.1 Opsætning af forsøg og filtrering af vand	9
2.2 Ekstraktion fra filterenheder	14
2.3 Kvantifikation af miljø-DNA-molekyler	16
3 Resultater	17
4 Sammenfatning og konklusioner	25
5 Referencer	30
6 Bilag A: Tabel med alle filterprøver og vandvolumen og filtreringstidspunkt	35

Forord

Denne rapport er udarbejdet for den danske Miljøstyrelse for at belyse, om der eventuelt kunne være en fordel ved at skifte til andre filtertyper med andre porestørrelser og anden filtermembran i forbindelse med den overvågning af miljø-DNA, som er blevet udført under MONIS-projekterne ('Monitoring of non-indigenous species') på vandprøver indsamlet i de danske farvande. MONIS-projekterne omfatter en overvågning af miljø-DNA (engelsk: 'environmental DNA', forkortet: 'eDNA') som udføres i regi af det danske NOVANA-program. Over de sidste ti år er overvågning af marine arter ved detektion af miljø-DNA i vandprøver blevet udført over hele verden. De fleste studier har haft fokus på detektion af alt miljø-DNA i en vandprøve fra mange forskellige organismer på een gang, indenfor en større afgrænset overordnet taksonomisk gruppe, i det der også er kendt som 'eDNA-metabarcoding'. I MONIS projekterne har fokus i stedet været detektion af enkelte specifikke arter, der betragtes som ikke-hjemmehørende i danske farvande. Tidligere studier, der har forsøgt at sammenholde forskellige filtertypers evne til at tilbageholde miljø-DNA, har taget udgangspunkt i at forbedre den diversitetsprofil, der kan opnås ved 'eDNA-metabarcoding'. Fordi MONIS projekterne i stedet fokuserer på enkelte, udvalgte specifikke arter, er det ikke nødvendigvis gældende, at de filtertyper og porestørrelser, der virker bedst for 'eDNA-metabarcoding', også er bedst for specifik overvågning af enkelte arters miljø-DNA i danske farvande.

Formålet med nærværende studie er at belyse, om der eventuelt kunne være fordele ved at benytte andre filtertyper, end hvad der hidtil er blevet benyttet i MONIS-projekterne. Der kan muligvis være en forskel i de forskellige filtertyper og porestørrelses evne til at tilbageholde miljø-DNA fra enkelte arter. For at gøre denne sammenligning af filtertyper så ensartet som muligt, og uden indflydelse af andre faktorer end filterporestørrelsen og typen af filtermembran, udføres denne sammenligning af filterenheder på vand indsamlet fra Øresundsakvariet i Helsingør, hvor der befinder sig et ensartet antal af individer af forskellige arter og et nogenlunde ensartet volumen af vand. Vand fra samme akvarie kunne så filtreres med samme pumpesystem og den efterfølgende laboratedel kunne udføres på samme facon for alle prøver. I laboratoriet blev antallet af miljø-DNA-molekyler optalt per filteret liter vand, og de forskellige typer af filtre blev derefter så sammenholdt, for deres evne til at tilbageholde miljø-DNA fra de undersøgte arter. Med afprøvning af flere forskellige detektionssystemer imod både fisk og hvirvelløse dyr, som er til stede i akvariet, kan de forskellige filterenheders evne til at tilbageholde miljø-DNA molekyler afprøves på tværs af forskellige arter.

Tak til Jens P. Jeppesen, Kristian Vedel og andre ansatte Øresundsakvariet ved Københavns Universitet for hjælp til at gennemføre filtrering af vand. Også tak til det moderne genetiske laboratorium ved GLOBE-institutet ved Københavns Universitet. Tak rettes også til Nadieh de Jonge ved Ålborg Universitet (AAU) for gode forslag til hvordan ekstraktion af DNA på filterskiver kan gennemføres.

Steen W. Knudsen

Forsker

København den 10. september 2025

1 Introduktion

Med udgangspunkt i det overvågningsprogram af marine ikke-hjemmehørende organismer, som er blevet udført for overvågning af miljø DNA (engelsk: 'Environmental DNA', forkortet: 'eDNA'), af NIVA-Danmark for Miljøstyrelsen, mellem 2017 og 2023, ønskes en vurdering af hvorvidt andre filtertyper og andre porestørrelser på filterenheder, kan indvirke på niveauerne af miljø-DNA, der kan registreres i vandprøver. Igennem den overvågning af miljø-DNA fra ikke-hjemmehørende arter i danske farvande, som er blevet gennemført i MONIS-projekterne ('Monitoring of non-indigenous species') (Andersen et al., 2014; 2017; 2018; 2021; Knudsen et al., 2020; 2024; 2025), har der udelukkende kun været benyttet en enkelt type filterenhed, og kun samme porestørrelse. Det konservative valg af kun en enkelt filtertype og kun en enkelt porestørrelse, er selvsagt gjort ud fra et ønske om størst mulig sammenlignelighed på tværs af prøvetagning og indsamling over forskellige lokaliteter, årstider, vanddybder, og geografiske lokaliteter. Valget af filterenhed i MONIS-projekterne bygger på et tidligere studie (Spens et al., 2016), der fandt frem til en indkapslet filterenhed på 0,22 µm i porestørrelse, som det umiddelbart mest optimale. Det er i MONIS-projekterne, imidlertid, ikke afklaret om den benyttede filterenhed og porestørrelse, reelt er den bedst egnede for at tilbageholde og sikre bedst mulig chance for at kunne detektere lave niveauer af miljø-DNA fra ikke-hjemmehørende arter i danske farvande. Med større porestørrelse kunne det være muligt at filtrere mere vand, og det kunne muligvis hjælpe til at øge chancen for at detektere sjældne miljø-DNA-molekyler. Hvilket er yderst relevant for sjældne ikke-hjemmehørende arter.

Da der således mangler information, om hvilken filtertype og filtermembran i kombination med porestørrelser, der er den mest optimale løsning til detektion af ikke-hjemmehørende arter, har det netop været nærværende studies formål at indkredse hvilke filtertyper og porestørrelser, der kan hjælpe med til at gøre detektion af miljø-DNA fra ikke-hjemmehørende arter endnu bedre for vandprøver, hvor miljø-DNA-niveauerne er lave.

I det nuværende MONIS-overvågningsprogram benyttes kun Sterivex filter med porestørrelse på 0,22 µm (Knudsen et al., 2024), hvor det tilsigtes at 1,5 L vand filtreres igennem, så vidt det er muligt. En porestørrelse på 0,22 µm har sit udspring fra noget af den allerførste forskning i miljø-DNA, der netop udviklede protokoller baseret på kun 0,22 µm porestørrelse (Sigsgaard et al., 2017; Thomsen et al., 2016). Sterivex filteret med 0,22 µm porestørrelse er tidligere fundet optimal, både fordi det tilbageholder flest miljø-DNA molekyler, det er let at håndtere under feltarbejde og fordi det mindsker risikoen for, at filterprøven forurenes med uønsket fremmed DNA (Spens et al., 2016). Filteret er indkapslet i en plastikcylinder og det minimerer risikoen for, at det er selve håndteringen af filteret, der introducerer fremmed og uønsket DNA til filteret. Sterivex filteret er sidenhen blevet benyttet i et utal af marine miljø-DNA studier (f.eks. Agersnap et al., 2022; Demkina et al., 2023; Guri et al., 2024; Kawakami et al., 2023; Muenzel et al., 2024). Men indenfor forskningen i miljø-DNA er der også blevet afprøvet utallige andre filtertyper for at sammenholde deres evne for at tilbageholde miljø-DNA (Djurhuus et al., 2017; Li et al., 2018; Hinlo et al., 2017; Majaneva et al., 2018), og med sammenligning af effekten af for-filtrering, der kan hjælpe til adskillelse af partikler i forskellige størrelsesklasser (Brandão-Dias et al., 2023; Jo & Yamanaka, 2022; Snyder et al., 2023). Der er også kommet flere studier til, der har påpeget, at der er stor variation i hvor mange miljø-DNA-molekyler, der tilbageholdes i hver enkelt filterprøve, som stammer fra samme hovedvandprøve (Ficotela et al 2015; Stauffer et al., 2021). Antallet af molekyler af miljø-DNA i de delprøver, der stammer fra den samme overordnede vandprøve, kan variere så meget, at det som regel er nødvendigt med adskillige biologiske replikater af filterprøver fra samme portion vand (Ficotela et al 2015), for at belyse hvor mange DNA-molekyler, der er i det vand som er fokus for overvågningen. En enkelt vandprøve kan altså ikke nødvendigvis give tilstrækkelige oplysninger om al diversitet i det vand, der ønskes undersøgt. Dette skyldes utvivlsomt, at molekyler af miljø-DNA ikke nødvendigvis er ensartet opblandet i en vandmasse (Patin & Goodwin, 2023). Fordelingen af miljø-DNA i en vandprøve svarer nok

mere til, hvordan koncentreret saft ser ud i et glas med saftvand, der ikke er ordentligt blandet op. En vandprøve kan altså ikke betragtes som homogen - tværtimod. Derudover vil sjældne og fåtallige arter kun være repræsenteret med få miljø-DNA-molekyler i en indsamlet vandprøve, og sjældne molekyler af miljø-DNA vil ikke nødvendigvis blive indsamlet med blot et par enkelte filterprøver. Det mest typiske er at miljø-DNA vil være uensartet fordelt i vandprøver, og for at forøge chancen for at detektere sjældne miljø-DNA-molekyler, vil det være fordelagtigt at kunne filtrere meget vand og gerne i mange biologiske filterreplikater af flere vandprøver. Vandprøver, der vel at mærke, er samlet ind på samme lokalitet, i samme dybde og på samme tidspunkt, da der ellers kan være yderligere variation på grund tidspunkt (Jensen et al., 2022), indsamlingsdybde (DiBattista et al., 2019) og indsamlingssted (Sigsgaard et al., 2016; Jensen et al., 2022). Årstidsvariation i organismers adfærd (f.eks. gydning og vandring) kan også betyde, at der er voldsomt store forskelle i de miljø-DNA niveauer, som kan registreres fra forskellige organismer (Agersnap et al., 2022; Sigsgaard et al., 2017).

En lille porestørrelse på et filter vil hjælpe til at tilbageholde meget små partikler og meget små organismer. Er miljø-DNA frit eksponeret i vandet, vil det være nødvendigt med meget små porer på et filter, for at kunne tilbageholde noget så småt som et DNA-molekyle (Power et al., 2023). Selvom det førhen har været mistænkt, at DNA-molekyler udskilt af organismer er frit eksponeret i vandet, er der efterhånden mere, som tyder på at det ikke forholder sig sådan (Deiner et al., 2017). Et DNA-molekyle vil meget sjældent få lov til at være frit eksponeret i vandet, da mikroorganismer som svampe og bakterier hurtigt vil kunne nedbryde DNA-molekyler, og gøre brug af nukleinsyrerne i eget stofskifte. Små forandringer i pH eller temperatur vil heller ikke være fordelagtige for at bevare et frit DNA-molekyle, da ændringer i temperatur og pH kan medføre øget mikrobiel aktivitet, der kan forøge nedbrydningen af miljø-DNA (Andruszkiewicz et al. 2017; Barnes et al., 2020). Det er altså langt mere sandsynligt at meget – hvis ikke mere eller mindre alt – det miljø-DNA, som detekteres i vandprøver, kommer fra DNA, der stadig er indkapslet i hele celler. Det er sandsynligvis også celler, der stadig er arrangeret i sammenhængende klumper, og ikke enkelte individuelle celler. Der er altså nok snarere tale om større klumper af celler, som er slidt af eller kastet af den organisme som miljø-DNA'et stammer fra. Med større porestørrelse er der mulighed for stadig at kunne tilbageholde relativt store celler, såsom eukaryote celler, i stedet for at filterenheden hurtigt blokeres fordi, der tilbageholdes en masse mindre partikler. Bakterier er som regel væsentligt mindre i størrelse end eukaryote celler. En større porestørrelse vil derfor nok være ensbetydende med at færre små prokaryote organismer tilbageholdes, og vil gøre det lettere at filtrere større mængder vand, fordi filterenheden med større porestørrelse ikke er ligeså udsat for at filteret blokeres på grund af at prokaryote organismer og små partikler ophobes. Dette kunne muligvis resultere i at en større porestørrelse vil være lig med en bedre opsamling af eukaryot miljø-DNA uden at filteret blokeres. Jo flere eukaryote celler, der opsamles, jo større er chancen for kunne detektere miljø-DNA fra sjældne makroorganismer (Jo et al., 2020). Dette afhænger dog også af om bakterier er enkeltvis i deres fordeling i vandet, eller om de er samlet i store klumper. Det mest nærliggende er nok at antage, at både eukaryote celler og prokaryote celler hovedsageligt er arrangeret i klumper og ansamlinger i vandet, men at mindre ansamlinger af celler nok vil være forventeligt for både eukaryote og for prokaryote organismer jo mere klart vandet er. Nogle af de organismer, der overvåges per miljø-DNA i MONIS-projekterne omfatter også flagellater og alger (Knudsen et al., 2022; 2025). Flagellater og alger er også eukaryote organismer, og kan forekomme enkeltvist, men kan også være samlet i klumper i vandet.

Der er førhen udført studier, som har undersøgt forskellige porestørrelser på forskellige filtertyper, og som har undersøgt om større mængder vand kan hjælpe til at øge chancen for, at mere miljø-DNA kan detekteres (Turner et al., 2014; Shu et al., 2020; Zaiko et al., 2022). Disse studier har dog som regel fokuseret mere på den generelle variation iblandt de eukaryote genetiske sekvenser, der kan indhentes ved 'eDNA-metabarcoding' (Djurhuus et al., 2017; Liu et al., 2024; Majaneva et al., 2018; Takasaki et al., 2021) og sjældent på arts-specifik detektion af miljø-DNA. For en mere detaljeret gennemgang af forskelle på artsspecifik detektion af miljø-DNA og 'eDNA metabarcoding' henvises til studierne af Harper et al. (2018), Knudsen et al. (2022), Tsuji et al. (2019), og af Willeslew & Thomsen (2015). Der er også udført studier, der sammenligner porestørrelser og efterfølgende artsspecifik detektion ved kvantitativ

'polymerase chain reaction' (qPCR) (Cooper et al., 2022; Eichmiller et al., 2016; Turner et al., 2014). Det er dog få studier, der har forsøgt at sammenligne filterenheder med artsspecifik detektion ved brug af 'digital droplet polymerase chain reaction' (ddPCR) (Zaiko et al., 2022). I MONIS-projekterne har artsspecifik detektion af miljø-DNA været i fokus (Andersen et al., 2018; Knudsen et al., 2022; 2025). Hvad tidligere studier med fokus på 'eDNA metabarcoding' har fundet optimalt, er ikke nødvendigvis også gældende for marin artsspecifik detektion af ikke-hjemmehørende arter. De forskellige ikke-hjemmehørende arter kan være meget sjældne i deres forekomst, og det vil betyde, at der kun udskilles få celler fra disse organismer til vandet. Udskilles der kun få celler, vil det også betyde, at det bliver vanskeligere at detektere miljø-DNA fra disse sjældne arter. At organismer er sjældne, er også ensbetydende med, at deres miljø-DNA er sjældent, hvilket betyder, at den bedste mulighed for at finde miljø-DNA fra sådanne organismer, nok skal ske igennem filtrering af store mængder vand. Eller meget hyppig prøvetagning. Eller begge dele. Store mængder vand, der skal filtreres, kan filtreres ved enten at lave mange biologiske filter-replikater fra den samme lokalitet på samme indsamlingstidspunkt, eller ved at filtrerer store mængder vand igennem et enkelt filter, uden at filteret nødvendigvis bliver blokeret af partikler. Filter-membranen skal også være tilstrækkelig robust, for at den ikke går i stykker pga. at meget vand hurtigt presses igennem filteret. Dette problem kan dog til dels afhjælpes med et støttefilter og en filterholder.

For at komme det nærmere, om der i MONIS-projekterne kan være en fordel ved at benytte andre filterenheder, med andre membraner og andre porestørrelser ved indsamling af vand, for den efterfølgende artsspecifikke miljø-DNA-sporing, er målet for nærværende studie at afprøve forskellige typer af filtre og med forskellig membran og forskellige porestørrelser. Formålet er at belyse om der kan være andre porestørrelser, andre membraner og andre filterenheder, der kan benyttes i stedet for de Sterivex filterenheder med 0,22 µm porestørrelse, som den nuværende tekniske anvisning dikterer skal benyttes.

For at afgøre om andre filterenheder og andre porestørrelser kunne være en fordel at anvende til artsspecifik detektion af miljø-DNA fra ikke-hjemmehørende arter i danske farvande, bør vandfiltrering gennemføres i en opsætning med et nogenlunde ensartet akvarium. Hertil blev Øresundsakvariets store sammenkoblede udstillingsakvarium i Helsingør udvalgt som et nogenlunde ensartet akvarium. Øresundsakvariet består af mange mindre akvarier, der er sammenkoblet til samme vandsystem, med indtag fra havvand i havnen. Dette gør det muligt at detektere de arter, som lever i akvariet, samt de arter, der lever i havnen. Der kan være udsving i miljø-DNA-niveauer over få dage og endda over timer (Jensen et al., 2022), når vandfiltrering udføres i felten på havvand. Hvilket gør det nødvendigt at filtreringen gennemføres relativt hurtigt indenfor en eller to timer, for ikke risikere at de forskelle, man senere finder i miljø-DNA niveauer i prøverne, skyldes at der i vandet har været udsving i mængden af miljø-DNA. Det vand, der skal filtreres skal altså helst over hele den tidsperiode, der filtreres i, være ensartet hvad angår mængden af miljø-DNA. For at sikre en ensartet i mængde af miljø-DNA, må total vandmasse og individ- og artssammensætning altså også være konstant indenfor den tidsperiode, der filtreres i. Et udstillingsakvarium med mange forskellige arter, kan betragtes som et nogenlunde konstant miljø, hvor der er en konstant total vandmasse, og en konstant ensartet sammensætning af arter og individer. I sådan et akvarium må bedbrydning af miljø-DNA - pga. mikrobiel aktivitet - også forventes at være nogenlunde konstant. Der er en mindre risiko for, at der - over de dage som filtreringsforsøget udføres - er udsving i hvilke organismer, der befinder sig i havnen, hvor vandet til akvariet hentes fra. Men da det er de samme arter i udstillingsakvarierne som i havnen, og da der er en nogenlunde ensartet repræsentation af arterne i de sammenkoblede udstillingsakvarier, er det forventet, at der er en nogenlunde ensartet sammensætning af miljø-DNA i det vandet. En ensartet sammensætning af miljø-DNA forventes også ud fra, at der over de dage, hvor vandfiltreringen blev gennemført ikke blev tilført eller frataget flere individer i de sammenkoblede udstillingsakvarier. Et hyppigt problem med filterenheder med lille porestørrelse er, at filteret let blokeres fordi havvandet er urent og fyldt med mange partikler, hvilket gør det vanskeligt at

filtrere store mængder vand. Jo mindre vand, der filtreres, jo mindre er chancen for at sjældne miljø-DNA-molekyler kan detekteres. Det er dog forventeligt at miljø-DNA stadig vil være uensartet fordelt over filterprøver, hvorfor det vil være nødvendigt med flere biologiske filterreplikater. Tidligere forskning i miljø-DNA har påpeget, at der bør sigtes mod 12 eller flere biologiske filterreplikater (Ficotela et al., 2015), for at tage højde for, at der kan være variation imellem de filterprøver, der er samlet ind på samme overordnede vandprøve. Det betyder at der er stor variation på prøveresultaterne, som stammer fra selve måleusikkerheden, fra inhomogenitet i den udtagne prøve og inhomogenitet i vandbasinet.

2 Metode

Formålet i dette projekt er, at sammenholde hvor mange miljø-DNA-molekyler per volumen filtreret vand som forskellige porestørrelser på forskellige filtertyper kan tilbageholde. Forhåbentligt kan dette hjælpe til at udpege om andre typer af filterenheder kunne være fordelagtige for overvågning af miljø-DNA i danske farvande.

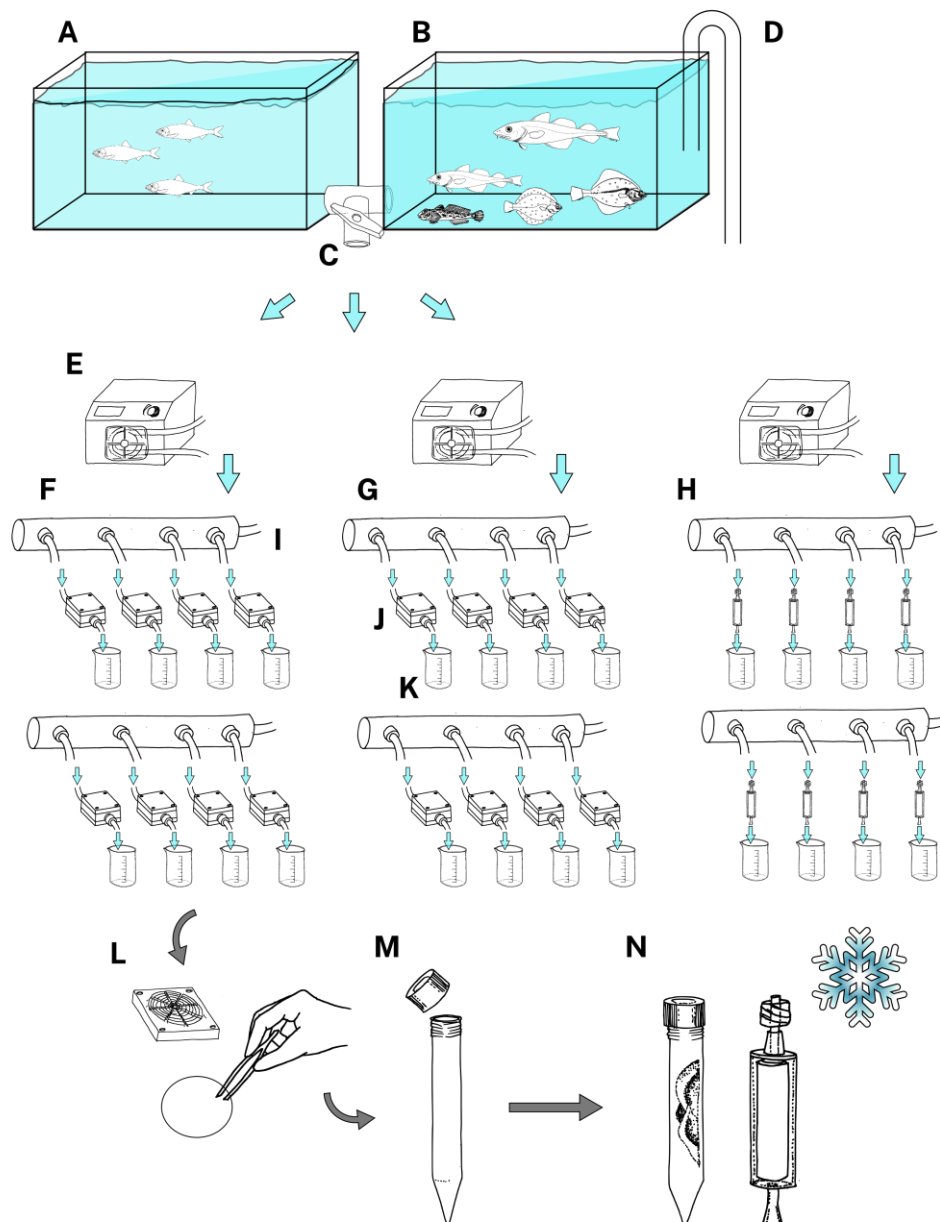
Da der ofte er stor variation i hvor mange eDNA molekyler, der kan være indeholdt i et enkelt volumen af vand – også hvis der indsamles fra en formodet homogen vandprøve (Ficetola et al., 2015), udføres der her flere biologiske filter-replikater for hver enkelt type filter. De biologiske filter-replikater vil så repræsentere forskellige filtertyper, forskellig filtermembranmateriale, og forskellige porestørrelser.

Sammenligningen af filtertyperne kan derefter gøres ud fra den målte koncentration baseret på antallet af miljø-DNA-molekyler per liter filtreret vand hvert enkelt filter har tilbageholdt.

2.1 Opsætning af forsøg og filtrering af vand

For at gøre opsætningen nogenlunde ensartet og let at gennemføre, blev der brugt pumpeudstyr og filterenheder leveret af Dansk Miljø Rådgivning (DMR) i Ålborg. Det omfattede filterenheder i forskellig porestørrelse og i forskelligt filtermembranmateriale, og trykresistente plastikslanger og pumper, og vandfordelingsenheder, samt aluminiumsblokke, der kan holde filterskiverne på plads under filtrering. Filterenheder med porestørrelser over 0,45 µm er ikke mulig at få som plastikcylinder-indkapslede filterenheder, ligesom Sterivex-filter-modellerne. Filterenheder i andet membranmateriale og med anden porestørrelse, kan i stedet fås som filterskiver i 47 mm i diameter. Filtersamlingsenheder udgøres af aluminiumsblokke fra DMR, der er konstrueret, så de kan indeholde to filterskiver på 47 mm i diameter. Vand blev med en peristaltisk pumpe, pumpet ud til en fordelingsenhed (en 'manifold'), som derpå fordelte vandet ud i otte slanger, der hver ledte vandet til en filtersamlingsenhed. Denne filtersamlingsenhed udgøres af en tredelt blok af aluminium, der kan indeholde to filterskiver (Figur 1). En sådan tredelt blok af aluminium kaldes også en 'cartridge'. En 'cartridge' har én indgang for vand, der så bliver presset igennem to filterskiver – en filterskiver på hver side af 'cartridgen', for derefter at løbe ud ad hver sin udgang. En udgang per filterskive. En 'cartridge' har således to udgange, hvor vandet, der løber ud kan samles op i hver deres 5 L kande. Kanderne er udstyret med målestreger for hver 50 mL. Efter afsluttet filtrering blev det filtrerede volumen vand aflæst på siden af kanden.

Der kan være stor variation i de niveauer af miljø-DNA, der kan registreres i filtervandprøver indsamlet fra samme lokalitet. For at forsøge at dække denne variation, er det nødvendigt med flere biologiske filterreplikater. Her blev der udført 16 replikater af hver type filterenhed, med filtrering af vand fra samme akvarium, for at kunne dække den variation, der kan være i det indsamlede vand (Ficetola et al., 2015; Stauffer et al. 2021). Derudover blev der også filtreret ferskvand i akvariets lokaler, for at få fire negative kontroller for hver type filter. De negative kontroller blev udført på ferskvand fra vandhanen. Ferskvand der stammer fra Helsingørs kommunale drikkevandsforsyning.



Figur 1. Opsætning af pumpesystem for vandfiltrering udført med peristaltiske pumper samt aluminiums-filterholder-blokke (også kaldet 'cartridges'). I ét akvarie lever sild (A), i et andet akvarie (B) lever torsk, skrubbe, rødspætte, skrubbe, sortmundet kutling, og muligvis også sandmusling. Alle akvarierne er koblet til samme vandrensningssystem (C), hvilket burde bevirke at vand fra alle akvarier bliver blandet rundt, og et enkelt udtag (D), vil repræsentere alle forbundne akvarier. Det vand, der udtages (fra D) vil så potentielt rumme miljø-DNA fra alle arter i alle sammenkoblede akvarier. I forsøgsopsætningen her udtages kun fra 'D'. En peristaltisk pumpe (E) pumper vandet via 'D' op til tre forsøgsopsætninger (F-H), hvor vandet ledes igennem en fordelingsenhed ('manifold') (I), som leder det videre til otte 'cartridges' (J). Hver 'cartridge' indeholder to filterskiver. Vandet opsamles i kander med målestreger på siden, så det filtrerede volumen kan identificeres for hver enkelt filtrering (K). 'cartridges' kan efter endt filtrering skilles ad og skive-filteret fjernes med pincet (L), og overføres til 50 mL volumen Falcon-rør (M), som så indfryses ved -15°C (N). Sterivex filteret tømmes for residual vand, og indfryses ligeledes (N).

Med tre peristaltiske pumper, der samtidigt pumper vand igennem hver deres vandfordeler ('manifold'), var det muligt samtidigt at filtrere igennem 2*16 filterskiver (fra de to første peristaltiske pumper) plus otte styks Sterivex-filter (med 0,22 µm eller med 0,45 µm porestørrelse), fra den sidste 'manifold'.

Forsøgsopstillingen blev udført i Øresundsakvariet i Helsingør på vand fra de sammenkoblede udstillingsakvarier. Udstillingsakvarierne i Øresundsakvariet, omfatter over 14 akvarier, der er forbundet med samme vandforsyningssystem. De over 14 akvarier rummer forskellige fisk, skaldyr og bløddyr. Alle akvarier i Helsingørs Øresundsakvarium er sammenkoblet til det samme vandrensningssystem, hvilket burde gøre det muligt at detektere miljø-DNA fra alle organismer i dette vandsystem (Figur 1).

De arter af fisk og skaldyr, som blev udvalgt for detektionen i filterporesammenligningen, blev gjort ud fra hvilke arter, der i forvejen er udviklet artsspecifikke detektionssystemer imod, og hvilke arter der lever i akvarierne i Helsingørs Øresundsakvarium. For detektion i denne filtersammenligning blev systemerne imod atlantisk torsk (*Gadus morhua*), skrubbe (*Platichthys flesus*), rødspætte (*Pleuronectes platessa*), sandmusling (*Mya arenaria*), atlantisk sild (*Clupea harengus*) og sortmundet kutling (*Neogobius melanostomus*) udvalgt. Dette omfatter seks artsspecifikke detektionssystemer, der tidligere er afprøvet og eftervalideret for detektion af kommercielt vigtige arter af marine fisk (Knudsen et al., 2019) og for detektion af marine ikke-hjemmehørende arter (Knudsen et al., 2022). I den uge hvor filteringen blev gennemført var fem af disse arter synlige i akvariet (Tabel 1), sandmuslingen var ikke synlig i akvariet, men kan gemme sig i sandbunden i akvariet.

Tabel 1. Liste over de arter og individer, der var tilstede i akvarierne mens filtreringen blev gennemført. De Atlantiske torsk var i eget akvarium, hvor vandet blev udtaget fra (Figur 1D), og alle individer af torsk var over 50 cm i længde. I et andet akvarium udstillingen var der rødspætte og sortmundet kutling. I et tredje akvarium var der ål sammen med rokker og torsk. Et fjerde akvarium var der kun sild. Sandmuslingen var ikke synlig i akvariet, men kan gemme sig i sandet.

Dansk navn	Latinsk artsnavn	Antal individer i akvariet
Rødspætte	<i>Pleuronectes platessa</i>	3
Sortmundet kutling	<i>Neogobius melanostomus</i>	4
Torsk	<i>Gadus morhua</i>	18
Sild	<i>Clupea harengus</i>	>20
sandmusling	<i>Mya arenaria</i>	NA
Ål	<i>Anguilla anguilla</i>	1

Sterivex-fileret (STX) på 0,22 µm i porestørrelse som Miljøstyrelsen for nuværende benytter for overvågning af miljø-DNA fra ikke-hjemmehørende arter i NOVANA programmet, er et filter med en membran, som er lavet af polyethersulfone (PES), som er indkapslet i en beskyttende plastikcylinder. Grundlaget for dette valg af filterenhed er baseret på et tidligere studie (Spens et al., 2016), der fandt dette filter optimalt for miljø-DNA indsamling. Sterivex-fileret (STX) fås også med en porestørrelse på 0,45 µm, ligeledes med PES-membran, som også er indkapslet i en 2 mL plastikcylinder.

En porestørrelse på 0,45 µm er den største porestørrelse som de indkapslede Sterivex-filtre produceres med. For porestørrelser over 0,45 µm er det derfor nødvendigt at benytte filtrer, der ikke er indkapslede men i stedet leveres i flade skiver, typisk med en diameter på 47 mm. Filterskiver med porestørrelser over 0,45 µm leveres ikke lavet af polyethersulfone (PES), men kan fås lavet i nylon (NYL) og polykarbonat (PLC). Nylon er nok det membranmateriale, der ligner mest en PES-membran, hvorfor denne membrantype udover Sterivex-filtre på 0,22 µm indkapslet i beskyttende cylinder, også afprøves som et 47 mm diameter 0,22 µm pore filter.

For nærværende opsætning af et filtersammenligningsforsøg var det muligt at indhente filterskiver med membraner lavet af PES, NYL og PLC. Filtermembranerne var med varierende porestørrelse fra 0,22 µm til 3,0 µm. I alt blev ti forskellige filtertyper udvalgt for sammenligning. Heraf var to af dem Sterivex-modellen med membranen indkapslet i en plastikcylinder. Alle ti typer af filter blev afprøvet i 16 replikater for vand fra akvarierne, og i fire replikater for de negative kontroller udført på ferskvand (Tabel 2).

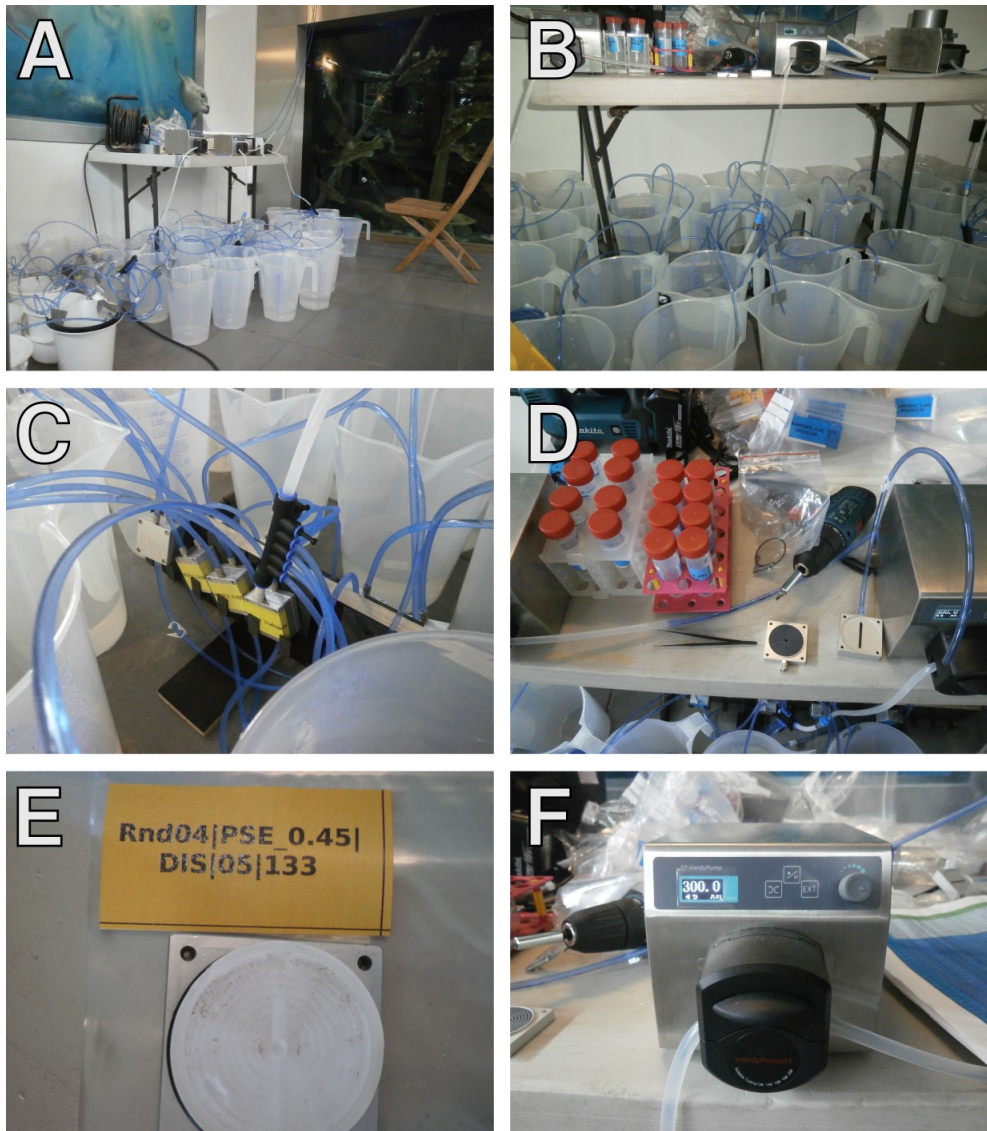
Tabel 2. Forskellige filtertyper blev afprøvet i forsøgsopsætningen. 'Filtertype' angiver om filtermembranen er indkapslet i plastikcylinder (CYL), eller som frit eksponeret filterskive (SKV), der skal fastholdes i en 'cartridge'. 'Membranmateriale' angiver om filtermembranen er af polyethersulfone (PES), nylon (NYL) eller polykarbonat (PLC). Filtermembranens 'porestørrelse' er i µm. Det 'vand', der filtreres, er enten fra de sammenkoblede akvarier (AK) eller ferskvand fra vandhanen for de negative kontroller (NK). Forkortelsen for filtertypen er sammensat af hvad membranmaterialet er lavet af, og porestørrelsen, med undtagelse af Sterivex-filteret (STX), som har membranen indkapslet i en plastikcylinder. For de negative kontroller på ferskvand er ('NK') tilføjet til sidst i forkortelsen.

Filtertype	Membran materiale	Porestørrelse (µm)	Antal biologiske filterreplikater	Vand	Filter forkortelse
CYL	PES	0,22	16	AK	STX 0.22
CYL	PES	0,22	4	NK	STX 0.22NK
CYL	PES	0,45	16	AK	STX 0.45
CYL	PES	0,45	4	NK	STX 0.45NK
SKV	NYL	0,45	16	AK	NYL 0.45
SKV	NYL	0,45	4	NK	NYL 0.45NK
SKV	PLC	0,22	16	AK	PLC 0.22
SKV	PLC	0,22	4	NK	PLC 0.22NK
SKV	PLC	0,40	16	AK	PLC 0.40
SKV	PLC	0,40	4	NK	PLC 0.40NK
SKV	PLC	0,80	16	AK	PLC 0.80
SKV	PLC	0,80	4	NK	PLC 0.80NK
SKV	PLC	1,20	16	AK	PLC 1.20
SKV	PLC	1,20	4	NK	PLC 1.20NK
SKV	PLC	3,00	16	AK	PLC 3.00
SKV	PLC	3,00	4	NK	PLC 3.00NK
SKV	PSE	0,22	16	AK	PSE 0.22
SKV	PSE	0,22	4	NK	PSE 0.22NK
SKV	PSE	0,45	16	AK	PSE 0.45
SKV	PSE	0,45	4	AK	PSE 0.45NK

Med en opsætning med tre peristaltiske pumper fra DMR (Figur 1) og tre 'manifold'-vandfordelere var det muligt at indsamle flere filterreplikater fra den samme overordnede vandprøve (Figur 2). Filterskiver på 47 mm i diameter blev placeret på 'cartridges'. En 'manifold'-vandfordeler ledte vandet ud ad otte udgange, og igennem trykresistente siliconeslanger, der kan klare trykket fra den peristaltiske pumpe. Med otte udgange fra en 'manifold', blev otte 'cartridges' koblet på hver 'manifold'. For hvert enkelt filter blev et tidspunkt for start og afsluttet filtrering noteret (Bilag A). Mængden af vand, der var filtreret igennem blev også noteret.

For at sikre, at der blev filtreret med et ensartet tryk over alle de forskellige biologiske filter-replikater, blev de samme filterreplikater af én enkelt filtertype samlet på samme 'manifold', så trykket over alle 16 filterskiver (eller otte STX filterenheder) er det samme. Efter afsluttet filtrering blev STX filterenheder og 'cartridges' tømt for resterende vand, der måtte sidde tilbage inde i filteret, ved at presse luft igennem. Den sidste rest af vand kunne presses ud med en batteridrevet minikompressor, der kunne kobles på med en cykelventil og lave et tryk på 3 atm. Med en skruemaskine kunne 'cartridges' skilles ad, og filterskiver blev overført til individuelle 50 mL falcon rør med en pincet (Figur 2). Filterenhederne blev indfrosset

hurtigst muligt efter overførsel til falcon rør, og tidspunktet for indfrysning blev noteret (Bilag A). Filtrene blev pakket ned i tøris for den senere transport fra fryseren i Ørsesundsakvariet til fryseren i det genetiske laboratorium, for at sikre at der ikke skete en temperaturstigning under transporten, da det kan medføre, at det indsamlede miljø-DNA nedbrydes.



Figur 2. Opsætningen i Ørsesundsakvariet for filtrering af vand. (A) På et bord ved siden af akvariet var tre peristaltiske pumper placeret, og tre slanger hentede vand fra den øverste kant af akvariet, som kan ses i baggrunden. Dette udstillingsakvarie havde mere end 10 store torsk, og er også forbundet med de andre akvarier i udstilling via det fælles vandsystem. (B) Pumperne på bordet ledte vandet ned til en vandfordeler ('manifold'), der delte vandet i otte enkelte slanger, der løb til hver sin aluminiumsblok ('cartridge'), der indeholder to filterskiver. Vandet løb derefter ned i hver sin kande, så det var muligt at aflæse hvor meget vand, der blev filtreret. (C) En 'manifold' i midten ledte vandet ud til otte 'cartridges'. (D) En 'cartridge' skilt ad med en skruemaskine. Efter filtrering blev filterskiven placeret i et 50 mL 'falcon' rør (her med røde skruelåg), ved at løfte filteret af med en pincet. Alle 'falcon' rør var i forvejen mærket med etiket med et unikt prøvenummer. (E) Det færdige filter inden det overføres fra en 'cartridge'. Hvert 'falcon' rør blev placeret i en plastic pose der i forvejen var mærket med en etiket med et unikt nummer, der gør det muligt at identificere filteret senere. Plastikposen med filteret i 'falcon' røret blev derefter lagt i en -15 °C fryser. (F) Alle pumper var sat til at filtrere med samme tryk og hastighed.

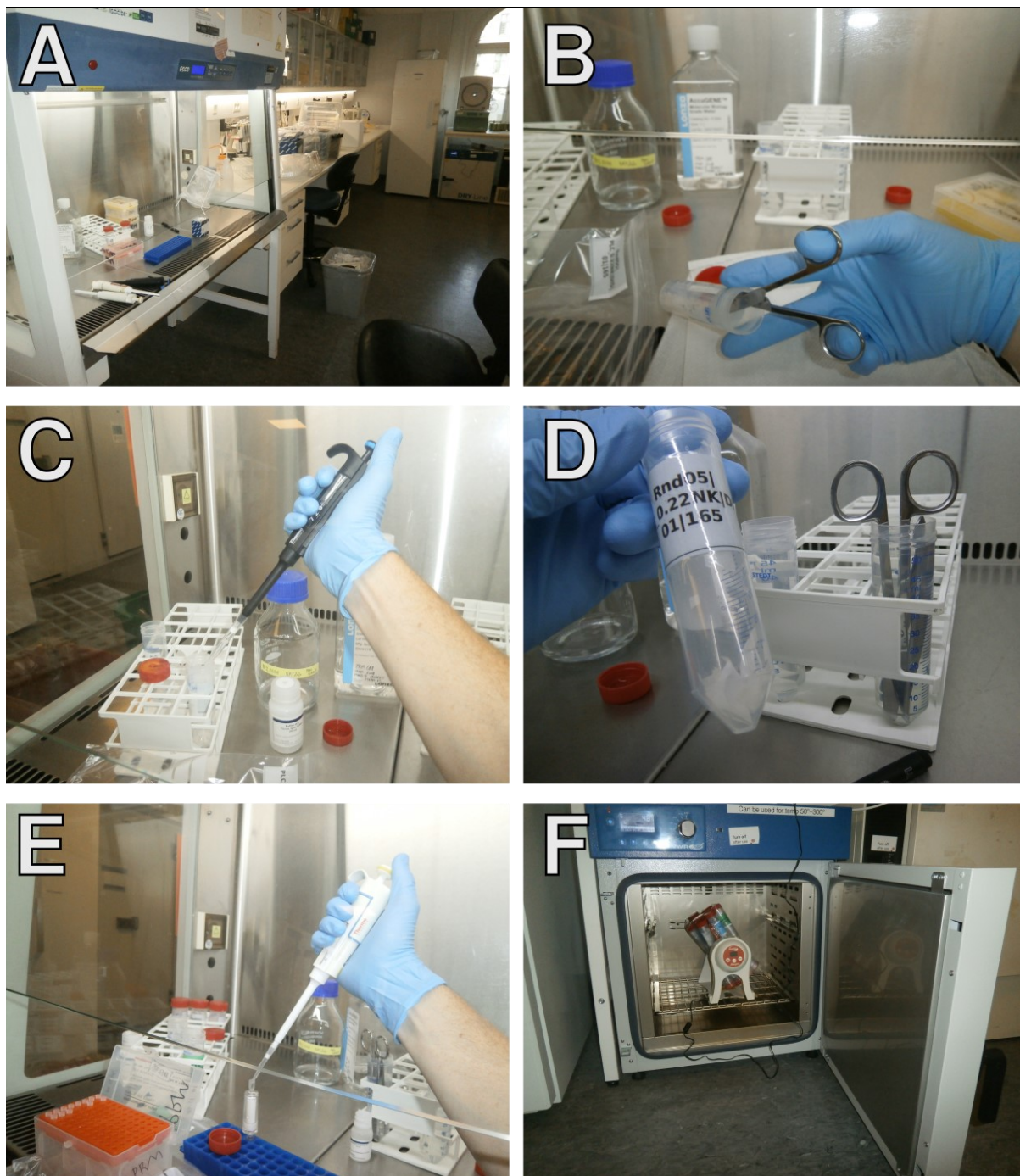
2.2 Ekstraktion fra filterenheder

For at minimere risikoen for at resultaterne ikke blev udført på grundlag af DNA fra fremmede kilder, blev alt genetisk laboratoriearbejde udført i samarbejde med Statens Naturhistoriske Museum (SNM), der har adgang til det moderne genetiske laboratorium ved GLOBE instituttet på Københavns Universitet (KU). Dette er et moderne genetisk laboratorium, der er sat op til arbejde med lave niveauer af DNA, og har de mest moderne faciliteter for sporing af miljø-DNA. Laboratoriets lokaler udgøres af flere adskilte laboratorier, der alle har dekontamineringsprotokoller, der lever op til de krav, der fremsættes i international forskning i miljø-DNA (de Silva Wijeyeratne & Gweon, 2025; Goldberg et al. 2016; Gefrides et al. 2010; Hoffmann et al., 2020; Spens et al., 2017). Med baggrund i tidligere forskning indenfor overvågning af marine ikke-hjemmehørende arter i danske farvande (Knudsen et al. 2019, 2020, 2022), blev der benyttet de samme protokoller for ekstraktion af miljø-DNA fra filterprøver og for detektion af miljø-DNA.

Ekstraktion af DNA fra Sterivex-filterenhederne blev udført med Qiagen Blood and Tissue kit (katalog nummer: 69504) tilsvarende hvad der er gjort i tidligere protokoller (Knudsen et al., 2022; Sigsgaard et al., 2016; Spens et al., 2017). Ekstraktion af DNA fra filterskiverne blev også udført med Qiagen Blood and Tissue kit, men filterskiven blev her klippet i stykker forinden, og inkuberingen i udført dobbelt så stort volumen buffer og proteinnedbrydende enzym, som benyttet i tidligere protokoller. Tilsætning af dobbelt så stor mængde buffer, var nødvendig for at sikre, at de ituklippede filterskiver, var helt dækket af buffer under inkuberingen i varmeskab (Figur 3). Ekstraktionerne blev udført over otte omgange, hvor hver omgang inkluderede en negativ ekstraktionskontrol, som kun består af de reagenser, der benyttes for ekstraktionen fra filterenhederne. Disse negative ekstraktionskontroller tjener til at sikre, at de reagenser, som bruges under ekstraktionen af miljø-DNA fra filter-enhederne ikke er forurenet med fremmed DNA, eller fremmed DNA, der kan være blevet tilført fra andet sted i laboratoriet. Hver eneste ekstraktion blev til sidst elueret i 200 µL AE-buffer, således at hvert eluat er en ensartet repræsentation af den oprindelige filtrering.

Efter ekstraktion af alt DNA fra filterprøverne, blev hver ekstraktion målt for koncentrationen af DNA. Koncentrationsmålingen blev udført med Qubit Fluorometer High Sensitivity assay (ThermoFischer Scientific), på 4 µL af hver ekstraktion. En koncentrationsmåling måler alt DNA i ekstraktionen, både DNA fra prokaryote og eukaryote organismer, og eventuelle vira, der måtte have været i vandet under filtreringen. Koncentrationsmålingen kan derfor ikke bruges som mål for, hvor godt filterenhederne har tilbageholdt miljø-DNA fra de seks arter, der skal detekteres. Men koncentrationsmålingen kan alligevel give en grov indikation på hvor meget DNA, der er blevet ophobet på en filterenhed. Dette ophobede DNA vil dog stamme fra alle eukaryote og prokaryote organismer, der lever i vandet, plus eventuelle vira.

Efter eluering og koncentrationsmåling på ekstraktionerne, blev alle ekstraktioner opbevaret på -15°C i en almindelige fryser, indtil de senere kunne analyseres for niveauer af specifikt miljø-DNA på ddPCR platform.



Figur 3. Fotos af ekstraktion af DNA fra filterprøverne. (A) Alle ekstraktioner blev udført i et 'laminar flowhood', som er et kabinet med glasplade forrest og et konstant indsug ind og opad i kabinettet, der forhindrer at dråber og aerosoler kan falde ned på væskeoverflader i de rør, der åbnes inde i kabinettet. (B) Filterskiven blev klippet i stykker nede i 'falcon' røret (her med rødt låg). Saksen blev forinden renset i klorin og derefter i alkohol, for at fjerne eventuelt DNA, der måtte være på saksen. (C) Buffervæske og proteinnedbrydende enzym blev så tilsat til røret med det ituklippede filter. (D) Filteret i bunden af røret er derved dækket med buffervæske og proteinnedbrydende enzym, og ved siden af bliver saks og pincet renset i en klorinopløsning. (E) De indkapslede 'sterivex' filterenheder, blev så også tilsat buffervæske, og proteinnedbrydende enzym, så filteret inde i plastikcylinderen var dækket. (F) Alle rør og indkapslede filter blev lukket, og spændt fast på en rotor, der blev inkuberet natten over i et varmeskab. Den efterfølgende dag afsluttedes ekstraktionen med oprensning af det udvundne DNA, ved at følge protokollen der følger med et Qiagen Blood and Tissue kit.

2.3 Kvantifikation af miljø-DNA-molekyler

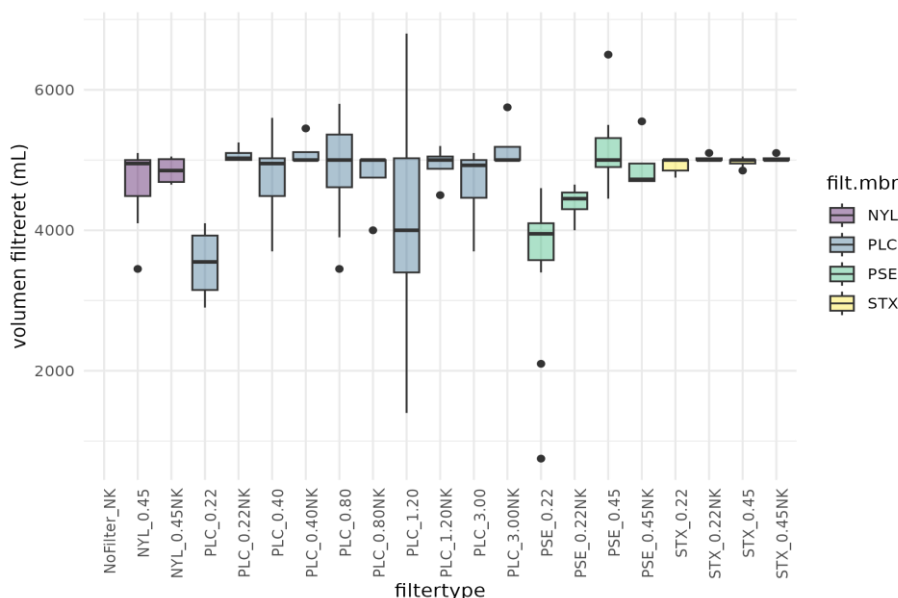
Kvantifikationen af miljø-DNA i ekstraktionerne fra filterprøverne, blev udført ved at benytte ddPCR teknik med 'droplet generator' (BioRad), en PCR-maskine (BioRad) og en 'QX200 droplet reader' (BioRad). Opsætningen af ddPCR følger protokollen for 'QX200 droplet reader', med 22 μL volumen reaktioner, hvoraf 10 μL er 'BioRad super probe mix without probe', og 10 μL blev udtaget fra hver ekstraktion fra de enkelte filterreplikater. De sidste 2 μL blev så udgjort af primer og probe, som var forberedt i koncentrationer, der gør at slutkoncentrationen for hver enkelt ddPCR reaktion til sidst tilsvarede den optimale slutkoncentration udledt i tidligere studier (Knudsen et al., 2019; 2022). For hver ddPCR benyttes de artsspecifikke primere og prober for marine fisk tidligere publiceret (Knudsen et al., 2019), og artsspecifikke primere og prober for ikke-hjemmehørende arter (Knudsen et al., 2022). De seks detektionssystemer, der her blev benyttet omfatter sild (*Clupea harengus*), atlantisk torsk (*Gadus morhua*), sandmusling (*Mya arenaria*), sortmundet kutling (*Neogobius melanostomus*), skrubbe (*Platichthys flesus*) og rødspætte (*Pleuronectes platessa*). Disse arter blev udvalgt fordi de alle var tilstede i Øresundsakvariets udstillingsakvarier, og fordi der allerede er udviklet og valideret artsspecifikke detektionssystemer mod disse arter. Temperaturprofiler og varighed af enkelte trin i PCR-opsætningen følger også tidligere protokoller (Knudsen et al., 2019; 2022; Rasmussen et al., 2023). For alle ddPCR opsætninger blev en absolut fortyndingsrække inkluderet med fortyndingstrin i dekader fra 10^4 kopier/ μL til 10^{-2} kopier/ μL . Forberedelse og koncentrationsberegning af den absolutte fortyndingsrække følger tidligere protokoller (Agersnap et al., 2017; Knudsen et al., 2019; 2022), og bygger på de samme artsspecifikke primere som førhen er benyttet for detektion af miljø-DNA for de enkelte arter, der overvåges (Knudsen et al., 2022; 2025).

Alle niveauer af miljø-DNA registreret i ekstraktionerne blev sat i forhold til det volumen vand, der blev filtreret igennem det enkelte filter. For at sætte niveauer af miljø-DNA i ekstraktionerne i forhold til det volumen, der blev filtreret, blev antallet af kopier per ng/ μL målt med ddPCR delt med det volumen vand, der blev filtreret igennem filteret. Dette forhold vil hjælpe til at tage højde for, at der muligvis kan ende med at være flere miljø-DNA molekyler fanget på et filter som et resultat af, at der er filtreret meget vand igennem filteret. Ved at dele antallet af molekyler med det volumen vand, der er filtreret igennem filteret, vil antallet af molekyler per volumen vand kunne sammenholdes på tværs af de enkelte filterenheder. Alle tidspunkter for afsluttet filtrering og indfrysning blev noteret, og senere sammenholdt. Tidspunkterne sammenholdes fordi der er en risiko for, at det indsamlede miljø-DNA kan nå at henfalde, og blive nedbrudt af mikrobiel aktivitet (Andruszkiewicz et al., 2017; Collins et al., 2018; Mächler et al., 2018), i det tidsrum, der går fra filtreringen er afsluttet til filteret indfryses. For at forhindre en sådan nedbrydning blev alle filterenheder lagt i fryseren indenfor en time. For at vurdere om niveauerne af miljø-DNA ekstraktionerne er et resultat af en nedbrydning indenfor denne time, blev antallet af molekyler per L vand filtreret sammenholdt med den tid, der gik mellem afsluttet filtrering og indfrysning. Den umiddelbare antagelse er, at der ikke sker en tilstrækkelig nedbrydning af det indsamlede miljø-DNA indenfor denne time. Er dette tilfældet, kan det have indflydelse på de senere antagelser om, hvorvidt de forskellige filtertyper har forskellig evne til at tilbageholde miljø-DNA fra de eftersøgte arter, da variationen i niveauerne af tilbageholdt miljø-DNA i så fald også kan være et resultat af at noget indsamlet miljø-DNA er blevet nedbrudt, indenfor denne time, der gik indtil filteret blev indfrosset.

3 Resultater

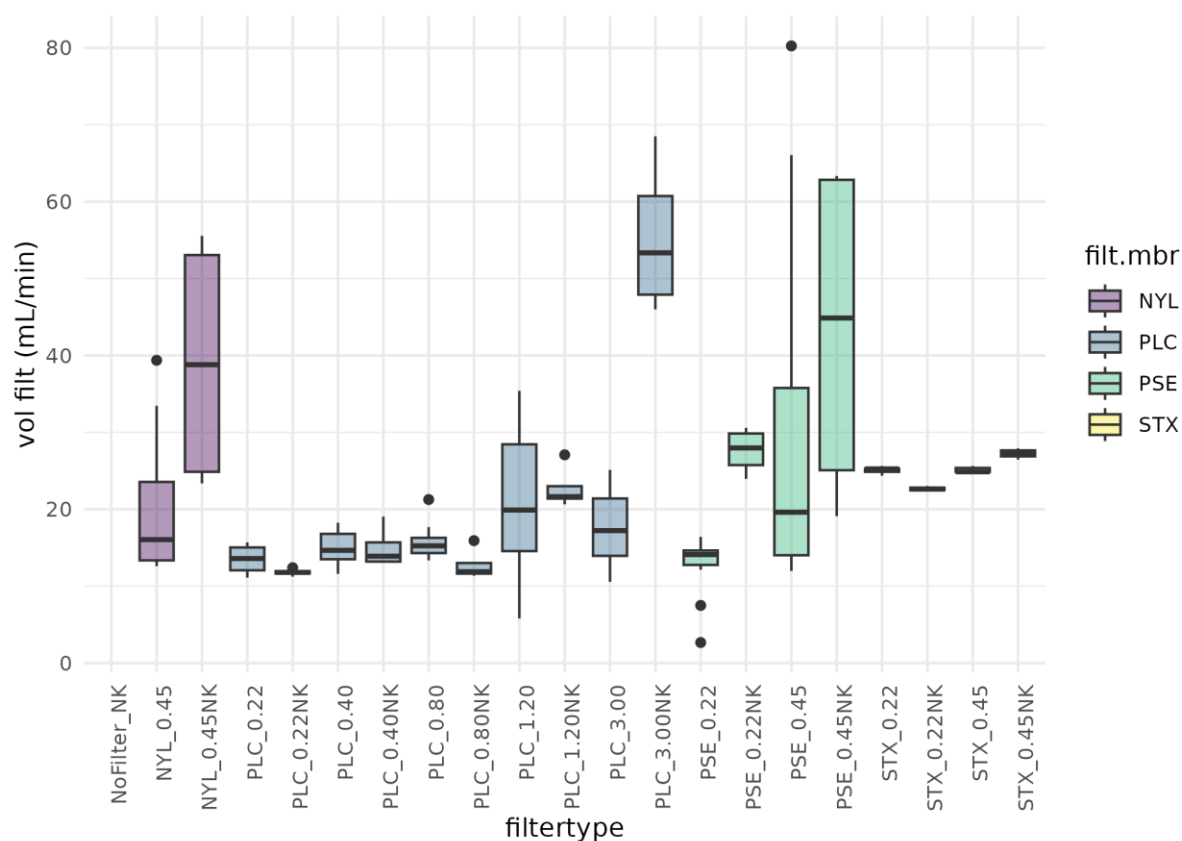
Alle filterprøver blev filtreret over i alt fem dage indenfor en periode på to uger, hvor filterprøverne på akvariets vand blev afsluttet indenfor samme uge, og de negative kontroller blev udført på en enkelt dag indenfor de to ugers forløb (Bilag A). Alle filterprøver blev indfrosset senest en time efter afsluttet filtrering. Vandet i akvariet viste sig at være fri for blokerende partikler, så det var muligt at filtrere op imod 5 L vand for de fleste filterenheder (Figur 4). For alle filterenheder blev starttidspunktet noteret, og hvornår filtreringen blev stoppet, og hvornår filteret blev lagt i en fryser. Med flere 'cartridges' per 'manifold' var der nogle filterenheder (NYL, PSE og PLC), der havde en lav gennemløbshastighed (Figur 5), hvor der kun løb få mL igennem per minut. Fordi det tog for lang tid at få filtreret de ønskede 5 L vand, blev disse filterenheder stoppet tidligere, hvilket så resulterede i et mindre volumen som slutvolumen (Figur 4). Alle Sterivex (STX) filterenheder havde en gennemløbshastighed på mellem 20 mL/min og 30 mL/min. De filtermembraner i 'cartridges', der havde hurtigere gennemløbshastighed på over 40 mL/min (Figur 4) var negative kontroller. De filtermembraner i 'cartridges', der var længst tid om at løbe igennem var polycarbonatfilterne (PLC) på akvarievand, som havde en gennemløbshastighed på under 20 mL/min (Figur 4).

Koncentrationen af alt DNA i hver ekstraktion fra hver filterenhed var imellem 3000 ng/mL/L og 4500 ng/mL/L (Figur 4) for vandprøverne fra de sammenkoblede akvarier. For de negative filterkontroller filtreret på ferskvand i Øresundsakvariets lokaler var koncentrationen af alt DNA fra ekstraktionerne imellem 0 ng/mL/L og 1500 ng/mL/L (Figur 6). Koncentrationsmålingerne på alt DNA for hver ekstraktion omfatter dog både eukaryot- og prokaryot DNA, og er ikke repræsentativt for de seks specifikke arter, der skulle detekteres med ddPCR. For alle negative ekstraktionskontroller - udført på kun reagenserne benyttet i laboratoriet - var det ikke muligt at måle koncentrationer af DNA over 0,1 ng/μL (Bilag A).

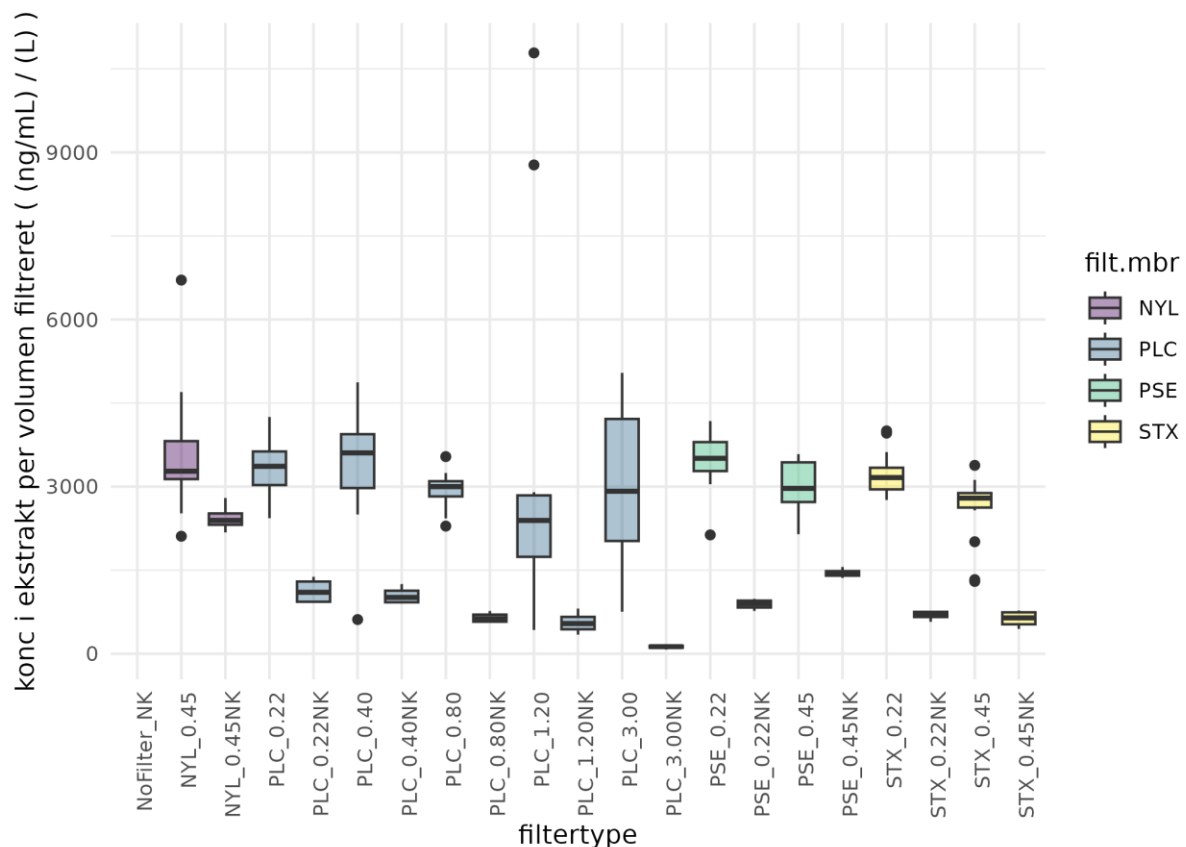


Figur 4. Filtreret volumen vand for de forskellige filtertyper som boxplot, med afvigende yderpunkter som sorte prikker. Forkortelserne for og farvekodningen for boxplot følger filtertyperne og er: Sterivex (STX, gul), polyethersulfone (PES, grøn), polykarbonat (PLC, blå), nylon (NYL, violet). De negative kontroller (NK) er farvet efter filtertypen. Porestørrelsen er i μm, og følger forkortelserne som i tabel 2. For alle vandprøver blev der udført 16 biologiske filterreplikater, for alle negative kontroller (NK) blev der udført fire biologiske replikater. Volumen af vand, der blev filtreret igennem filteret, blev aflæst fra den kande hvori vandet fra filteret blev opsamlet. For de fleste filterenheder blev der filtreret omkring 5 L vand. Nogle filterenheder fik mere eller mindre vand igennem end de planlagte 5 L. Ingen filterenheder blev

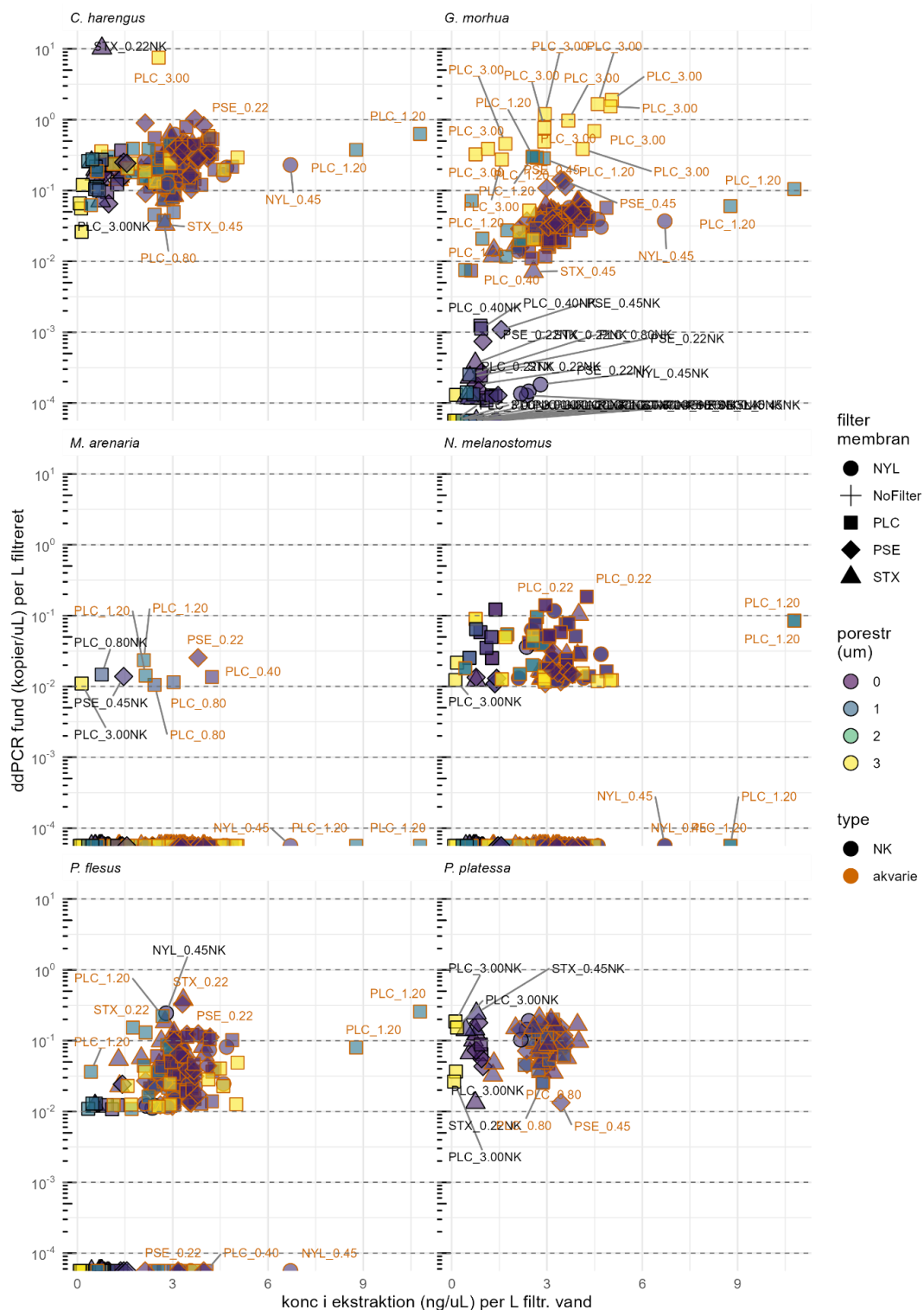
blokeret af partikler, men for nogle filterenheder tog det for lang tid at filtrere vand igennem, og filtreringen måtte afbrydes, inden der var kommet 5 L vand igennem.



Figur 5. Gennemløbshastighed for de forskellige filtertyper som boxplot, med afvigende yderpunkter som sorte prikker. Udregnet som filtreret volumen vand filtreret over tid (mL per minut) for de forskellige filtertyper. Forkortelserne for filtertyperne er som i tabel 2, og 'filt.mbr' er en farvekodning, der følger filtermembranmaterialet, som i figur 4. For alle vandprøver blev der udført 16 biologiske filterreplikater, for alle negative filter kontroller blev der udført fire biologiske replikater.



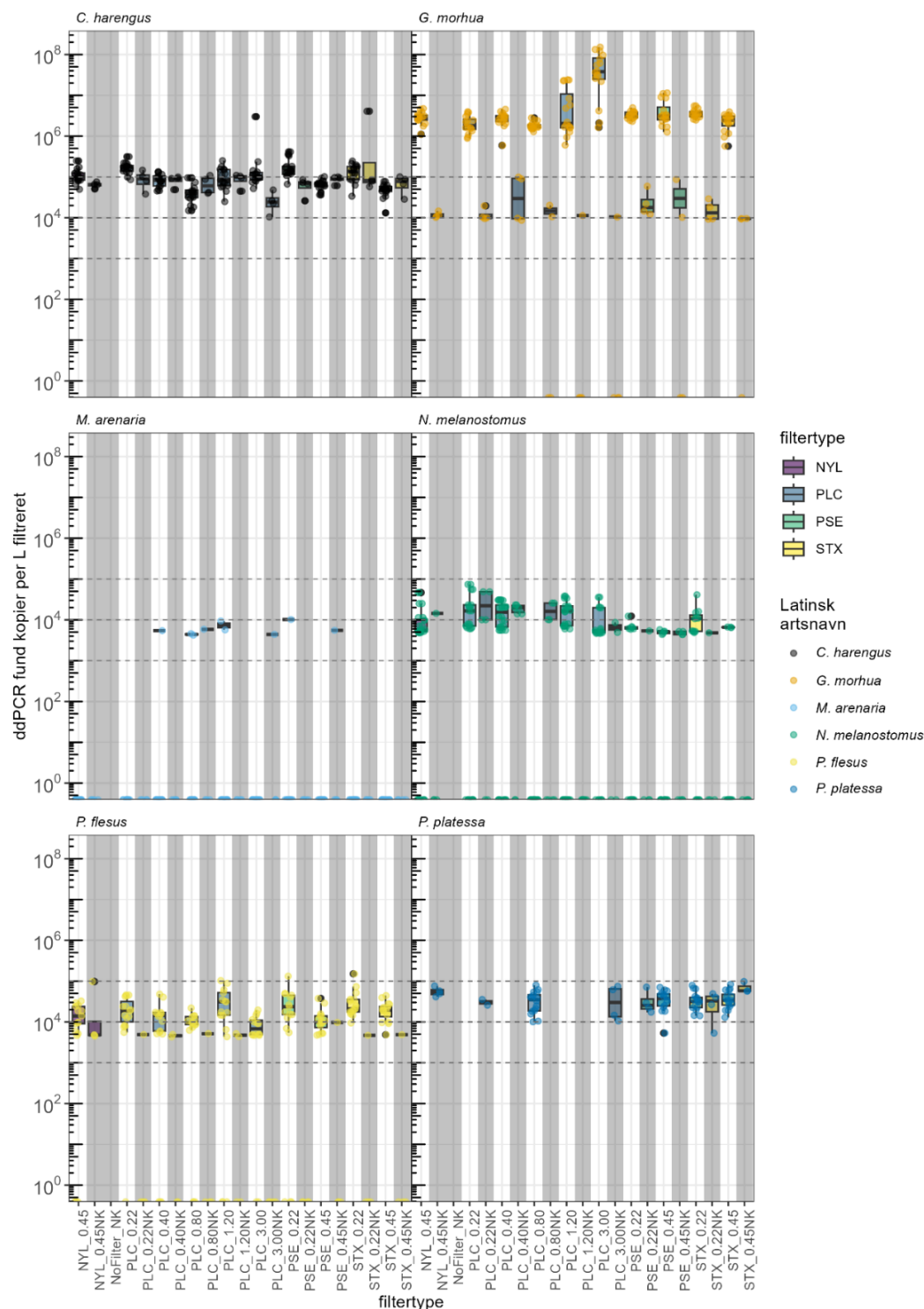
Figur 6. Koncentration af alt DNA i ekstraktionen fra filteret per filtreret volumen vand for de forskellige filtertyper. En koncentrationsmåling på alt DNA ekstraheret fra filteret vil omfatte DNA fra alle eukaryote og prokaryote organismer i vandet, samt eventuelle vira. Koncentrationen af alt DNA i ekstraktionen er derfor ikke nødvendigvis en afspejling af hvor meget miljø-DNA, der kan detekteres fra de arter, der skal overvåges med specifikke detektionssystemer. Fordi de forskellige filterenheder og filterreplikater fik filtreret forskellige mængder vand igennem, er koncentrationerne her præsenteret i forhold til det volumen vand, der kom igennem filteret. Dette er for at justere koncentrationsmålingerne, så de kan sammenholdes, da et filter som har fået et stort vandvolumen presset igennem, også kan forventes at have akkumuleret mere miljø-DNA. Forkortelserne for filtertyperne følger tabel 2, og 'filt.mbr' er en farvekodning, der følger filtermembranmaterialet, som i figur 4. Antallet af prøver for hver box (med afvigende yderpunkter som sorte prikker) er antallet af replikater, som angivet i tabel 2.



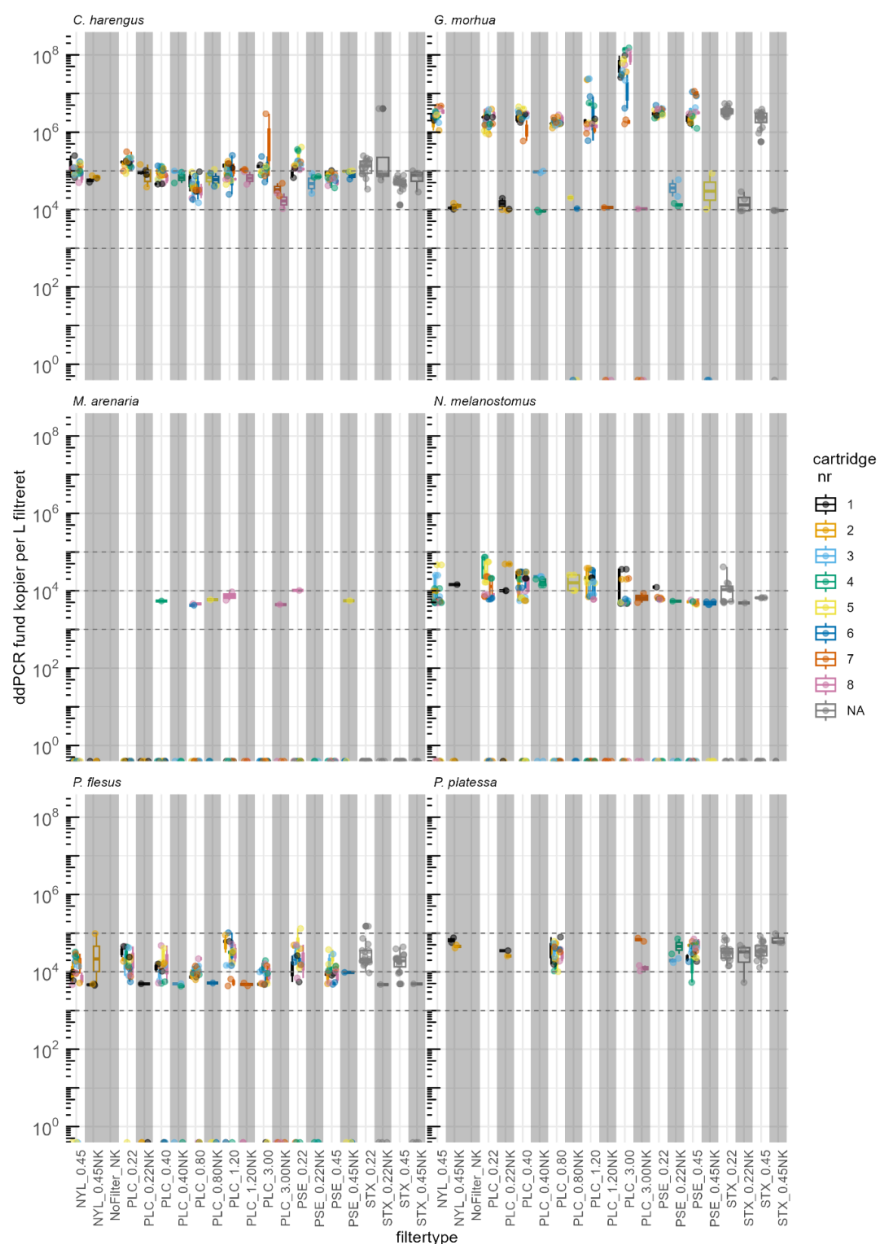
Figur 7. Antallet af DNA-molekyler per μL ekstraktion per L vand filtreret fundet med ddPCR sammenholdt med ekstraktionens totale koncentration af DNA per L vand filtreret. For sild (*C. harengus*), torsk (*G. morhua*), sandmusling (*M. arenaria*), sortmundet kutling (*N. melanostomus*), skrubbe (*P. flesus*) og rødspætte (*P. platessa*). En høj koncentration af DNA i en ekstraktion er ikke ensbetydende med at de eftersøgte DNA-molekyler også er til stede i store mængder. En høj koncentration (ng/uL per L filtreret vand) af DNA i ekstraktionen kan stamme fra både prokaryote og eukaryote organismer, der er i vandet. Forkortelser for filtertyper er som angivet i tabel 2. 'NoFilter' angiver de ekstraktionskontroller der blev udført i laboratoriet, som kun blev gjort på reagenser alene. De negative kontroller med ferskvand filtreret er angivet med 'NK' og sort kant, og vandprøver fra akvariet er med mørk orange kant og angivet 'akvarie'.

Med ddPCR var det muligt at tælle hvor mange miljø-DNA-molekyler, der var i hver ekstraktion. Alle negative ekstraktionskontroller, var uden miljø-DNA. Alle negative filterkontroller som blev udført i Øresundsakvariet, ved at filtrere ferskvand fra en helt almindelig vandhane med postevand fra Helsingør kommunes vandværk, havde lave niveauer af miljø-DNA (Figur 6), men havde forskellige niveauer af miljø-DNA fra de eftersøgte arter (Figur 7 og 8). Niveauerne af miljø-DNA fra de eftersøgte arter i de negative filterkontroller var for fem af de eftersøgte arter på niveau med hvad, der kunne detekteres i de filtervandprøver, der var indsamlet fra det sammenkoblede akvarie (Figur 8). En væsentlig del af de negative filterkontroller gav positive detektioner af miljø-DNA fra de eftersøgte arter. Dette var især gældende for detektionsforsøget imod miljø-DNA fra sild (Figur 8), hvor alle negative filterkontroller havde et niveau af miljø-DNA på over 10000 kopier per L vand filtreret (Figur 8). Niveauet af miljø-DNA fra sild i de tilsvarende filterprøver på akvarievand, var dog ikke højere end det baggrunds niveau af miljø-DNA, der kunne spores i de negative filterkontroller. Kun for skrubben og for torsken var det muligt at se en forskel i miljø-DNA niveauerne imellem filterprøver på akvarievand og negative filterkontroller på ferskvand. For detektionen af miljø-DNA fra torsk var niveauerne af miljø-DNA i akvarieprøverne op imod 100 til 10.000 gange højere end hvad der kunne registreres i de negative filterkontroller.

Ud fra antallet af molekyler per filtreret L vand sammenholdt med den tid der gik inden filteret blev lagt i fryseren (Figur 10), er der ikke lige noget der direkte antyder, at det indsamlede miljø-DNA kan være henfaldet indenfor den ene time, der gik inden filteret blev lagt i fryseren. For torsk (Figur 10, *G. morhua*) er der et mere eller mindre ensartet niveau af miljø-DNA over alle de filterprøver der indenfor en time kom i fryseren. Niveauerne af miljø-DNA fra torsk i PLC_3.00 filterne er de højeste, der blev registreret, men veksler fra 10^8 til 10^6 molekyler per L filtreret over den time, der gik inden filteret blev lagt i fryseren. Variationen fra 10^8 til 10^6 molekyler per L filtreret for disse prøver udviser ikke en sammenhæng med den tid, der gik inden filteret blev lagt i fryseren (Figur 10, *G. morhua*). Derfor er der ikke lige noget der antyder, at de forskelle der blev registreret i niveauerne af miljø-DNA, kan tilskrives, at nogle af filterprøver kom senere i fryseren end andre.



Figur 8. Antallet af DNA-molekyler per μL ekstraktion fundet med ddPCR per L vand filtreret. For sild (*C. harengus*), torsk (*G. morhua*), sandmusling (*M. arenaria*), sortmundet kutling (*N. melanostomus*), skrubbe (*P. flesus*) og rødspætte (*P. platessa*). Forkortelser for filtertyper er som angivet i tabel 2, og 'filter type' har en farvekodning, der følger filtermembranmaterialet som i figur 4. De negative kontroller med ferskvand filtreret er markeret med grå lodrette zoner. De hvide områder rummer så målingerne fra filterprøverne. Filtreret vand fra Øresundsakvariets udstillingsakvarie har fra 10.000 og op til 100 millioner DNA-molekyler per L vand filtreret. De negative kontroller har omkring 10.000 DNA-molekyler per L vand filtreret eller mindre. Antallet af filterreplikatprøver for hver filtertype er angivet i tabel 2. Kun for torsk (*G. morhua*) er der en tydelig forskel på 100 eller 10.000 gange mere DNA i akvarievandet, når de samholdes med de negative kontroller.



Figur 9. Antallet af DNA-molekyler fundet med ddPCR per L vand filtreret. Med angivelse i farver for hvilke 'cartridges' (filtersamlingsenheder) de enkelte filterskiver stammer fra. For sild (*C. harengus*), torsk (*G. morhua*), sandmusling (*M. arenaria*), sortmundet kutling (*N. melanostomus*), skrubbe (*P. flesus*) og rødspætte (*P. platessa*). Forkortelser for filtertyper er som angivet i tabel 2. De negative kontroller (NK) med ferskvand filtreret er markeret med grå lodrette zoner. De filterskiver, der har høje mængder af DNA-molekyler stammer fra forskellige 'cartridges', hvor den anden filterskive har haft et lavere antal af DNA-molekyler. Det lader altså ikke til at enkelte 'cartridges' har været bedre til at opsamle DNA-molekyler end andre. Det er nok mere fordi den ene filterskive i en 'cartridge' har akkumuleret mere DNA per L vand filtreret, end den anden filterskive i samme 'cartridge'. For sterivex-filterenhederne var der ikke enkelte 'cartridges', så punkter og boxplot er for STX markeret med grå, og med 'NA' for 'cartridge'-nummer.



Figur 10. Antallet af DNA-molekyler fundet med ddPCR per L vand filtreret sammenholdt med tiden (minutter) mellem afsluttet filtrering og indfrysning af filteret. Farvekodning og faconer på symboler er som i figur 7. Hovedpartne af filterenhederne blev bragt til fryseren indenfor under 1 time. Antallet af molekyler per L filtreret er mere eller mindre uændret for hver filtertype indenfor hver art indenfor den time der gik inden filteret blev indfrosset. Hvilket her antages at være et billede på at det indsamlede miljø-DNA ikke når at henfalde indenfor den en time, der gik indtil filteret blev lagt i fryseren.

4 Sammenfatning og konklusioner

Ingen af filterenheder blev i høj grad blokeret af partikler under filtreringen, så for de filterenheder hvor filtreringen blev afsluttet inden de 5 L var pumpet igennem, var det fordi filtreringen tog for lang tid. At filtreringen tog for lang tid kan både skyldes filtermembranmaterialet og porestørrelse, men kan også være et resultat af en mindre ophobning af partikler på filteret, der resulterer i en nedgang i gennemløbshastigheden. Men det var ikke fordi filterenhederne udviste tegn på fuld blokering. Dette skyldes sandsynligvis, at vandet i Helsingørs udstillingsakvarie er meget rent, og at den filtrering, som vandet i akvariet gennemgår, er mere effektiv, end hvad det indledningsvist var forventet.

Ud fra sammenligningen af niveauerne af miljø-DNA fra torsk, lader det til, at det er muligt at indfange op imod tusind gange så mange miljø-DNA-molekyler på et PLC-filter med 3,0 µm porestørrelse (Figur 8) for torsk (*G. morhua*). Dette kunne, ud fra denne ene art, tyde på, at det er muligt at øge mængden af det relevante miljø-DNA, ved at skifte til en større porestørrelse. Det var ikke muligt at se en tilsvarende forøgelse for de andre arter, der blev forsøgt detekteret. Det er uheldigt, da en forøgelse i miljø-DNA molekyler helst burde være tilsvarende for flere end blot en enkelt art. At anbefale en anden filtertype og anden porestørrelse på baggrund af kun en art, må nok betragtes som et meget spinkelt grundlag, for at konkludere, at det kan være fordelagtigt at skifte filtertype. Udover at denne forøgelse i ophobning af miljø-DNA molekyler, er der også andre ulemper forbundet ved at benytte en anden type filter. Udførelsen af filtreringsforsøget gav mulighed for at inddrage flere overvejelser, der er vigtige i fald andre filtertyper og porestørrelser skal tages i brug for at indsamle miljø-DNA molekyler.

At benytte filterskiver istedet for Sterivex filtre, hvor filtermembranen er indkapslet i en beskyttende plastikcylinder, er ensbetydende med en større risiko for at fremmed DNA lettere kan forurene den eksponerede filtermembran. Udskifting af filterskiver i 'cartridges' og overførsel til 'falcon'-rør er også mere tidskrævende, end at afkoble et Sterivex filter. Et Sterivex filter kan hurtigt lukkes med propper i begge ender, og forsynes med en mærkat med et unikt nummer, der angiver hvor prøven stammer fra. Det tager tid at skille en 'cartridge' ad. Det tager også tid at skylle en 'cartridge' i klorin-opløsning og derefter skylle klorinen af med ethanol, og det kræver ekstra tid at vente på at overskydende ethanol fordamper fra den skyllede 'cartridge'. Med mange 'cartridges' koblet på samme 'manifold', kan det også tage længere tid at filtrere vand, i forhold til hvor hurtig gennemløbshastigheden er for filtrering med Sterivex-filter. I forsøgsopstillingen i Øresundsakvariet stod alle de enkelte dele roligt på et bord, men filterning ombord på et skib i søgang, kan gøre adskillelse og samling af 'cartridges' mere vanskelig, i forhold til hvordan et Sterivex-filter er at håndtere på et bord, der står på land.

I forsøgsopstillingen i Øresundsakvariet var vandet af akvariets indpumpningssystem rensat for større partikler forinden. Dette sker, når vandet til udstillingsakvarierne pumpes ind fra havnen. Fordi vandet i udstillingsakvarierne var fri for større partikler, var det også relativt let at filtrere vandmængder på op til 5 L. Vandmængder på op til 5 L kunne uden problem filtreres igennem både Sterivex-filtrer og igennem de forskellige filterskiver (Figur 4). Ved feltarbejde har det ofte vist sig at Sterivex-filtrer let blokeres af partikler, der er opslemmet i vandet, hvilket ofte har resulteret i at vandmængder på under 1 L, eller mindre, er alt der kan presses igennem et Sterivex-filter. Hvis hele forsøgsopsætningen i nærværende rapport blev gennemført på havvand, er det tvivlsomt om det ville være muligt at presse op imod 5 L vand igennem hvert Sterivex-filter. Det er heller ikke usandsynligt, at filterskiverne hurtigt bliver blokeret, hvis vandet er fuldt af partikler. En tilsvarende forsøgsopsætning på havvand ville sikkert også have indvirkning på gennemløbshastigheden for filterskiverne, og forøge tiden, der er påkrævet for at få en stor vandmængde igennem filteret. En lav gennemløbshastighed kan måske afhjælpes med en kraftigere peristaltisk pumpe, der kan levere et større tryk på både 'manifold' og 'cartridges', hvilket dog vil kræve at både slanger, filterenheder, 'manifold' og 'cartridges' skal kunne modstå et kraftigere tryk.

De 'cartridges', der holder filterskiverne, skal samles og adskilles ved at bruge en skruemaskine. Udover at det tager tid at samle og adskille de enkelte 'cartridges' med skruemaskine, for at kunne udtage og isætte nye filterskiver efter rensning og skylning af hver 'cartridge', så viste det sig også at de samlende gevind i hjørnerne af hver 'cartridge' let blev nedslidte. I løbet af de dage forsøget blev udført, måtte et par 'cartridges' udgå fra forsøgsopsætningen, fordi deres samlende gevind i hjørnerne var blevet slidt ned. Ekstra 'cartridges' kunne hjælpe med til, at det stadig var muligt at gennemføre de nødvendige filtreringer. Eller det er nødvendigt med løbende reparation af 'cartridges'. Vælger man derfor at benytte 'cartridges' med filterskiver under feltarbejde, må det være ensbetydende med, at der medbringes og klargøres flere ekstra 'cartridges'. Flere klargjorte 'cartridges' vil betyde, at der kræves mere arbejdstid for at gøre alle filterenheder parat. Det vil givetvis nok kræve mere arbejdstid, end hvad der kan forventes med at klargøre Sterivex-filterenheder, og indfryse Sterivex-filterenheder.

Fordi filtrer med større porestørrelse end 0,45 µm ikke kan fås som indkapslede filterenheder, ligesom Sterivex-filteret, er det nødvendigt at benytte en eller anden form for filterholder, når der skal filtreres vand med porestørrelse over 0,45 µm. I nærværende studie, blev der udelukkende benyttet 'cartridges', som filterholder. Valget faldt på 'cartridges' fordi det var relativt let at koble mange 'cartridges' til flere pumper med hver deres 'manifold', og fordi alt udstyr med 'cartridges' og pumper var muligt at leje ved DMR. Det var ikke muligt at finde en udlejer af kolber og tragte. Alternativt, kunne opsætningen have benyttet tragte med filterholdere, som kan monteres på koniske kolber med udsug. En sådan opsætning ville have gjort det muligt at filtrere med undertryk i stedet for med overtryk. I den opsætning her med 'cartridges' og 'manifold'er (Figur 1-2), blev filtreringen udført af det overtryk den peristaltiske pumpe presser vandet igennem filteret med. At bruge kolber og tragte ville afhjælpe nogle af de besværligheder, der er med at adskille, rense, skylle og samle 'cartridges'. Fordelen ved en peristaltisk pumpe er, at der kan opnås en større gennemløbshastighed med vand, der presses igennem et filter med overtryk, end der kan med vand, der skal hives igennem et filter med undertryk. Med en kolbe med monteret filtertragt vil det være et undertryk, der skal trække vandet igennem filteret. Med et undertryk er det vanskeligt at forøge gennemløbshastigheden yderligere, i forhold til hvad der kan opnås af gennemløbshastighed med et overtryk. Et undertryk vil kun kunne veksle mellem 0 og 1 atm tryk, mens et overtryk kan være alt over 1 atm, så længe filterenheden og slanger kan holde til overtrykket. Derudover er der også arbejdstid forbundet med at skulle adskille, rense, skylle og samle tragte og kolber, der skal holde filterskiverne. Kolber og tragte kunne måske være mere fordelagtige i forhold til, at der ikke er gevind og skruer, som kan nedslides, men der er til gengæld arbejdstid forbundet med at skulle håndtere kolber, tragte og filterskiver. En af fordelene ved at bruge Sterivex-filtrer, hvor filtermembranen er indkapslet, er at det er nogenlunde hurtigt at samle et Sterivex-filtrer med en pumpe og slange, og det er nogenlunde hurtigt at afkoble igen. Den anden fordel ved Sterivex-filtrer modellen er, at det er meget vanskeligt at komme til at forurene filtermembranen med fremmed uvedkommende DNA, mens filteret håndteres.

For kvantifikation af miljø-DNA-niveauer blev der i dette studie anvendt ddPCR, fremfor qPCR og fremfor 'eDNA metabarcoding'. Valget faldt på ddPCR med artsspecifik detektion af miljø DNA-niveauer, da det sikrer tusindvis af tekniske replikater, hvilket er flere replikater, end der kan udføres med qPCR. De specifikke detektionssystemer, der her benyttes, giver et mere præcist billede af miljø-DNA fra de udvalgte arter, i forhold til hvad generelle primere, som der bruges ved 'eDNA metabarcoding', kan indfange. Udfordringen med de generelle primere er, at de ikke nødvendigvis vil indfange miljø-DNA fra alle arter med lige stor effektivitet (Guri et al., 2024; Kelly et al., 2019).

I nærværende studie blev der inkluderet en absolut fortyndingsserie af en positiv kontrol, hvilket sjældent benyttes i artsspecifik detektion af miljø-DNA. I alle MONIS overvågningsprogrammer har en absolut fortyndingsserie af en positiv kontrol dog altid været inkluderet (Knudsen et al., 2022; 2025). Mange studier springer over, hvor gærdet er lavest, og benytter i stedet en fortynding af en genomisk ekstraktion fra en vævsprøve. En sådan fortynding af genomisk ekstraktion tager imidlertid ikke højde for, at antallet af molekyler kan variere fra ekstraktion til ekstraktion og fra vævsprøve til vævsprøve, som netop er det den positive kontrol baseres på. Med en absolut fortyndingsserie af en positiv kontrol, sikres der herved

samme høje og ensartede niveau for sammenlignelighed, som den der er blevet benyttet i MONIS-projekterne.

Det var ikke muligt at indhente filterskiver med porestørrelser imellem 0,8 µm og 3,0 µm, eller over 3,0 µm. Det kan ikke udelukkes, at der i intervallet imellem 0,8 µm og 3,0 µm, eller for porestørrelser over 3,0 µm, er bedre eller tilsvarende god mulighed for at tilbageholde det relevante miljø-DNA. Det vil være nødvendigt med et større sammenlignende studie, for andre filterskiver med porestørrelser i disse dimensioner, for at belyse dette nærmere. I tidligere studier af forskellige filtermembraners evne til at tilbageholde miljø-DNA, har filtermembraner af glasfiber også vist sig at være relativt gode til at tilbageholde miljø-DNA (f.eks. Spens et al., 2017; Majaneva et al., 2018). Glasfiber-filter er dog blevet vurderet som værende suboptimal i forhold til Sterivex-filterenheder (Spens et al., 2017). Hovesagligt fordi glasfiber-filtrer kun leveres som filterskiver og ikke er lige så praktiske for håndtering som Sterivex-filterenheder, når der skal laves feltarbejde. Derudover kan glasfiber-filtrer temmelig let rives itu af for stort et vandtryk (f.eks. Spens et al., 2017), hvilket gør det nødvendigt, at glasfiber-filtreret monteres i en filterholder med et tykt støttefilter, så det ikke ødelægges af et højt vandtryk. Et tykt støttefilter kan gøre vandgennemstrømningen endnu mere langsom, hvilket så kan være med til at forlænge den tid, der er nødvendig for at få filtreret et tilstrækkeligt stort volumen vand.

Fremtidige studier i at sammenligne filterenheder og porestørrelser bør inkludere porestørrelser over 3,0 µm samt glasfiber-filtrer, og bør desuden gennemføres på havvand indsamlet direkte under feltarbejde. Indsamling af havvand, kan være med - som hos Øresundsakvariet - eller uden forfiltrering, så længe prøver fra de enkelte trin bliver gemt og ekstraheret senere. Det miljø-DNA, der så kan findes på de enkelte filtreringstrin, kan så senere sammenholdes med de forskellige forfiltreringstrin. Det må forventes, at der hurtigt over kort tid kan ende med at være stor variation i miljø-DNA-sammensætning på en enkelt lokalitet, da miljø-DNA diversitetsprofiler kan ændre sig indenfor få timer (Jensen et al., 2022), da organismene flytter sig, og da selv mindre havstrømme hurtigt flytter rundt på miljø-DNA. Filtrering på havvand under feltarbejde med henblik på efterfølgende sammenligning af forskellige filtertyper og forskellige porestørrelser, vil derfor indebære at alle filtreringer bør gennemføres og afsluttes så hurtigt som muligt, for at sikre at filterprøverne bliver så ensartede som muligt. Bliver indsamlingen af de mange filtertyper derimod spredt ud over for langt et tidsrum, vil der være sket en ændring i de organismer, som er i nærheden af vandindsamlingen, hvorfor man da ikke længere analyserer på 'det samme vand'. Forandringer i niveauet af miljø-DNA vil så risikere at blive en afspejling af, at der er sket et skifte i artssammensætningen, på den lokalitet, der filtreres vand fra, i stedet for at være en afspejling af de forskellige filtertypers evne til at tilbageholde miljø-DNA. Ændringerne i miljø-DNA diversitetsprofiler kan ske indenfor få timer, og det må derfor tilstræbes at alle filtertyper og replikater filtreres indenfor mindre en time eller to. Dette er især vigtigt i lyset af, at der kan være variation i miljø-DNA profiler på samme lokalitet indenfor få timers interval (Jensen et al., 2020). Det vil også, som i nærværende studie, være nødvendigt med mange biologiske filterreplikater, for at dække den variation, der kan være imellem vandprøver fra samme lokalitet. Med mange biologiske filterreplikater, der skal indsamles så hurtigt som muligt, vil det være nødvendigt med mange personer, der er involveret i filtreringsarbejdet. Selvom filtrering med både Sterivex-filterenheder og med filterskiver er nogenlunde let at tilgå, vil det være nødvendigt, at alle involverede personer gennemgår en grundig indføring i hvorledes, filtreringen skal udføres. Hvis ikke filtreringen gennemføres på en ensartet facon, er der risiko for, at der vil være alt for stor variation imellem de biologiske filterreplikater, på grund af at de personer, der har foretaget filtreringen har gennemført filtreringen forskelligt. Med mange filterskiver, der skal filtreres samtidigt under feltarbejde, vil det også kræve meget udstyr. Det vil gøre det nødvendigt, at der er adskillige pumper og 'manifold'er og 'cartdriges', der parallelt kan gennemføre filtrering på mange forskellige filtertyper, med forskellige porestørrelser og med mange replikater.

Alle filterprøver blev i nærværende studie ekstraheret med den samme ekstraktionsprotokol. Der findes imidlertid også andre ekstraktionsprotokoller og andre reagenser til ekstraktion. Et udvalg af forskellige ekstraktionsprotokoller til ekstraktion af miljø-DNA fra vandprøver er blevet sammenholdt i andre studier (Deiner et al., 2015; Djuurhus et al., 2017). Djuurhus et al. (2017) fandt, at et 'MoBio PowerWater DNA-isolation kit' var bedre end det her benyttede 'Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit', i hvert fald hvad angik de diversitetsprofiler, som Djuurhus et al. (2017) kunne indhente fra vandprøverne med 'eDNA metabarcoding'. Om det samme ekstraktionskit er lige så fordelagtig ved artsspecifik detektion af miljø-DNA – som der udføres i MONIS-projekterne – er usikkert. Siden Djuurhus et al. (2017) gennemførte deres studie på forskellige ekstraktionsprotokoller, er 'MoBio PowerWater DNA-isolation' kittet vist nok blevet opkøbt af 'Qiagen', og vist nok blevet omdøbt til 'DNeasy PowerWater kit'. Om dette nynavngivne ekstraktions-kit stadig svarer til hvad Djuurhus et al. (2017) afprøvede, er usikkert, og bør som minimum afprøves på ny. Det var ikke muligt i nærværende studie også at afprøve flere forskellige ekstraktionsprotokoller. Det ville have krævet et væsentligt større forsøg. Der kan desuden være variation i, hvordan forskellige ekstraktionsprotokoller er i stand til at udvinde miljø-DNA fra filterenheder. For at belyse hvorvidt ekstraktionsprotokollen kan optimeres, vil det være nødvendigt at sætte et studie op specifikt til dette formål, hvor der ikke benyttes forskellige filtertyper, men hvor der udelukkende varieres på hvilken protokol, der anvendes til ekstraktionen.

Niveauerne af miljø-DNA var kun forskellige fra de negative kontroller for torsk (Figur 8), de andre fem arters miljø-DNA kunne ikke skelnes fra baggrundsniveauet af miljø-DNA i akvariet. At der er et baggrundsniveau af miljø-DNA, er ikke overraskende, da forsøget blev udført i et lokale med mange udstillingsakvarier, hvor det må forventes, at der er mange vanddråber i luften, der kan bære miljø-DNA rundt. Vandet, der blev filtreret, blev indsamlet fra netop det akvarium, hvor torskene befandt sig, hvilket kan forklare, hvorfor det var let at detektere miljø-DNA fra netop torsk. Godt nok er alle akvarier i udstillingen forbundet med samme vandsystem, men de lave niveauer af miljø-DNA fra de andre fem arter, som her blev forsøgt detekteret, kan betyde, at vandfordelingen i Øresundsakvariet ikke er så homogent opblandet med de andre akvarier. Fire af de arter, der blev forsøgt detekteret er bundlevende arter. Sandmusling, sortmundet kutling, rødspætte og skrubbe, lever alle tæt ved bunden, og er ikke aktive i akvariet som torsk og sild, der konstant svømmer rundt. Det kan skyldes flere ting, at det ikke var muligt at skelne niveauerne af de bundlevende arters miljø-DNA fra baggrundsniveauet af miljø-DNA. For det første kan det skyldes der blev samlet vand ind i et akvarie, der var adskilt fra de andre arter, hvor vandforsyningssystemet ikke kunne nå at udskifte vandet før det transporterede miljø-DNA blev nedbrudt eller rensat væk. For det andet kan det skyldes, at de bundlevende arters biologi og adfærd ikke er fordelagtig for et studie, der skal bruge godt opblandet vand, for at kunne detektere miljø-DNA. For sildens vedkomne var det vanskeligt at skelne niveauerne af miljø-DNA fra baggrundsniveauet af miljø-DNA. Årsagen til dette kan sandsynligvis tilskrives, at vandsystemet i akvariet er meget effektivt til at fjerne partikler og afkastede celler, inden vandet fordeles videre rundt til akvariet med torsk, hvor vandet blev indsamlet fra. Et fremtidigt studie med samme mål som nærværende, bør derfor nok tilstræbe at filtrere vand fra et akvarium, hvor alle de arter, der ønskes detekteret befinder sig samtidigt. Vandet kan også indhentes samtidigt fra mange parallelle akvarier, og så opblandes i en opsamlende beholder, inden vandet derefter filtreres. Hvis nogle af de arter, der skal detekteres er bundlevende, bør det også sikres, at der er konstant grundig omrøring i akvariet, så miljø-DNA fra bundlevende arter er godt opblandet i vandet. For at forøge chancen for at kunne detektere både pelgaiske og bundlevende arter i det samme akvarie, skal det ske med vandindtag fra både toppen og bunden af akvariet, og derefter må det indhentede vand så blandes godt op inden det filtreres.

Nærværende studie er gennemført med den begrænsning, at der ikke var budget til at efterprøve porestørrelser og filterenheder på rent faktiske vandprøver af havvand indsamlet under feltarbejde. Selvom resultaterne muligvis kan indikere, at der kan være fordel ved at bruge andre porestørrelser, kan partikler i vandet og vandets renhed være anderledes i en reel vandprøve indsamlet under feltarbejde. Vandprøver indsamlet under feltarbejde vil kunne afvige fra hvad, der kan udledes af vandprøver indsamlet

i et akvarium (Li et al., 2018). Resultaterne fra den nærværende rapport, kan derfor ikke betragtes som endegyldige for at afgøre, om der kan være fordele ved at skifte til andre filterenheder og andre porestørrelser. Der er mange faktorer, som kan være med til at gøre vandprøver fra et marint udstillingsakvarium forskellige fra marine vandprøver indsamlet i felten. Der er derudover også en del faktorer, der bør tages højde for – blandt andet effektiviteten i akvariets vandsystem – som det først blev klart efter analyserne var gennemført, og at der nok må forventes ekstra arbejdstid påkrævet med andre filtertyper. Resultaterne her kan altså højst betragtes som angivende for hvilke andre filtertyper, der bør afprøves på vandprøver indsamlet under reelt feltarbejde. Til gengæld kan resultaterne i denne rapport danne grundlag for et større forsøg, der forsøger at komme nærmere spørgsmålet, om der kunne være fordele ved at benytte andre filtertyper og andre porestørrelser, end hvad der hidtil har været benyttet i NOVANA programmet i forbindelse med overvågning af miljø-DNA fra ikke-hjemmehørende arter.

5 Referencer

Agersnap, S., E.E. Sigsgaard, M.R. Jensen, M.De.P. Avila, H. Carl, P.R. Møller, S.L. Krøs, S.W. Knudsen, M.S. Wisz & P.F. Thomsen (2022): A national scale “BioBlitz” using citizen science and eDNA metabarcoding for monitoring coastal marine fish. *Frontiers in Marine Science* 9: <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.824100>

Agersnap, S., W.B. Larsen, S.W. Knudsen, D. Strand, P.F. Thomsen, M. Hesselsøe, P.B. Mortensen, T. Vrålstad & P.R. Møller (2017): Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS One* 12: e0179261.

Andersen, J.H., E. Kallenbach, J. Thaulow, M. Hesselsøe, D. Bekkevold, B.K. Hansen, L.M.W. Jacobsen, C.Aa. Olesen, P.R. Møller & S.W. Knudsen (2018): Development of species-specific eDNA-based test systems, for monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters, NIVA report 7204-2017. <https://niva.bragе.unit.no/niva-xmlui/handle/11250/2573117>

Andersen, J.H., E. Kallenbach, M.B. Kjeldgaard, S.W. Knudsen, W. Eikrem, C. Fagerli, E. Oug, T. Dahle, J. Thaulow, J. Gitmark, A. Hobæk, N. Green, M. Hesselsøe, J. Støttrup, J. Kuhn, D. Bekkevold, L.M.W. Jacobsen, P.R. Møller, C.Aa. Olesen, H. Carl & F. Stuer-Lauridsen (2022): A baseline study of the occurrence of non-indigenous species in Danish harbours. NIVA report 7769-2022. <https://niva.bragе.unit.no/niva-xmlui/handle/11250/3024342>

Andersen, JH, Kallenbach, E, Hesselsøe, M, Knudsen, SW, Møller, PR, Bekkevold, D, Hansen, BK, Thaulow, J, 2016. Steps toward nation-wide monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters under the Marine Strategy Framework Directive. Norsk institutt for vannforskning.

Andersen, J.H., Knudsen, S.W., Murray, C.J., Carl, H., Møller, P.R., Hesselsøe, M. (2021). Ikke-hjemmehørende arter i marine områder. NIVA-rapport;7658. <https://niva.bragе.unit.no/niva-xmlui/handle/11250/2789601>

Andruszkiewicz, E.A., Sassoubre, L.M., Boehm, A.B., 2017. Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight. *PLoS One* 12, e0185043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185043>.

Barnes MA, Chadderton WL, Jerde CL, Mahon AR, Turner CR, Lodge DM. Environmental conditions influence eDNA particle size distribution in aquatic systems. *Environmental DNA*. 2021; 3: 643–653. <https://doi.org/10.1002/edn3.160>

Brandão-Dias, P. F. P., Hallack, D. M. C., Snyder, E. D., Tank, J. L., Bolster, D., Volponi, S., Shogren, A. J., Lamberti, G. A., Bibby, K., & Egan, S. P. (2023). Particle size influences decay rates of environmental DNA in aquatic systems. *Molecular Ecology Resources*, 23, 756–770. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13751>

Collins, R. A., Wangensteen, O. S., O’Gorman, E. J., Mariani, S., Sims, D. W., & Genner, M. J. (2018). Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications biology*, 1, 185. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0192-6>

Cooper, M. K., Villacorta-Rath, C., Burrows, D., Jerry, D. R., Carr, L., Barnett, A., Huveneers, C., & Simpfendorfer, C. A. (2022). Practical eDNA sampling methods inferred from particle size distribution and comparison of capture techniques for a Critically Endangered elasmobranch. *Environmental DNA*, 4, 1011–1023. <https://doi.org/10.1002/edn3.279>

- DiBattista, J. D., Reimer, J. D., Stat, M., Masucci, G. D., Biondi, P., De Brauer, M., & Bunce, M. (2019). Digging for DNA at depth: rapid universal metabarcoding surveys (RUMS) as a tool to detect coral reef biodiversity across a depth gradient. *PeerJ*, 7, e6379. <https://doi.org/10.7717/peerj.6379>
- Deiner, K., Renshaw, M.A., Li, Y., Olds, B.P., Lodge, D.M., Pfrender, M.E. (2017). Long-range PCR allows sequencing of mitochondrial genomes from environmental DNA. *Methods Ecol. Evol.*, 8, 1888–1898. DOI: 10.1111/2041-210X.12836
- Demkina, A., Slonova, D., Mamontov, V., Konovalova, O., Yurikova, D., Rogozhin, V., Belova, V., Korostin, D., Sutormin, D., Severinov, K., & Isaev, A. (2023). Benchmarking DNA isolation methods for marine metagenomics. *Scientific reports*, 13(1), 22138. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48804-z>
- Djurhuus, A., Port, J., Closek, C.J. Yamahara, K.M., Romero-Maraccini, O., Walz, K.R., Goldsmith, D.B., Michisaki, R., Breitbart, M., Boehm, A.B., Chavez, F.P. (2017). Evaluation of Filtration and DNA Extraction Methods for Environmental DNA Biodiversity Assessments across Multiple Trophic Levels. *Front. Mar. Sci.*, 13, Vol. 4, <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00314>
- Eichmiller, J. J., Miller, L. M., & Sorensen, P. W. (2016). Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular ecology resources*, 16(1), 56–68. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12421>
- Ficetola, G. F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguët-Covex, C., De Barba, M., Gielly, L., Lopes, C. M., Boyer, F., Pompanon, F., Rayé, G., Taberlet, P. (2015). Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Mol Ecol Resour* 15, 543–556. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12338>
- Gefridis, L. A., M. C. Powell, M. A. Donley, and R. Kahn. (2010). UV Irradiation and Autoclave Treatment for Elimination of Contaminating DNA From Laboratory Consumables. *Forensic Science International. Genetics* 4, no. 2: 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.06.008>.
- Goldberg, C. S., C. R. Turner, K. Deiner, et al. (2016). Critical Considerations for the Application of Environmental DNA Methods to Detect Aquatic Species. *Methods in Ecology and Evolution* 7, no. 11: 1299–1307. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>.
- Guri, G., Shelton, A.O, Kelly, R.P., Yoccoz, N., Johansen, T., Præbel, K., Hanebrekke, T., Ray, J.L., Fall, J., Westgaard, J.-I., (2024). Predicting trawl catches using environmental DNA, *ICES Journal of Marine Science*, Volume 81, Issue 8, Pages 1536–1548, <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsae097>
- Guri, G., Westgaard, J.-I., Yoccoz, N., Wangensteen, O. S., Præbel, K., Ray, J. L., Kelly, R. P., Shelton, A. O., Hanebrekke, T., & Johansen, T. (2024). Maximizing sampling efficiency to detect differences in fish community composition using environmental DNA metabarcoding in subarctic fjords. *Environmental DNA*, 6, e409. <https://doi.org/10.1002/edn3.409>
- Harper, L.R., Handley, L.L., Hahn, C., Boonham, N., Rees, H.C., Gough, K.C., Lewis, E., Adams, I.P., Brotherton, P., Phillips, S., Hänfling, B., 2018. Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Ecol. Evol.* 8, 6330–6341.
- Thomsen, P. F., and E. Willerslev. 2015. “Environmental DNA—An Emerging Tool in Conservation for Monitoring Past and Present Biodiversity.” *Biological Conservation* 183: 4–18. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2014.11.019>.

Hinlo R, Gleeson D, Lintermans M, Furlan E (2017). Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS ONE* 12(6): e0179251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179251>

Hoffmann, A., V. Fingerle, and M. Noll. (2020). "Analysis of Tick Surface Decontamination Methods." *Microorganisms* 8, no. 7: 987. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070987>.

Jo, T., & Yamanaka, H. (2022). Fine-tuning the performance of abundance estimation based on environmental DNA (eDNA) focusing on eDNA particle size and marker length. *Ecology and Evolution*, 12, e9234. <https://doi.org/10.1002/ece3.9234>

Jo, T., Murakami, H., Masuda, R., & Minamoto, T. (2020). Selective collection of long fragments of environmental DNA using larger pore size filter. *The Science of the total environment*, 735, 139462. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139462>

Kawakami, T., Yamazaki, A., Asami, M., Goto, Y., Yamanaka, H., Hyodo, S., Ueno, H., & Kasai, A. (2023). Evaluating the sampling effort for the metabarcoding-based detection of fish environmental DNA in the open ocean. *Ecology and evolution*, 13(3), e9921. <https://doi.org/10.1002/ece3.9921>

Kelly, R. P., Shelton, A. O., & Gallego, R. (2019). Understanding PCR Processes to Draw Meaningful Conclusions from Environmental DNA Studies. *Scientific reports*, 9(1), 12133. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48546-x>

Knudsen SW, Hesselsøe, M, Thaulow, J, Agersnap, S, Hansen, BK, Jacobsen, MW, Bekkevold, D, Jensen, SKS, Møller, PR, Andersen, JH, 2022. Monitoring of environmental DNA from introduced species of al-gae, dinoflagellates and animals in the North-Eastern Atlantic. *Science of The Total Environment* 821, 153093. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153093>

Knudsen, S.W., Carl, H., Møller, P.R., & Andersen, J. (2025). Status for overvågning af miljø-DNA i marine områder under NOVANA-programmet for 2017 til 2023. NIVA-rapport; 8103-2025, <https://niva.brage.unit.no/niva-xmlui/handle/11250/3199092>

Knudsen, S.W., J.H. Andersen, M. Bekkevold, D., Hesselsøe, M., Jensen, S.K.S, & Møller, P.R. (2024): Tekniske anvisninger for eDNA-baseret overvågning af ikke-hjemmehørende marine arter. NIVA Dan-mark rapport. 36 pp. <https://hdl.handle.net/11250/3153715>

Knudsen, S.W., P.R. Møller & Andersen, J.H. (2020): Development of species-specific eDNA-based test systems for monitoring of non-indigenous marine Decapoda in Danish marine waters. NIVA Den-mark report, 45 pp

Knudsen, S.W. (2023). Detektion af miljø-DNA med 'quantitative Polymerase Chain Reaction' (qPCR) sammenlignet med 'droplet digital Polymerase Chain Reaction' (ddPCR). NIVA-rapport;7872-2023. <https://niva.brage.unit.no/niva-xmlui/handle/11250/3091000>

Knudsen, SW, Andersen, JH, Møller, PR, 2020. Development of species-specific eDNA-based test systems for monitoring of non-indigenous Decapoda in Danish marine waters. NIVA-rapport; 7544. <https://niva.brage.unit.no/niva-xmlui/handle/11250/2689446>

Knudsen, SW, Ebert, RB, Mortensen, PB, Kuntke, F, Hesselsøe, M, Hassingboe, J, Thomsen, PF, Sigsgaard, EE, Egg, E, Møller, PR, 2019. Species-specific detection of six commercially important marine fishes in the Baltic Sea using environmental DNA. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 510, 31-45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.09.004>

Li J, Lawson Handley L-J, Read DS, Hänfling B. The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding. *Mol Ecol Resour.* 2018; 18: 1102–1114. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12899>

Li, J., Lawson Handley, L. J., Read, D. S., & Hänfling, B. (2018). The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding. *Molecular ecology resources*, <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12899>

Liu, Q., Tan, J., Wang, M., Xin, N., Qi, R., & Wang, H. (2024). Optimization of pore size and filter material for better enrichment of environmental DNA. *Frontiers in Environmental Science*, 12, <https://doi.org/10.3389/fenvs.2024.1422269>

Maes, S. M., Desmet, S., Brys, R., Sys, K., Ruttink, T., Maes, S., Hostens, K., Vansteenbrugge, L., & Derycke, S. (2024). Detection and quantification of two commercial flatfishes (*Solea solea* and *Pleuronectes platessa*) in the North Sea using environmental DNA. *Environmental DNA*, 6, e426. <https://doi.org/10.1002/edn3.426>

Majaneva, M., Diserud, O. H., Eagle, S. H. C., Boström, E., Hajibabaei, M., & Ekrem, T. (2018). Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Scientific reports*, 8(1), 4682. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23052-8>

Majaneva, M., Diserud, O.H., Eagle, S.H.C. et al. Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Sci Rep* 8, 4682 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23052-8>

Muenzel, D., Bani, A., De Brauer, M., Stewart, E., Djakiman, C., Halwi, Purnama, R., Yusuf, S., Santoso, P., Hukom, F. D., Struebig, M., Jompa, J., Limmon, G., Dumbrell, A., & Beger, M. (2024). Combining environmental DNA and visual surveys can inform conservation planning for coral reefs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(17), e2307214121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2307214121>

Mächler, E., Osathanunkul, M., & Altermatt, F. (2018). Shedding light on eDNA: neither natural levels of UV radiation nor the presence of a filter feeder affect eDNA-based detection of aquatic organisms. *PloS one*, 13(4), e0195529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195529>

Patin, N. V., & Goodwin, K. D. (2023). Capturing marine microbiomes and environmental DNA: A field sampling guide. *Frontiers in microbiology*, 13, 1026596. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1026596>

Power, H., Takahashi, M., Jarman, S., & Berry, O. (2023). What is environmental DNA? *Environmental DNA*, 5, 1743–1758. <https://doi.org/10.1002/edn3.497>

Rasmussen, JJ, Wyrwik, C, Sørensen, M, Deacon, M, Sørensen, F, Pedersen, J, Knudsen, SW, 2023. Kortlægning af flodperlemusling i Varde Å-systemet ved brug af eDNA – en eftersøgning af nålen i høstakken. NIVA-rapport;7818-2023. <https://niva.brage.unit.no/niva-xmlui/handle/11250/3050784>

Shu, L., Ludwig, A., & Peng, Z. (2020). Standards for Methods Utilizing Environmental DNA for Detection of Fish Species. *Genes*, 11(3), 296. <https://doi.org/10.3390/genes11030296>

Sigsgaard, EE, Nielsen, IB, Bach, SS, Lorenzen, ED, Robinson, DP, Knudsen, SW, Pedersen, MW, Jaidah, MA, Orlando, L, Willerslev, E, Møller, PR, Thomsen, PF, 2016. Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology & Evolution* 1, 0004. <http://dx.doi.org/10.1038/s41559-016-0004>

- Sigsgaard, EE, Nielsen, IB, Carl, H, Krag, MA, Knudsen, SW, Xing, Y, Holm-Hansen, TH, Møller, PR, Thomsen, PF, 2017. Seawater environmental DNA reflects seasonality of a coastal fish community. *Marine Biology* 164, 128. doi: 10.1007/s00227-017-3147-4
- de Silva Wijeyeratne, A. and Gweon, H.S. (2025), Evaluating the effectiveness of sodium hypochlorite for genomic DNA decontamination. *Environmental DNA*, 7: e70057. <https://doi.org/10.1002/edn3.70057>
- Snyder, E. D., Tank, J. L., Brandão-Dias, P. F. P., Bibby, K., Shogren, A. J., Bivins, A. W., Peters, B., Curtis, E. M., Bolster, D., Egan, S. P., & Lamberti, G. A. (2023). Environmental DNA (eDNA) removal rates in streams differ by particle size under varying substrate and light conditions. *The Science of the total environment*, 903, 166469. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166469>
- Spens, J, Evans, AR, Halfmaerten, D, Knudsen, SW, Sengupta, ME, Mak, SST, Sigsgaard, EE, Hellström, M, 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution* 8, 635–645. doi: 10.1111/2041-210X.12683
- Stauffer, S., Jucker, M., Keggin, T., Marques, V., Andrello, M., Bessudo, S., Cheutin, M. C., Borrero-Pérez, G. H., Richards, E., Dejean, T., Hocdé, R., Juhel, J. B., Ladino, F., Letessier, T. B., Loiseau, N., Maire, E., Mouillot, D., Mutis Martinezguerra, M., Manel, S., Polanco Fernández, A., ... Waldock, C. (2021). How many replicates to accurately estimate fish biodiversity using environmental DNA on coral reefs?. *Ecology and evolution*, 11(21), 14630–14643. <https://doi.org/10.1002/ece3.8150>
- Takasaki, K., Aihara, H., Imanaka, T., Matsudaira, T., Tsukahara, K., Usui, A., Osaki, S., & Doi, H. (2021). Water pre-filtration methods to improve environmental DNA detection by real-time PCR and metabar-coding. *PloS one*, 16(5), e0250162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250162>
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E., 2012a. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21, 2565–2573. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>
- Thomsen, PF, Møller, PR, Sigsgaard, EE, Knudsen, SW, Jørgensen, OA, Willerslev, E, 2016. Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PLoS ONE* 11, e0165252. doi:10.1371/journal.pone.0165252
- Tsuji, S., Takahara, T., Doi, H., Shibata, N., Yamanaka, H., 2019. The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis – A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1, 99–108.
- Turner, C.R., Barnes, M.A., Xu, C.C.Y., Jones, S.E., Jerde, C.L. and Lodge, D.M. (2014), Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods Ecol Evol*, 5: 676-684. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12206>
- Zaiko, A., von Ammon, U., Stuart, J., Smith, K. F., Yao, R., Welsh, M., Pochon, X., Bowers, H. A. (2022). Assessing the performance and efficiency of environmental DNA/RNA capture methodologies under controlled experimental conditions. *Methods in Ecology and Evolution*, 13, 1581–1594. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13879>

6 Bilag A: Tabel med alle filterprøver og vandvolumen og filtreringstidspunkt

Tabel Bilag A. Oversigt over de enkelte filterenheder, der blev benyttet i nærværende studie.

'Filt.mbr.pore' angiver filtertypen med forkortelse som i tabel 2. 'Unk Filt nr' er et unikt prøvenummer tildelt hver enkelt filterenhed for at kunne skelne mellem alle prøver. 'Filtreret volumen (mL)' angiver hvor stort et volumen vand der blev filtreret igennem filteret i mL. 'Dato For Filtrering' angiver datoen hvor filtreringen blev udført. 'Tidspunkt Start Filt' angiver klokkeslæt for hvornår filtreringen blev begyndt. 'Tidspunkt Slut Filt' angiver klokkeslæt for hvornår filtreringen blev stoppet. 'Tidspunkt Filt indfrosset' angiver klokkeslæt for hvornår filteret blev lagt i -15 C fryser. 'Ekstraktionsdato' angiver datoen for hvornår ekstraktionen fra filteret blev udført, hvilket betyder at filteret har ligget i fryser fra indsamlingsdato til ekstraktionsdato. 'konc (ng per uL)' angiver den koncentration (ng/μL) af miljø-DNA, der blev målt umiddelbart efter ekstraktionen fra filteret var afsluttet, og som er et mål for alt DNA der er i prøven, både fra eukaryote og prokaryote organismer. De prøver, der har nummer 'NEK01' til 'NEK08' repræsenterer negative ekstraktionskontroller, og er udført på kun de reagenser, der bruges for at lave en ekstraktion fra en filterprøve.

Filt.mbr.pore	Unk Filt nr	Filtreret Volumen (mL)	Dato For filtrering	Tidspunkt Start Filt	Tidspunkt Slut Filt	Tidspunkt Filt indfrosset	Ekstraktionsdato	Konc (ng per uL)
STX 0.22	1	5000	2024-jul-16	1101	1417	1437	2024-aug-28	13,8
STX 0.22	2	5000	2024-jul-16	1101	1419	1437	2024-aug-28	14,6
STX 0.22	3	5000	2024-jul-16	1101	1419	1437	2024-aug-28	14,2
STX 0.22	4	5000	2024-jul-16	1101	1419	1437	2024-aug-28	18,1
STX 0.22	5	5000	2024-jul-16	1101	1419	1437	2024-aug-28	16,2
STX 0.22	6	5000	2024-jul-16	1101	1419	1437	2024-aug-28	20
STX 0.22	7	5000	2024-jul-16	1101	1419	1437	2024-aug-28	19,8
STX 0.22	8	5000	2024-jul-16	1101	1421	1437	2024-aug-28	14,8
PLC 0.22	9	4100	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-14	14,2
PLC 0.22	10	4000	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-14	13,2
PLC 0.22	11	3900	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-14	14,3
PLC 0.22	12	3600	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-12	9,05
PLC 0.22	13	2900	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-12	9,95
PLC 0.22	14	3600	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-12	15
PLC 0.22	15	3200	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-12	13,6
PLC 0.22	16	3350	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-12	10,3
PLC 0.22	17	3000	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-11	7,3
PLC 0.22	18	4000	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-12	11,8
PLC 0.22	19	4000	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-12	12,1
PLC 0.22	20	3750	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-11	12
PLC 0.22	21	3500	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-11	10,6
PLC 0.22	22	3150	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-11	10,8
PLC 0.22	23	3150	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-11	11,4
PLC 0.22	24	3000	2024-jul-16	1140	1601	1705	2024-nov-12	12
PSE 0.22	25	4200	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	13,4
PSE 0.22	26	4500	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	16
PSE 0.22	27	3800	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	13,1
PSE 0.22	28	4600	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	14
PSE 0.22	29	3700	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	12,8
PSE 0.22	30	3400	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	14,2
PSE 0.22	31	750	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	1,6
PSE 0.22	32	2100	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	8,35

PSE 0.22	33	4050	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	13,4
PSE 0.22	34	3950	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	14,6
PSE 0.22	35	4100	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	16,8
PSE 0.22	36	4100	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	13,7
PSE 0.22	37	3500	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	11,1
PSE 0.22	38	3600	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	13,2
PSE 0.22	39	4100	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	15,6
PSE 0.22	40	3950	2024-jul-16	1226	1706	1806	2024-nov-14	15
STX 0.22	41	5000	2024-jul-16	1437	1752	1832	2024-sep-06	15,2
STX 0.22	42	4850	2024-jul-16	1437	1752	1832	2024-sep-06	13,7
STX 0.22	43	5000	2024-jul-16	1437	1752	1832	2024-sep-06	16
STX 0.22	44	4850	2024-jul-16	1437	1752	1832	2024-sep-06	14,4
STX 0.22	45	4800	2024-jul-16	1437	1752	1832	2024-sep-06	16,1
STX 0.22	46	4950	2024-jul-16	1437	1752	1832	2024-sep-06	16,5
STX 0.22	47	4750	2024-jul-16	1437	1752	1832	2024-sep-06	15,6
STX 0.22	48	4800	2024-jul-16	1437	1752	1832	2024-sep-06	15
PLC 0.80	49	4700	2024-jul-17	1048	1429	1445	2024-sep-04	12,8
PLC 0.80	50	3450	2024-jul-17	1048	1429	1445	2024-sep-04	11
PLC 0.80	51	4500	2024-jul-17	1048	1529	1540	2024-sep-04	13,8
PLC 0.80	52	4950	2024-jul-17	1048	1529	1540	2024-sep-04	14,4
PLC 0.80	53	5000	2024-jul-17	1048	1540	1548	2024-sep-04	13,6
PLC 0.80	54	3900	2024-jul-17	1048	1540	1548	2024-sep-04	13,8
PLC 0.80	55	5500	2024-jul-17	1048	1559	1614	2024-sep-04	12,6
PLC 0.80	56	4650	2024-jul-17	1048	1559	1614	2024-sep-04	13,4
PLC 0.80	57	4500	2024-jul-17	1048	1625	1637	2024-sep-04	14,6
PLC 0.80	58	5250	2024-jul-17	1048	1625	1637	2024-sep-04	15
PLC 0.80	59	5400	2024-jul-17	1048	1652	1701	2024-sep-04	17,4
PLC 0.80	60	5350	2024-jul-17	1048	1652	1701	2024-sep-04	13
PLC 0.80	61	5800	2024-jul-17	1048	1701	1750	2024-sep-04	17,4
PLC 0.80	62	5400	2024-jul-17	1048	1701	1750	2024-sep-04	16,2
PLC 0.80	63	5000	2024-jul-17	1048	1701	1750	2024-sep-04	15,2
PLC 0.80	64	5150	2024-jul-17	1048	1701	1750	2024-sep-04	15,6
PLC 1.20	65	3400	2024-jul-17	1215	1408	1415	2024-okt-23	5,95
PLC 1.20	66	4000	2024-jul-17	1215	1408	1415	2024-nov-11	3,86
PLC 1.20	67	4000	2024-jul-17	1215	1447	1454	2024-okt-29	11,6
PLC 1.20	68	2200	2024-jul-17	1215	1447	1454	2024-okt-29	5,9
PLC 1.20	69	5000	2024-jul-17	1215	1504	1512	2024-okt-29	12,8
PLC 1.20	70	3400	2024-jul-17	1215	1504	1512	2024-okt-29	8,65
PLC 1.20	71	5100	2024-jul-17	1215	1510	1521	2024-okt-29	3,2
PLC 1.20	72	1550	2024-jul-17	1215	1510	1521	2024-okt-29	13,6
PLC 1.20	73	3600	2024-jul-17	1215	1552	1600	2024-okt-29	10,2
PLC 1.20	74	4600	2024-jul-17	1215	1552	1600	2024-okt-29	13,2
PLC 1.20	75	1400	2024-jul-17	1215	1616	1626	2024-okt-29	15,1
PLC 1.20	76	6800	2024-jul-17	1215	1616	1626	2024-okt-29	2,9
PLC 1.20	77	5650	2024-jul-17	1215	1702	1750	2024-okt-29	9,65
PLC 1.20	78	3950	2024-jul-17	1215	1702	1750	2024-okt-29	8,85
PLC 1.20	79	4350	2024-jul-17	1215	1713	1750	2024-okt-29	9,35
PLC 1.20	80	5450	2024-jul-17	1215	1713	1750	2024-okt-29	11,4
STX 0.45	81	5050	2024-jul-17	1318	1635	1651	2024-sep-06	13
STX 0.45	82	5050	2024-jul-17	1318	1635	1651	2024-sep-06	6,55
STX 0.45	83	4950	2024-jul-17	1318	1635	1651	2024-sep-06	14,2
STX 0.45	84	5000	2024-jul-17	1318	1635	1651	2024-sep-06	14
STX 0.45	85	4900	2024-jul-17	1318	1635	1651	2024-sep-06	9,85
STX 0.45	86	5000	2024-jul-17	1318	1635	1651	2024-sep-06	6,65
STX 0.45	87	4850	2024-jul-17	1318	1635	1651	2024-sep-06	16,4
STX 0.45	88	5050	2024-jul-17	1318	1635	1651	2024-sep-06	14,8
NYL 0.45	89	5000	2024-jul-18	1031	1238	1250	2024-okt-29	23
NYL 0.45	90	4250	2024-jul-18	1031	1238	1250	2024-nov-11	13
NYL 0.45	91	5000	2024-jul-18	1031	1332	1339	2024-nov-11	15,8
NYL 0.45	92	4600	2024-jul-18	1031	1332	1339	2024-nov-11	9,7

NYL 0.45	93	5000	2024-jul-18	1031	1409	1417	2024-nov-11	12,6
NYL 0.45	94	3450	2024-jul-18	1031	1409	1417	2024-nov-11	12,3
NYL 0.45	95	5000	2024-jul-18	1031	1428	1442	2024-nov-11	16,5
NYL 0.45	96	4300	2024-jul-18	1031	1428	1442	2024-okt-29	20,2
NYL 0.45	97	4100	2024-jul-18	1031	1541	1551	2024-okt-29	27,5
NYL 0.45	98	5050	2024-jul-18	1031	1541	1551	2024-nov-11	16,3
NYL 0.45	99	4550	2024-jul-18	1031	1632	1650	2024-nov-11	14,8
NYL 0.45	100	5000	2024-jul-18	1031	1632	1650	2024-nov-11	16
NYL 0.45	101	5100	2024-jul-18	1031	1638	1650	2024-nov-11	18,9
NYL 0.45	102	4700	2024-jul-18	1031	1638	1650	2024-nov-11	19,5
NYL 0.45	103	5000	2024-jul-18	1031	1644	1650	2024-nov-11	17,5
NYL 0.45	104	4900	2024-jul-18	1031	1644	1650	2024-nov-11	13,9
PLC 0.40	105	4900	2024-jul-18	1115	1549	1611	2024-okt-23	17,6
PLC 0.40	106	5000	2024-jul-18	1115	1549	1611	2024-okt-23	13,6
PLC 0.40	107	5000	2024-jul-18	1115	1600	1611	2024-okt-23	21,6
PLC 0.40	108	5000	2024-jul-18	1115	1600	1611	2024-okt-23	13,2
PLC 0.40	109	3700	2024-jul-18	1115	1612	1631	2024-okt-23	11,8
PLC 0.40	110	4450	2024-jul-18	1115	1612	1631	2024-okt-23	16,4
PLC 0.40	111	4700	2024-jul-18	1115	1623	1631	2024-okt-23	19,9
PLC 0.40	112	5100	2024-jul-18	1115	1623	1631	2024-okt-23	15,6
PLC 0.40	113	4500	2024-jul-18	1115	1651	1659	2024-okt-23	15,8
PLC 0.40	114	3900	2024-jul-18	1115	1651	1659	2024-okt-23	19
PLC 0.40	115	4350	2024-jul-18	1115	1702	1711	2024-okt-23	16
PLC 0.40	116	4700	2024-jul-18	1115	1702	1711	2024-okt-23	19,1
PLC 0.40	117	5600	2024-jul-18	1115	1721	1735	2024-okt-23	14
PLC 0.40	118	5250	2024-jul-18	1115	1721	1735	2024-okt-23	3,22
PLC 0.40	119	5250	2024-jul-18	1115	1721	1735	2024-okt-23	19
PLC 0.40	120	5000	2024-jul-18	1115	1721	1735	2024-okt-23	19,5
STX 0.45	121	5000	2024-jul-18	1136	1457	1514	2024-aug-28	13,8
STX 0.45	122	5000	2024-jul-18	1136	1457	1514	2024-aug-28	15,6
STX 0.45	123	5000	2024-jul-18	1136	1457	1514	2024-aug-28	14,2
STX 0.45	124	4950	2024-jul-18	1136	1457	1514	2024-aug-28	15
STX 0.45	125	5000	2024-jul-18	1136	1457	1514	2024-aug-28	13,2
STX 0.45	126	5000	2024-jul-18	1136	1457	1514	2024-aug-28	13,8
STX 0.45	127	4950	2024-jul-18	1136	1457	1514	2024-aug-28	13,8
STX 0.45	128	5000	2024-jul-18	1136	1457	1514	2024-aug-28	14
PSE 0.45	129	6500	2024-jul-19	1020	1141	1150	2024-aug-29	15,4
PSE 0.45	130	5350	2024-jul-19	1020	1141	1150	2024-aug-29	12,6
PSE 0.45	131	4900	2024-jul-19	1020	1233	1243	2024-aug-29	12,8
PSE 0.45	132	5000	2024-jul-19	1020	1233	1243	2024-aug-29	14,6
PSE 0.45	133	5100	2024-jul-19	1020	1244	1321	2024-aug-29	16,3
PSE 0.45	134	5000	2024-jul-19	1020	1314	1321	2024-aug-29	16
PSE 0.45	135	4450	2024-jul-19	1020	1414	1430	2024-aug-29	9,55
PSE 0.45	136	5000	2024-jul-19	1020	1414	1430	2024-aug-29	17,2
PSE 0.45	137	4900	2024-jul-19	1020	1452	1505	2024-aug-29	14,2
PSE 0.45	138	5500	2024-jul-19	1020	1452	1505	2024-aug-29	16,2
PSE 0.45	139	5350	2024-jul-19	1020	1621	1639	2024-aug-29	16
PSE 0.45	140	4700	2024-jul-19	1020	1621	1639	2024-aug-29	16,6
PSE 0.45	141	5300	2024-jul-19	1020	1629	1639	2024-aug-29	18,2
PSE 0.45	142	4550	2024-jul-19	1020	1629	1639	2024-aug-29	16,3
PSE 0.45	143	5000	2024-jul-19	1020	1709	1723	2024-aug-29	17,9
PSE 0.45	144	5000	2024-jul-19	1020	1717	1723	2024-aug-29	13,8
PLC 3.00	145	4350	2024-jul-19	1101	1422	1430	2024-nov-12	3,28
PLC 3.00	146	5050	2024-jul-19	1101	1422	1430	2024-nov-12	14,8
PLC 3.00	147	4500	2024-jul-19	1101	1432	1447	2024-nov-12	5,15
PLC 3.00	148	5000	2024-jul-19	1101	1432	1447	2024-nov-12	8,45
PLC 3.00	149	5000	2024-jul-19	1101	1440	1447	2024-nov-12	7,9
PLC 3.00	150	4600	2024-jul-19	1101	1440	1447	2024-nov-12	13,4

PLC 3.00	151	4800	2024-jul-19	1101	1537	1548	2024-nov-12	24,2
PLC 3.00	152	5050	2024-jul-19	1101	1537	1548	2024-nov-12	23,2
PLC 3.00	153	4850	2024-jul-19	1101	1554	1601	2024-nov-12	17,8
PLC 3.00	154	5000	2024-jul-19	1101	1554	1601	2024-nov-12	14,6
PLC 3.00	155	4050	2024-jul-19	1101	1614	1639	2024-nov-12	16,7
PLC 3.00	156	5000	2024-jul-19	1101	1614	1639	2024-nov-12	12,2
PLC 3.00	157	5000	2024-jul-19	1101	1651	1659	2024-nov-12	12,8
PLC 3.00	158	3700	2024-jul-19	1101	1651	1659	2024-nov-12	7,9
PLC 3.00	159	4300	2024-jul-19	1101	1735	1751	2024-nov-12	19,3
PLC 3.00	160	5100	2024-jul-19	1101	1735	1751	2024-nov-12	25,5
STX 0.22NK	161	5000	2024-jul-30	1055	1432	1453	2024-aug-28	3,72
STX 0.22NK	162	5000	2024-jul-30	1055	1435	1453	2024-aug-28	2,87
STX 0.22NK	163	5000	2024-jul-30	1055	1437	1453	2024-aug-28	3,44
STX 0.22NK	164	5100	2024-jul-30	1055	1443	1453	2024-aug-28	3,94
PLC 0.22NK	165	5000	2024-jul-30	1305	1948	2047	2024-sep-06	4,59
PLC 0.22NK	166	5050	2024-jul-30	1305	2013	2047	2024-sep-06	6,4
PLC 0.22NK	167	5250	2024-jul-30	1305	2030	2047	2024-sep-06	7,25
PLC 0.22NK	168	5000	2024-jul-30	1305	2030	2047	2024-aug-29	4,69
PSE 0.22NK	169	4650	2024-jul-30	1305	1537	1622	2024-aug-29	4,58
PSE 0.22NK	170	4500	2024-jul-30	1305	1537	1622	2024-aug-29	4,24
PSE 0.22NK	171	4400	2024-jul-30	1305	1552	1834	2024-aug-29	3,38
PSE 0.22NK	172	4000	2024-jul-30	1305	1552	1834	2024-aug-29	3,4
PLC 0.80NK	173	5000	2024-jul-30	1305	1819	1857	2024-okt-23	2,8
PLC 0.80NK	174	4000	2024-jul-30	1305	1846	1857	2024-okt-23	3,07
PLC 0.80NK	175	5000	2024-jul-30	1305	2000	2047	2024-okt-23	2,9
PLC 0.80NK	176	5000	2024-jul-30	1305	2025	2047	2024-okt-23	3,4
PLC 1.20NK	177	5200	2024-jul-30	1305	1617	1703	2024-nov-11	1,78
PLC 1.20NK	178	4500	2024-jul-30	1305	1643	1703	2024-nov-11	2,12
PLC 1.20NK	179	5000	2024-jul-30	1305	1656	2010	2024-nov-11	4,05
PLC 1.20NK	180	5000	2024-jul-30	1305	1656	2010	2024-nov-11	3,06
STX 0.45NK	181	5000	2024-jul-30	1056	1355	1414	2024-aug-28	3,66
STX 0.45NK	182	5100	2024-jul-30	1056	1401	1414	2024-aug-28	2,27
STX 0.45NK	183	5000	2024-jul-30	1056	1401	1414	2024-aug-28	2,78
STX 0.45NK	184	5000	2024-jul-30	1056	1405	1414	2024-aug-28	3,88
NYL 0.45NK	185	5000	2024-jul-30	1425	1555	1622	2024-sep-04	11,8
NYL 0.45NK	186	4700	2024-jul-30	1425	1555	1622	2024-sep-04	11,4
NYL 0.45NK	187	4650	2024-jul-30	1425	1744	1758	2024-sep-04	13
NYL 0.45NK	188	5050	2024-jul-30	1425	1744	1758	2024-sep-04	11
PLC 0.40NK	189	5000	2024-jul-30	1521	2139	2148	2024-okt-23	4,52
PLC 0.40NK	190	5000	2024-jul-30	1521	2142	2148	2024-okt-23	4,65
PLC 0.40NK	191	5450	2024-jul-30	1552	2038	2148	2024-okt-29	5,95
PLC 0.40NK	192	5000	2024-jul-30	1552	2135	2148	2024-okt-29	6,25
PSE 0.45NK	193	4700	2024-jul-30	1615	1730	1758	2024-okt-29	6,85
PSE 0.45NK	194	4750	2024-jul-30	1615	1730	1758	2024-okt-29	7,4
PSE 0.45NK	195	5550	2024-jul-30	1657	2022	2112	2024-okt-29	7,55
PSE 0.45NK	196	4700	2024-jul-30	1657	2103	2112	2024-okt-29	6,65
PLC 3.00NK	197	5000	2024-jul-30	1743	1909	2010	2024-aug-29	0,595
PLC 3.00NK	198	5750	2024-jul-30	1743	1948	2010	2024-aug-29	0,97
PLC 3.00NK	199	5000	2024-jul-30	1755	1908	1945	2024-aug-29	0,377
PLC 3.00NK	200	5000	2024-jul-30	1755	1938	1945	2024-aug-29	0,675
NoFilter NK	NEK01		NA	NA	NA	NA	2024-aug-29	0
NoFilter NK	NEK02		NA	NA	NA	NA	2024-sep-04	0
NoFilter NK	NEK03		NA	NA	NA	NA	2024-sep-06	0
NoFilter NK	NEK04		NA	NA	NA	NA	2024-okt-23	0
NoFilter NK	NEK05		NA	NA	NA	NA	2024-okt-29	0,0935
NoFilter NK	NEK06		NA	NA	NA	NA	2024-nov-11	0
NoFilter NK	NEK07		NA	NA	NA	NA	2024-nov-12	0,0505
NoFilter NK	NEK08		NA	NA	NA	NA	2024-nov-14	0



Rent vand – det er klart

NIVA Danmark er en dansk afdeling under Norsk institutt for vannforskning STI (NIVA), som er Norges viktigste miljøforskningsinstitut for vandfaglige spørgsmål, og som arbejder med et bredt spektrum af miljø-, klima- og ressourcespørgsmål. Hos NIVA Danmark, som blev etableret i 2014, er forskning, engagement og uafhængighed i vores DNA. Vores primære fokus er anvendelsesorienteret forskning i akvatiske økosystemer, først og fremmest vandløb, søer, kystvande og åbne havområder. Nøgleområder for os er biodiversitet, eutrofiering, miljøfarlige stoffer i bredeste forstand og økosystemernes sundhedstilstand, herunder effekterne af forskellige menneskelige aktiviteter indvirkning på økosystemerne, samt løsninger på de udfordringer vandmiljøet har.