

# Find beskyttet vandbille med e-DNA

To vandbillearter i Danmark er beskyttet af Habitatdirektivet. Vandbillerne er meget vanskelige at finde og artsbestemme, selv for de dygtigste biologer. Myndighederne skal vide, hvor billerne findes for at kunne sikre den beskyttelse, der kræves i Habitatdirektivet. DNA-teknikker kan hjælpe med at finde både vandbiller og andre vandlevende dyrearter. Måske kan DNA-teknologien også bruges til kvantificering.

MARTIN HESSELSØE, MORTEN LARSEN,  
STEEN W. KNUDSEN, LARS LØNSMAN  
IVERSEN, PETER RASK MØLLER &  
TORBEN HVIID

## Østdanmarks største højmose

Holmegaard Mose, der ligger 10 km nord for Næstved, er Østdanmarks største højmose. Den er privatejet, men Naturstyrelsen har siden 2005 været plejemyndighed i kraft af fredningen og en frivillig tinglyst aftale.

Højmosen er opstået som en tilgroningsmose efter sidste istid. I alt blev der over et areal på 500 ha opbygget en tørvepude på op mod 6 meters tykkelse. Fra starten af 1800-tallet gik udviklingen den anden vej. Tørven udgør en brændselsresurse, og fra 1825, hvor Holmegaard Glasværk blev etableret, og til midt i 1950'erne, blev højmosen udnyttet intensivt.

Holmegaard Mose er nu en mosaik af helt afgravede vandfyldte tørvegrave, lavtliggende våde tørveskær, tørre birketilgroede flader og enkelte partier af kun delvist afgravede højmoserester. Diversiteten af forskelligartede ferskvandshabitater rummer levesteder for en rigdom af planter og dyr. Med over 80 arter registreret i mosen, er Holmegaard mose et af de artrigste områder i Danmark når det gælder vandkalve.

Naturstyrelsen har med EU-betalte LIFE-projekter påbegyndt genopretning af højmosen, der er et internationalt naturbeskyttelsesområde (habitatområde H145). Formålet her



Figur 1: Lys skivevandkalv (*Graphodeus bilineatus*). Arten er opført på Habitatdirektivets bilag II og bilag IV (Foto: Lars Iversen, Amphi Consult).

er at genskabe den natur og hydrologi, som tidligere tørveindvinding har ødelagt. I perioden 2010 – 2013 blev vandstanden hævet i den vestlige del af højmosen og skyggende vegetation fjernet. Der er nu 150 ha lysåben højmosenatur under gendannelse. Med et nyt LIFE-projekt for perioden 2015 – 2021 skal der ske yderligere forbedring af hydrologi og levestedsforhold. I dette projekt indgår et fokus på to insektarter, der er på Habitatdirektivets bilag II, og som Danmark har en forpligtelse til at sikre gunstig bevaringsstatus for.

Det drejer sig om stor kærguldsmed og lys skivevandkalv.

## Kortlægning af sjældne insektarter

Amphi Consult foretog i 2016 en grundig undersøgelse af forekomsten af stor kærguldsmed og lys skivevandkalv i Holmegaard Mose. Dette var en såkaldt baselineundersøgelse, der gør det muligt for Naturstyrelsen at følge effekterne af naturplejen i området på de to insektarters udbredelse. De to insektarters forekomst blev kortlagt i 40 udvalgte

**e-DNA**

Alle organismer afsætter DNA-spor i miljøet. Rester af DNA i miljøet kaldes ofte environmental-DNA eller e-DNA (også kaldet miljø-DNA). e-DNA stammer fra døde eller døende celler, der frigives fra kroppen fx gennem tarmsystemet. Analyse efter artsspecifik e-DNA kan således påvise spor af vandlevende arter, fx sjældne arter som lys skivevandkalv.

Amphi Consult har arbejdet med udvikling af artsspecifikke e-DNA detektions-systemer siden 2012. Udviklingsarbejdet foregår bl.a. i samarbejde med Statens Naturhistoriske Museum (Københavns Universitet), Aalborg Universitet og Eurofins Miljø A/S.

Lys skivevandkalv er en af de arter, som nu kan eftersøges med e-DNA.

Læs mere om samplingmetoder og hvilke arter der kan eftersøges med e-DNA, på: [www.e-DNA.dk](http://www.e-DNA.dk)

tørvegrave.

Lys skivevandkalv blev eftersøgt med ketsjer i tørvegravene ultimo august/primo september, hvor det formodes at densiteten af individer vil være højest. Undersøgelsen blev udført i varmt, solrigt og vindstille vejr. Yderligere blev de undersøgte områder vurderet i forhold til, hvordan de kan forbedres som levesteder for beskyttede vandhulsinsekter.

Lys skivevandkalv blev registreret i tre tørvegrave i den nordvestlige del af Holmegaard Mose. Populationen af lys skivevandkalv synes at være stabil i området, da den tidligere er fundet flere gange i mosen over en årrække, og blev fundet i stort tal under denne feltundersøgelse.

Lokaliteterne hvor arten blev fundet er alle tørvegrave med rent vand og lavvandede partier med udbredt sumpvegetation. Dette tilgodeser artens krav til levestedet. Undersøgelserne i området indikerede, at de tørvegrave, der var mindst påvirket af menneskelige aktiviteter og havde fladt skrånende brinker, udgjorde de bedste levesteder for lys skivevandkalv.

Samtidig med den konventionelle undersøgelse blev der udtaget vandprøver til e-DNA analyse af lys skivevandkalv.

### Bestandsvurdering af lys skivevandkalv

I ét vandhul (tørvegrav 3) blev bestandsstørrelsen af lys skivevandkalv undersøgt nærmere

*Tabel 1 Antal vandbiller i tørvegrav estimeret ved udtyndingsmetoden og ved e-DNA. De to uafhængige metoder rammer samme størrelsesorden.*

Metode	Antal ( $A_s$ ) vandbiller i tørvegrav nr. 3
Estimeret ved udtynding (Konventionel metode)	595
Estimeret ved e-DNA måling	1406

med den såkaldte udtyndingsmetode. Ved denne metode opfiskes så mange dyr som muligt, gennem flere grundige opfiskninger. Metoden er udviklet til fiskeundersøgelser /1, 2/.

Lys skivevandkalv blev opfisket i én time i fire på hinanden følgende dage. Alle dyr blev placeret i 40 liters baljer dækket med sorte sække, så dyrene ikke kunne flyve væk.

I alt blev der fanget i alt 56 individer i tørvegraven i løbet af de fire fangstdage. Resultatet var en fangsteffektivitet langt under 50%. Derfor er det ret usikkert at anvende udtyndingsmetoden til beregning af et bestandsestimat. På trods af usikkerheden kan bestanden med udtyndingsmetoden estimeres til omkring 595 dyr i tørvegrav 3 (se tabel 1).

### Kortlægning med e-DNA

Der blev indsamlet vandprøver fra 29 tørvegrave i området til e-DNA-analyse for lys skivevandkalv. Prøverne blev filteret i felten med særligt udstyr, der gør det muligt at opkoncentrere e-DNA.

Der blev samtidig indsamlet en vandprøve fra en balje med 40 liter vand, hvor 18 individer af lys skivevandkalv havde opholdt sig i én dag (se figur 2). Derudover blev der indsamlet negative kontroller fra steder, hvor lys skivevandkalv ikke forekommer.

Analyserne gav positive resultater fra seks lokaliteter. I alle tilfælde var det lave koncentrationer af e-DNA som blev påvist. Arten blev kun fundet med konventionelle metoder på tre lokaliteter. Dette tyder på, at e-DNA metoden i nogle tilfælde kan påvise arten flere steder end en trænet biolog.

### Bestandsvurdering med e-DNA

Kvantificering af DNA er vanskelig. Man kan kun forvente resultater, som indikerer størrelsesorden. Da kvantificering med konventionelle metoder ofte har tilsvarende begrænsninger og tillige koster meget arbejdskraft og udstyr, blev det besluttet at afprøve metoden med data fra Holmegaard Mose.

De kvantitative e-DNA beregninger er baseret på en ekstrapolering af DNA-standardkurven. Dette kan kun gøres hvis man anerkender de store usikkerheder der er forbundet med sådanne ekstrapoleringer og konklusionerne der kan drages fra disse. Beregningerne er alligevel udført, for at teste metodens kvantitative potentiale i sammenligning med den konventionelle undersøgelse. Den interesserede læser kan finde flere detaljer om beregninger og forbehold i vores rapport /3/.

Den e-DNA prøve, som blev taget fra en balje med 18 biller i 40 liter vand, gav naturligt nok et meget højt e-DNA signal. DNA-signalet fra baljen var flere tusinde gange kraftigere, end e-DNA målingerne fra de naturlige prøver. I baljen (B) kender vi antallet af dyr ( $A_B = 18$ ), mængden af vand ( $V_B = 40$  liter) og koncentrationen af DNA ( $C_B$ ), se figur 2.

Efter e-DNA analyserne er udført kender vi også e-DNA koncentrationen i søen ( $C_s$ ), se figur 2.

Vandvolumen i søen ( $V_s$ ) estimeres ud fra opmåling af arealet på luftfoto. Der antages en gennemsnitlig vanddybde på 1 meter i søen. Dette giver en vandmængde i søen ( $V_s$ ) på ca. 6 mio. liter.

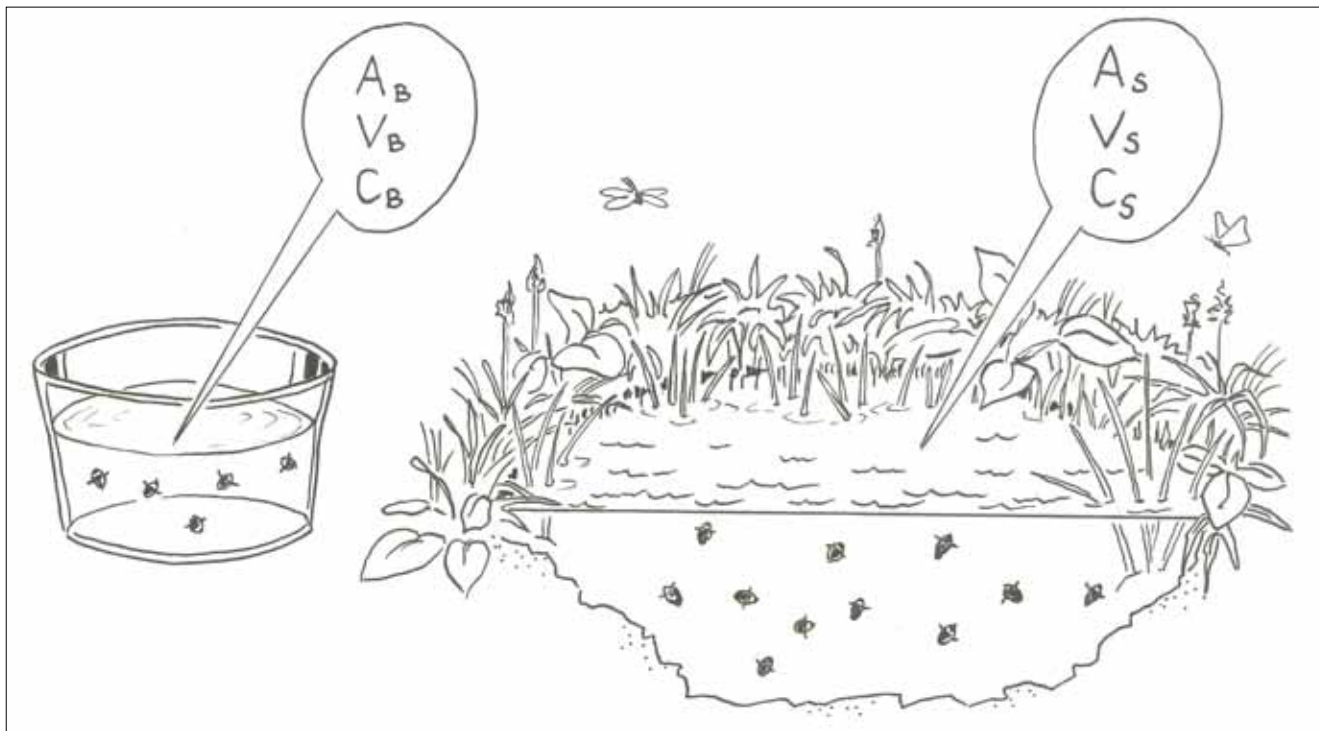
Hvis det antages, at e-DNA mængden pr. dyr er den samme i både baljen og søen, så kan antallet af biller i søen ( $A_s$ ) estimeres ud fra e-DNA koncentrationen (C) og volumen (V) som følger:

$$A_s = A_B \cdot \frac{C_B \cdot V_s}{C_s \cdot V_B}$$

Resultat af denne beregning fremgår af tabel 1. Til sammenligning vises i tabel 1 også bestandsstørrelsen beregnet ved udtyndingsmetoden. De to uafhængige metoder rammer ikke helt samme resultat. Det må dog bemærkes, at de to metoder rammer i samme størrelsesorden. Det må understreges, at udtyndingsmetoden ikke er nogen facitliste. Denne metode er i sig selv meget usikker på grund af utilstrækkelig udtynding af bestanden. Dertil kommer, at udtyndingsmetoden altid er forbundet med en meget stor arbejdsindsats.

### Fremtiden for vandbiller i Holmegaard Mose

Naturstyrelsens indsats for lys skivevandkalv er forpligtet af Natura 2000-planen for området /4/. Artens nationale status er defineret som "stærkt ugunstig". Natura 2000-planen siger, at der skal ofres særlig opmærksomhed på arten. Stor kærguldsmed er endnu ikke på udpegningsgrundlaget for Holmegaard Mose og er derfor ikke omfattet af Natura 2000-planen.



Figur 2: Princippet for kvantitativ undersøgelse med e-DNA ved hjælp af en balje med en kendt mængde vandbiller. Hvis man antager, at e-DNA koncentrationen i vandet følger antallet af dyr i vandet, så kan antallet af biller i søen ( $A_s$ ) beregnes ud fra de øvrige kendte oplysninger. A: Antal biller; V: Volume; C: Koncentrationen af artsspecifik e-DNA; B: balje; S: sø (Grafik: Mikael Bebbler)

Begge arter er knyttet til rene og solbeskinnede vandhuller med lavvandede partier, sump- og undervandsvegetation. Det vil være en del af LIFE-indsatsen i de kommende år at optimere de fysiske forhold, hvor arterne er fundet ved baseline-kortlægningen, men også at skabe de rette levestedsforhold i nogle af de tørvegrave, hvor én eller begge arter vurderes at kunne indfinde sig. Skyggegivende vegetation fjernes på nogle af de soleksponeerede, men stejle brinker. Der foretages overfladiske tørveafgravninger for at skabe lavvandede partier med vandplanter og varmt vand hvor larverne kan udvikles. Sådanne områder vil også have værdi for andre vandinsekter, padder mv.

Tørvegravene er sekundære levesteder sammenlignet med den oprindelige højmosenatur. De oprindelige levesteder for vandhullerarterne har været uden for eller i kanten af højmosen, hvor levestederne i dag er væk. Den langsigtede målsætning om at genskabe en sammenhængende højmosseflade skal derfor suppleres med en målsætning om etablering af nye levesteder for lys skivevandkalv, stor kærguldsmed og andre truede arter – måske i kanten af højmosen. Dette kan ske ved naturgenopretning af andre levesteder i det store sydsjællandske lavbundsområde, som Holmegaard Mose blot er en del af.

For at følge op på Natura 2000-planens mål må der findes effektive metoder til monitorering af de beskyttede arter. I dette studie har e-

DNA teknologien været et effektivt supplement til de konventionelle metoder, både kvalitativt og kvantitativt.

### Konklusion

Dette studie har vist, at e-DNA teknologi kan være særdeles brugbart til kortlægning af beskyttede vandinsekter som lys skivevandkalv. Da meget få biologer kan finde arten, forventer vi, at e-DNA metoden vil blive et nyttigt hjælperedskab for mange forvaltere.

Undersøgelsen har også vist, at e-DNA teknologien har et kvantitativt potentiale, som måske svarer til de konventionelle undersøgelsesmetoder. Det kræver dog flere undersøgelser for at belyse sammenhængen mellem bestand og e-DNA koncentration.

### Referencer

- /1/ Bagenal, T. B. & Tesch, F. W. (1978): Age and growth. In: Bagenal, T. (ed.): Methods for assessment of fish production in fresh waters. IBP handbook No. 3, Blackwell, Oxford: 101-136.
- /2/ Bohlin, T., Hamrin, S., Heggberget, T., Rasmussen, G. & Saltveit, S. (1989): Electrofishing— theory and practice with special emphasis on salmonids. Hydrobiologica 173 9-43.
- /3/ Larsen, M., Iversen, L., Knudsen, S.W. & Hesselsøe, M.: Kortlægning af stor kærguldsmed og lys skivevandkalv i Holmegaard Mose (27 pp.). Amphi Consult for Naturstyrelsen, december 2016 (kan rekvireres ved henvendelse til forfatterne på mh@amphi.dk).
- /4/ Natura 2000-plan 2016 – 2021 for N2000-område 163

Suså, Tyststrup-Bavelse Sø, Slagmosen, Holmegaard Mose og Porsemosen. Fines på [www.mst.dk](http://www.mst.dk).

MARTIN HESSELSØE, Amphi Consult (mh@amphi.dk). MH er direktør og partner i Amphi Consult. MH leder Amphi Consults DNA-udviklingsarbejde, som udføres i samarbejde med bl.a. Statens Naturhistoriske Museum, Aalborg Universitet og Eurofins Miljø A/S.

MORTEN LARSEN, Amphi Consult. ML er biolog og har skrevet speciale på Aalborg Universitet om kortlægning af løgfrø med e-DNA.

STEEN W. KNUDSEN, Amphi Consult. SWK er havbiolog og molekylærbiolog. SWK arbejder med udvikling og test af eDNA detektionssystemer til akvatiske organismer i ferskvand og havvand.

LARS LØNSMANN IVERSEN, Amphi Consult. LLI er biolog og ph.d. i ferskvandsinvertebrater. Efter afsluttet erhvervs ph.d.-studie i Amphi Consult er LI nu post doc. på Biologisk Institut, Københavns Universitet.

PETER RASK MØLLER, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet. PRM er Zoolog med speciale i fisk. PRM arbejder med akvatiske organismers systematik og udbredelse med særligt fokus på udvikling af nye metoder.

TORBEN HVIID, Naturstyrelsen. TH er biolog i Naturstyrelsen Storstrøm og projektleder på LIFE-projektet i Holmegaard Mose.