AALBORG UNIVERSITET

Speciale

Biologi

Standardisering af eDNA-baserede metoder til vurdering af effekten af udledningen fra et renseanlæg i vandløb



Forfattere: Maiken Hedegaard Buje Mikkel Luna Bak



Institut for Kemi og Biovidenskab Biologi Fredrik Bajers Vej 7H 9220 Aalborg Ø

Titel:

Standardisering af eDNA-baserede metoder til vurdering af effekten af udledningen fra et renseanlæg i vandløb

Projekt:

Speciale

Projektperiode:

Februar 2023 - Juni
 2023 -

Projektgruppe:

Maiken Hedegaard Buje & Mikkel Luna Bak

Vejledere:

Jeppe Lund Nielsen & Nadieh de Jonge

Sidetal: 62 Afleveret: 01-06-2023

Rapportens indhold er frit tilgængeligt, men offentliggørelse (med kildeangivelse) må kun ske efter aftale med forfatterne.

Abstract

Due to the accelerated loss of species worldwide, there is a high demand for monitoring biodiversity in different ecological environments. This study focuses on freshwater streams in Denmark, which are usually examined and evaluated by the Danish Streamwater Fauna Index (DSFI). This method is time consuming and dependent on morphological expertise, which is in decline. Therefore new methods, such as eDNA-based methods, has arised. This project aims to propose a standardized method for the evaluation of the effect from a wastewater treatment plant discharge on stream waters. Both waterand sediment samples were investigated from a variety of distances up- and downstream from the discharge point from Skælskør wastewater treatment plant. The samples from water and sediment differed significantly, and thus they were treated seperately. DNA from the samples was amplified using four different sets of universal primers targeting bacteria/archaea, eukaryotes, invertebrates and meiofauna, to investigate as broad a variety of the biodiversity as possible. Surprisingly, the results indicate an increase in biodiversity after the discharge point for water samples. The same tendancy is only seen in the sediment if prokaryotic OTUs are excluded. No species were found to fit as indicators of the effect from the discharge point, which lead to the investigation of the beta-diversity between individual samples up- and downstream. The greatest beta-diversity was shown 75 meters downstream for water samples and 100 meters downstream for sediment samples, when compared to the same sampletype upstream. To propose a general standardizable method for estimating the effect of a point-source discharge more replications of the experiment in a variety of different streams is needed.

Denne rapport er et speciale udarbejdet af Maiken Hedegaard Buje og Mikkel Luna Bak på kandidatuddanelsen *Biologi* på institut for Kemi og Biovidenskab ved Aalborg Universitet. Det overordnede tema for projektet er naturovervågning og molekylærbiologi.

Tak til Nadieh de Jonge og Jeppe Lund Nielsen for god og grundig vejledning i forbindelse med dette projekt. Også tak til Søren Bastholm fra DMR for kyndig vejledning og hjælp til brug af feltudstyr.

Læsevejledning

Der vil igennem rapporten fremtræde kildehenvisninger, som vil blive samlet i en kildeliste til slut i rapporten. Der er i rapporten anvendt kildehenvisning efter Harvard-metoden.

Maiken Maiken Hedegaard Buje

W/ Bak

Mikkel Luna Bak

Abstract	v
Kapitel 1 Introduktion	1
1.1 Analyse af økosystemer	4
1.2 Amplificering af DNA	6
1.3 Sekventering af DNA	8
Kapitel 2 Problemformulering	11
Kapitel 3 Materialer og metoder	13
3.1 Prøveindsamling	14
3.2 DNA-ekstraktion	
3.3 Polymerase Chain Reaction	
3.4 Klargøring af DNA-library	
3.5 Databehandling	
Kapitel 4 Resultater	23
4.1 DNA-ekstraktion, amplificering og sekventeringskvalitet	
4.2 Sammenligning af prøvetyper	
4.3 Alfa- og beta-diversitet	
4.4 Analyse af biologiske samfund	
Kapitel 5 Diskussion	33
5.1 Forskel på vand- og sedimentprøver	
5.2 Biodiversitet	
5.3 Mikrobielle samfund	
5.4 Optimering af prøvetagningsmetode	
Kapitel 6 Konklusion	39
Kapitel 7 Perspektivering	41
Litteratur	43
Appendiks A Grundlag for ekstraheret DNA	51
A.1 Mængde filtreret vand	51
A.2 Mængde sediment, der er ekstraheret DNA fra $\ldots\ldots\ldots$	

Appen	diks B DNA-koncentration	53
B.1	DNA-koncentration efter DNA-ekstraktion.	53
B.2	DNA-koncentration for sediment prøver efter SPRI bead purification $\ . \ . \ .$	54
B.3	DNA-koncentration efter PCR og SPRI bead purification	54
B.4	DNA-koncentration efter barcoding ved polymerase chain reaction	56
B.5	DNA-koncentration efter de forskellige processer i klargøring af DNA-library	56
Appen	diks C Alfa- og beta-diversitet	57
C.1	Alfa-diversitet	57
C.2	Alfa-diversitet for datasæt uden prokaryote OTU'er	58
C.3	Beta-diversitet	59
Appen	diks D Screeplot	61
D.1	Sammenligning af prøvetyper	61
D.2	Sammenligning af opstrøms og nedstrøms	62

Introduktion

Verden står i dag overfor to store globale kriser; klimakrisen og biodiversitetskrisen [Mori, 2020]. Verdensbefolkningen stiger hvert år med 1,1%, hvilket giver en årlig stigning i populationen på cirka 83 millioner mennesker [United Nations, Department of Economic and Social Affairs, 2017]. Denne befolkningstilvækst resulterer i flere antropogene aktiviteter, der påvirker miljøet [Ganivet, 2019]. Dette sker blandt andet ved øget udslip af drivhusgasser, der accelererer klimaforandringerne, som kan have en negativ effekt på biodiversiteten [Ganivet, 2019; Mori, 2020]. Endvidere stiger fødevarebehovet i takt med befolkningstallet, hvorfor der ryddes naturarealer, som skal udnyttes til landbrug. Dette resulterer i fjernelsen af mange arters habitat, som er en af årsagerne til, at arter i dag uddør 100-1000 gange hurtigere end før den menneskelige påvirkning [Vosa et al., 2014]. Derfor er der en fortsat stigende interesse i at monitorere, og forstå den effekt tabet af biodiversitet har på et økosystem [Cardinale et al., 2012].

Biodiversiteten er faldet drastisk de sidste 50 år, og det estimeres at populationer af vertebrater, fra år 1970 til 2014, i gennemsnit er faldet med 60%, og artsantallet af ferskvandsvertebrater er reduceret helt op mod 83%. Yderligere estimeres det, at biomassen af arthropoder er faldet med 75%, og at op mod en million arter er udrydningstruede som en konsekvens af menneskelig aktivitet [Cardinale et al., 2012; Ganivet, 2019]. For at forhindre yderligere tab af arter, er der kommet et øget fokus på monitorering, der kan afsløre arters spredning og størrelsen på populationerne. I Danmark findes Det Nationale Overvågningsprogram for Vandmiljø og Natur (NOVANA), der står for at monitorere den økologiske tilstand i de danske vandløb, ved at undersøge artssammensætningen af planter, invertebrater og fisk [Miljøministeriet - miljøstyrelsen, 2023b].

En kortlægning over hvilke arter, der lever i et økosystem kan både ske ved konventionelle metoder, hvor der artsbestemmes på baggrund af morfologiske træk, og ved nyere metoder, hvor der udnyttes DNA-teknikker. I Danmark anvendes Dansk Vandløbsfaunaindeks (DVFI) til at vurdere den økologiske tilstand af et vandløb. Dette udregnes ved brug af sparke- og pilleprøver, hvor indfangede makroinvertebrater identificeres og bruges som indikatorer på vandløbets økologiske tilstand. Et vandløb undersøges ved forskellige stationer, hvor der tildeles en score fra et til syv, og syv er bedst [DCE, 2019]. Konventionelt tildeles en station en score ved brug af en sparkeprøve, der indsamles som 12 delprøver, som illustreret på Figur 1.1 [Wiberg-Larsen, 2011].



Figur 1.1: Lokationerne hvorfra hver delprøve af en sparkeprøve indsamles. Prøvetagningen starter i tværsnit 1 og slutter i tværsnit 3. Figur modificeret fra [Wiberg-Larsen, 2011].

DVFI bestemmes ud fra hvilke makroinvertebrater, der kan identificeres i prøven, samt hvor mange individer af de pågældende arter, der er til stede i prøven. Makroinvertebrater har livscyklusser på op til et år, hvorfor de kan give indikationer om vandløbets økologiske forhold over en længere periode. Derfor grupperes nogle makroinvertebrater i henholdsvis negative og positive diversitetsgrupper [Miljøstyrelsen, 1998]. Dog begrænser brugen af makroinverter prøvetagningen til perioden fra 1. februar til 30. april, hvor disse kan artsbestemmes [Wiberg-Larsen, 2011].

Alle levende organismer efterlader spor i form af DNA, også kaldet environmental DNA (eDNA), der er defineret som DNA udskilt fra en organisme. Nye teknikker tillader, at der fra vand- og sedimentprøver kan udvindes eDNA, der kan sekventeres, hvorved artsbestemmelse foregår ved hjælp af bioinformatik. De konventionelle metoder har visse udfordringer, blandt andet at arter med mange ens morfologiske træk kan være svære at skelne fra hinanden, samt at individer kan have tilpasset sig ved hjælp af fænotypisk plasticitet [Thomsen og Willerslev, 2015]. Endnu en udfordring ved de konventionelle metoder er, at de er tidskrævende, invasive og afhængige af taksonomiske eksperter [Thomsen og Willerslev, 2015; Pereira et al., 2021]. Disse udfordringer kan løses ved hjælp af DNA-teknikker, særligt ved hjælp af eDNA, hvor arterne ikke skal indfanges og et vandløb kan efterlades stort set urørt efter indsamling af både vand- og sedimentprøver. Dog er den manglende viden indenfor nedbrydningen og transporten af eDNA i vandløb en udfordring, som påvirker kvaliteten af prøvetagningsstederne [Carraro et al., 2020].

I Danmark er der cirka 69.000 km vandløb, hvoraf størstedelen er påvirket af menneskelige aktiviteter, såsom udledelse af spildevand. Næsten 90% af vandløbene er blevet reguleret

for at give bedre afvandingsforhold på de vandløbsnære arealer, hvilket resulterer i, at den økologiske tilstand ikke er optimal [Miljøministeriet - miljøstyrelsen, 2023a]. I 2015 var der i Danmark 839 aktive renseanlæg, der i alt udledte 768 millioner kubikmeter renset spildevand. Spildevandet tilførte i alt henholdsvis 3.800 tons kvælstof og 500 tons fosfor til vandmiljøet i Danmark [Miljø- og Fødevareministeriet, 2017]. For bedst muligt at estimere effekten af udledningskilderne, er det vigtigt at optimere prøvetagningsstrategierne. Derfor ønskes det i dette projekt at bestemme de optimale prøvetagningslokationer til estimering af effekten af et udledningspunkt ved hjælp af eDNA fra vand- og sedimentprøver.

1.1 Analyse af økosystemer

Til vurdering af tilstanden i et ferskvandsøkosytem i Danmark, anvendes makroinvertebrater samt diversiteten af disse [Wiberg-Larsen, 2011]. Derfor er artsidentifikation fundamental i forbindelse med fylogenetiske analyser, bevaringsbiologi og økologi [Díaz-Ferguson og Moyer, 2014]. I 2000 vedtog EU The European Water Framework Directive, der har til formål, at sikre god økologisk status i alle europæiske vandløb inden 2027 [DCE, 2019]. Dog er der ikke konsensus om metoden, der anvendes til at bestemme den økologiske tilstand, hvorfor den kan variere mellem lande [Hering et al., 2010].

I Danmark vurderes et vandløbs økologiske tilstand som god ved DVFI ≥ 5 og indsatsen fra EU har ændret andelen af de stationer i vandløb, som indgår i NOVANA, med DVFI ≥ 5 fra 20% i 1994 til 60% i 2018. Særligt er andelen af stationer med DVFI 6-7 steget markant, som det ses på Figur 1.2 [DCE, 2019].



Figur 1.2: Udvikling i DVFI ved 91-247 stationer undersøgt ved konventionelle metoder i perioden 1994-2018. Modificeret fra [DCE, 2019].

Der findes forskellige metoder til artsidentifikation, og konventionelt bestemmes en art ud fra de morfologiske træk. Den molekylærbiologiske udvikling har åbnet muligheden for en mere objektiv identificering ud fra DNA-analyser. Her udnyttes det, at alle organismer konstant udskiller DNA, hvilket kan afsløre en organismes tilstedeværelse i et givent økosystem. Begge metoder har sine begrænsninger, hvilket på nuværende tidspunkt betyder, at de ikke giver et fuldstændigt billede af artssammensætningen medmindre de kombineres [Pereira et al., 2021].

1.1.1 Morfologiske analyser

Konventionelle metoder til bestemmelse af artsdiversiteten i et økosystem består af en analyse af arternes morfologiske træk. Morfologiske analyser har visse udfordringer, blandt andet er de dyre, tidskrævende og invasive, da de forstyrrer og i mere ekstreme tilfælde skader det pågældende økosystem [Díaz-Ferguson og Moyer, 2014]. Yderligere kan det være vanskeligt at bestemme en organisme til art eller slægt, især for invertebrater, der kræver morfologisk undersøgelse af voksenstadiet, for at identificere til den korrekte art [Pereira et al., 2021]. Til disse morfologiske analyser kræves taksonomiske eksperter, som er sjældne og hvis antal er dalende [Pereira et al., 2021; Suter et al., 2021]. En fordel ved morfologiske analyser er kendskabet til en specifik arts morfologiske træk, der kan afsløre noget om organismens levevis. Yderligere er det muligt at identificere og beskrive nye organismer, der ikke før er beskrevet [Rétaux og Casane, 2013]. Nogle af udfordringerne ved de morfologiske analyser kan løses ved at bruge DNA-baserede metoder, heriblandt analyser af eDNA [Jo og Minamoto, 2021].

1.1.2 Environmental DNA-analyser

Analyser af eDNA kan anvendes til kortlægning af artsdiversiteten i et økosystem. I akvatiske miljøer kan eDNA blandt andet komme fra ekskrementer, slim, spyt, urin, tabte celler samt nedbrudt væv. Det kan stamme fra organismer, der lever i miljøet, eller dyr, såsom fugle og pattedyr, der besøger vandområdet for at drikke [Rees et al., 2014]. Indsamling af vand- og sedimentprøver til eDNA-analyser forstyrrer ikke organismerne på samme måde som de konventionelle metoder, da det er eDNA'et og ikke selve organismen, der skal undersøges. En vand- eller sedimentprøve vil dermed kunne afsløre tilstedeværelsen af organismer uden disse skal indfanges, hvorfor eDNA-analyser er mindre invasive end morfologiske analyser. Yderligere er eDNA-metoderne mere rentable, mere følsomme, mindre tidskrævende og uafhængige af morfologiske eksperter [Kusanke et al., 2020; Jo og Minamoto, 2021].

Eksempelvis tillader eDNA-analyser detektering af mere sjældne eller sky arter, der typisk vil flygte inden indsamling af sparkeprøver. At lede specifikt efter sjældne arter ved konventionelle metoder er både tidskrævende og dyrt, hvorfor eDNA er et bedre og billigere alternativ [Beng og Corlett, 2020]. Endvidere kan eDNA-metoder også udnyttes til kortlægning af mikrobiomet i en prøve, uden opdyrkning og karakterisering af bakterielle samfund [Farrell et al., 2019]. Dog vil der være risiko for falsk negative resultater, hvis metoderne, der anvendes, ikke detekterer eDNA fra en organisme, der lever i økosystemet [Elbrecht og Leese, 2017]. Yderligere kan en organisme først artsbestemmes, hvis genomet i forvejen er sekventeret, hvilket er en udfordring, da databaserne for arternes DNAsekvenser stadig er ufuldkomne [Beng og Corlett, 2020].

Forståelsen af dynamikkerne af eDNA er ikke fuldstændig, hvilket kan føre til falsk positive

resultater [Jo og Minamoto, 2021]. Eksempelvis kan både arter og eDNA transporteres af vektorer, oftest dyr, til områder, hvor det ikke normalt hører til. Tilførelsen af arter vil typisk skyldes fugle, og yderligere kan rovdyr via ekskrementer fungere som vektorer for eDNA fra byttedyr [Díaz-Ferguson og Moyer, 2014]. Den manglende forståelse for eDNA's nedbrydningsrate, og dermed hvor godt det bevares i naturlige miljøer, vil være en udfordring i forbindelse med anvendelsen af eDNA som overvågningsværktøj for et økosystem. En langsom nedbrydningsrate kan føre til falsk positive resultater, da en art eventuelt ikke længere lever i det pågældende økosystem, selvom dens eDNA er til stede [Joseph et al., 2022].

Nedbrydningen af eDNA påvirkes af forskellige faktorer, heriblandt mikrobiel aktivitet. Eksempelvis falder mængden af eDNA eksponentielt i vand fra vandløb, men ikke i steriliseret vand [Okabe og Shimazu, 2007]. Da den mikrobielle nedbrydning foregår enzymatisk vil den påvirkes af både pH-værdien og temperaturen i mediet, da enzymerne har både pH- og temperatur-optimum [Okabe og Shimazu, 2007; Barnes et al., 2014]. Yderligere påvirker mediet eDNA'et befinder sig i nedbrydningstiden, og undersøgelser viser, at nedbrydningsraten er højere i vandsøjlen end i sedimentet [Sakata et al., 2020]. Dermed giver eDNA fra vandsøjlen et bedre øjebliksbillede af artsdiversiteten [Nevers et al., 2020]. I sedimentet kan eDNA have en særlig lang holdbarhed, da DNA-molekylerne bliver bundet hertil, hvormed det beskyttes. Endvidere bindes ekstracellulære nukleaser til sedimentet, hvorved de inaktiveres, hvilket yderligere bidrager til holdbarheden af DNAmolekylerne [Barnes et al., 2014; Bista et al., 2017].

1.2 Amplificering af DNA

Amplificering af DNA er opformering af bestemte DNA-sekvenser. Ved eDNA-metoden anvendes primere, der muliggør opformeringen af bestemte DNA-sekvenser, såkaldte barcodes. Der kan både anvendes primere målrettet specifikke organismer, denne metode kaldes barcoding, og der kan anvendes universelle primere, der er målrettet bestemte grupper af organismer. Ved anvendelse af universelle primere vil forskellige barcodes amplificeres, hvorfor metoden kaldes metabarcoding. Når et helt økosystem undersøges, vil der typisk udføres metabarcoding [Živa Fišer Pečnikar og Buzan, 2014; Beng og Corlett, 2020]. Ønskes det eksempelvis at identificere arter fra riget animalia, kan det mitokondrielle cytokrom c oxidase sub-unit I (COI) gen amplificeres, da dette varierer mellem arter, og derved kan afsløre tilstedeværelsen af flere forskellige arter i en prøve [Elbrecht og Leese, 2017]. I dette projekt udnyttes COI til identifikation af invertebrater. For bedst muligt at beskrive økosystemet i et vandløb bør der ligeledes undersøges for diversiteten af bakterier/archaea, ferskvandsinvertebrater samt meiofaunaen. I dette projekt udnyttes henholdsvis 18S rRNA genet, 16S rRNA genet og det mitokondrielle 16S rRNA gen til dette, som vist i Tabel 1.1 [Creer et al., 2010; Caporaso et al., 2011; Vences et al., 2016; Elbrecht og Leese, 2017].

Tabel 1.1: Illustrerer hvilket gen, der er anvendt til identifikation af arter fra forskellige grupper af organismer [Creer et al., 2010; Caporaso et al., 2011; Vences et al., 2016; Elbrecht og Leese, 2017].

Amplificeret gen	Target organisme
COI	Invertebrater
16S rRNA	Bakterier/Archaea
Mitokondriel 16S rRNA	Ferskvandsvertebrater
18S rRNA	Meiofauna

Der findes flere metoder til at amplificere DNA, og den mest udbredte er polymerase chain reaction (PCR). PCR er en enzymatisk *in vitro* syntese af op til flere millioner kopier af en ønsket DNA-sekvens [Eisenstein, 1990; Erlich et al., 1991]. Denne process er baseret på cyklusser bestående af tre forskellige reaktioner, der forløber ved forskellige temperaturer. Første reaktion sker ved høje temperaturer varierende mellem 94 og 97°C, hvorved det dobbeltstrengede DNA denaturerer. Herefter sænkes temperaturen til mellem 50 og 72°C, hvilket muliggør binding af både forward og reverse primere, som er korte stykker af DNA eller RNA. Sidste trin er syntesen af nyt dobbeltstrenget DNA, hvor en DNA-polymerase forlænger primerne ved 70-75°C, typisk 72°C [Eisenstein, 1990; Ishii og Fukui, 2001; Hashimoto et al., 2004; Innis et al., 2012]. Figur 1.3 illustrerer en PCR-cyklus.



Figur 1.3: Illustration af en PCR-cyklus, der består af de tre reaktioner: denaturering, binding af primere og syntese. Figur lavet ud fra [Eisenstein, 1990].

Komponenterne der skal anvendes til en succesfuld PCR er: template DNA, primere, de fire deoxyribosenukleotider (dNTP), DNA-polymerase, Mg^{2+} og pH-buffer [Innis et al., 2012]. Til PCR anvendes Taq DNA-polymerase, isoleret fra den termofile bakterie *Thermus aquaticus*, da denne polymerase er termostabil, og derfor ikke påvirkes af de høje temperaturer i denatureringstrinnet. Mg^{2+} er nødvendigt, da Taq DNA-polymerasen

anvender den som co-faktor [Eisenstein, 1990; Innis et al., 2012]. Yderligere er det essentielt at have et optimalt primerdesign, da det er primerne, der binder til det enkeltstrengede DNA, og dermed initierer DNA-polymerasen og opformeringen af den ønskede DNAsekvens [Ye et al., 2012]. For at reaktionen forløber optimalt, er det vigtigt med en høj koncentrationen af primere og dNTP, således der er størst sandsynlighed for, at det er en primer, der binder sig til det enkeltstrengede DNA [Eisenstein, 1990].

1.3 Sekventering af DNA

Siden James Watson og Francis Crick i 1953 opdagede, at DNA eksisterer som en 3dimensionel dobbelhelix, har en sekventering af rækkefølgen af baserne i DNA'et været efterspurgt [de Chadarevian, 2003]. Sanger metoden, der blev præsenteret i 1977, var den første sekventeringsmetode. Denne metode er dog meget tidskrævende, hvorfor det konstant er blevet undersøgt, hvordan sekventeringen kan optimeres [Sanger et al., 1977]. Nu eksisterer 4. generations sekventeringsteknologien nanopore, der sekventerer i realtid, og som kan udnyttes til biologiske undersøgelser i felten. Endvidere kan der sekventeres meget lange DNA-fragmenter ved denne metode [Feng et al., 2015]. Dog er sekventeringen ved hjælp af nanopore forbundet med en fejlrate, der skal korrigeres for [Chen et al., 2021].

Oxford Nanopore Technologies lancerede den første nanopore sekventeringsmaskine, MinION, i 2014, og teknologien er baseret på en nano-protein kanal, kaldet nanoporen. Der benyttes mange forskellige nanoporer, hvoraf den første og mest anvendte er α hæmolysin fra Staphylococcus aureus, der sidder fasthæftet i en membran, som vist på Figur 1.4 [Feng et al., 2015; Wang et al., 2021]. Denne membran er ikke elektrisk ledende og adskiller elektrolytter i henholdsvis *cis*-siden, der er negativt ladet og *trans*-siden, der er positivt ladet. Sekventeringen initieres ved, at et motorprotein binder sig til enden af det dobbeltstrengede DNA, hvortil der er bundet en adaptersekvens. På membranen sidder tether-proteiner, der binder til motorproteinet, og fører det til nanoporen. Desuden fungerer motorproteinet som DNA-helikase, der deler det dobbeltstrengede DNA. I en elektrolytisk opløsning tilføres en konstant elektrisk spænding for at producere en ionstrøm gennem nanoporen, således at de negativt ladede enkeltstrengede DNA- eller RNAmolekyler bliver trukket fra *cis*-siden til *trans*-siden, hvor overgangshastigheden styres af motorproteinet. Når den ene DNA-streng trækkes igennem nanoporen vil de fire forskellige nukleotider påvirke ionstrømmen forskelligt. I nanoporen sidder et adaptormolekyle, der registrerer amplituden og varigheden af ændringen i ladning, hvilket kan oversættes til et nukleotid, og denne information sendes direkte til en computer, hvorfor sekventeringen aflæses i realtid [Feng et al., 2015; Wang et al., 2021].



Figur 1.4: Til venstre ses et udsnit af membranen fra en MinION. Til højre ses et motorprotein (mørkeblå) samt en nanopore (lyseblå), der nederst har adaptermolekylet, der fastholder nukleotiderne længe nok til at ændring i ionstrømmen kan registreres. DNA kommer fra *cis*-siden mod *trans*-siden og følges af en ionstrøm (gul). Figur modificeret fra [National Human Genome Research Institute, 2023]

Antropogene aktiviteter, såsom udledning af spildevand, forringer biodiversiteten i de danske vandløb, hvorfor der er kommet et øget fokus på monitorering af vandløbenes økologiske tilstand. Konventionel bestemmelse af den økologiske tilstand er invasiv og afhænger af et stadigt faldene antal morfologiske eksperter, hvorfor der er behov for en ny metode til effektivt at overvåge og evaluere biodiversiteten i vandløb.

Der findes ingen standardiserede metoder til at måle effekten af en punktudledningskilde. Stationerne, hvor der udregnes DVFI, har forskellige afstande til udledningskilderne både opstrøms og nedstrøms. Ved udnyttelse af eDNA kan der laves billige, hurtige og standardiserede metoder til vurdering af effekten fra en udledningskilde. Derfor ønskes det i dette projekt at undersøge om eDNA-teknikker, med en øget opløsning, kan påvise en påvirkning nedstrøms. Ud fra dette ønskes det at bestemme den optimale afstand fra punktudledningen, for bedst muligt at kunne beskrive effekten ud fra vand- og sedimentprøver.

Hypoteser

Formålet for projektet leder frem til de følgende hypoteser:

- 1. Biodiversiteten nedstrøms er positivt korreleret med afstanden til udledningspunktet.
- 2. Biodiversiteten er højere opstrøms end nedstrøms fra udledningspunktet.
- 3. Der er forskel på de mikrobielle samfund, der findes opstrøms og nedstrøms.
- 4. Der er forskel på hvilke arter der detekteres i vand- og sedimentprøverne.

Materialer og metoder

Prøveindsamlingen er foretaget d. 29/3-2023 i Spegerborgrenden, der er et 20-30 cm dybt og cirka 1,8 m bredt vandløb, beliggende i Skælskør. Vandløbet er tydeligt påvirket af menneskelig indvirken i form af udledning fra rensesanlæg, udretning og udlægning af sten, som illustreret i Figur 3.1 [Slagelse Kommune Tekning & Miljø, 2010].



(a) Opstrøms

(b) Nedstrøms

Figur 3.1: Billede af Spegerborgrenden, henholdsvis opstrøms (a) og nedstrøms (b) for udledningspunktet fra Skælskør renseanlæg.

Prøvetagningen centrerer sig omkring et udledningspunkt fra Skælskør renseanlæg, der årligt renser 35.000 personækvivalenter, svarende til 2,55 millioner m³ vand [DinGeo -Boliga, 2023]. Renseanlæggets placering, udledningspunktet og prøvetagningslokationerne længst opstrøms og nedstrøms er illustreret på Figur 3.2.



Figur 3.2: Prøvetagningslokationen ved Spegerborgrenden, beliggende på vestsjælland. Figuren illustrerer udløbet fra Skælskør renseanlæg (rød) samt prøvetagningsstrækningen, der startede 100 meter nedstrøms (lilla) og sluttede 50 meter opstrøms (grøn).

I løbet af de seneste 10 år har vandløbet haft DVFI på 2-3, hvilket svarer til en dårlig økologisk tilstand. Diversiteten for makroinvertebrater er lav, og generelt, men især nedstrøms, er der observeret mange negative indikatorarter i vandløbet [Miljødata - Danmarks miljøportal, 2023].

3.1 Prøveindsamling

Der tages prøver både opstrøms og nedstrøms fra udledningspunktet fra Skælskør renseanlæg. Der er i alt indsamlet prøver fra 16 lokationer. For 11 af lokationerne er der både indsamlet en vand- og sedimentprøve, og for fem lokationer er der blot indsamlet sedimentprøver. De eksakte prøvetagningslokationer er angivet i Tabel 3.1, hvor O står for opstrøms, N for nedstrøms og tallet indikerer afstanden i meter fra udledningspunktet. Cellerne markeret med grøn repræsenterer de lokationer, hvor der kun er indsamlet sedimentprøver.

Tabel 3.1: De 16 prøvetagningslokationer, hvor O står for opstrøms, N for nedstrøms og tallet indikerer hvor mange meter fra udledningspunktet prøven er indsamlet. Ved lokationerne hvor cellen er markeret med grønt, er der udelukkende indsamlet sedimentprøver, og for de resterende lokationer er der både indsamlet vand- og sedimentprøver.

O50	O25	010	0	N5	N10	N15	N20
N25	N30	N35	N40	N45	N50	N75	N100

Prøveindsamlingen startede nedstrøms for at undgå påvirkning af de efterfølgende prøvetagningslokationer.

Figur 3.3 illustrerer hvordan henholdsvis vand- og sedimentprøver er indsamlet på de forskellige lokationer. Tværsnit 1 illustrerer prøvetagningen på lokationer hvor der både

indsamles vand- og sedimentprøver og tværsnit 2 illustrerer prøvetagningen på lokationer, hvor der kun indsamles sedimentprøver.



Figur 3.3: Prøvetagning for tværsnit af de to slags lokationer.

3.1.1 Vandprøver

Til indsamling af vandprøver anvendes en beholder, der kan indeholde en halv liter vand (Figur 3.4)



Figur 3.4: Beholder anvendt til indsamling af vandprøver

Inden indsamling blev beholderen skyllet igennem tre gange med vand fra vandløbet, for at mætte indersiden af beholderen. Efterfølgende blev de indsamlede prøver filtreret med et $0, 22\mu$ m PES membrane filter (Merck, Tyskland) i en feltpumpe (DMR, Danmark). Hvis filtreringstiden oversteg 30 minutter, blev den afbrudt, da filteret antages at være mættet. Bilag A.1 viser hvor mange mL der blev filtreret fra hver prøve.

Filtrene blev overført til Greinerrør og overhældt med "lysis buffer" (DMR, Denmark), der frigiver DNA fra celler og modvirker nedbrydningen af DNA. Efterfølgende blev Greinerrørene opbevaret ved 5°C indtil DNA-ekstraktion [Longmire et al., 1997].

3.1.2 Sedimentprøver

Til indsamling af sedimentprøver anvendes rør, hvori sedimentkernen opsamles (Figur 3.5).



Figur 3.5: Rør anvendt til indsamling af sedimentprøver.

Først skylles rørene efter med vand fra vandløbet, hvorefter sedimentkernen indsamles tre steder i hvert tværsnit, i henhold til Figur 3.3, ved at nedsænke røret i sedimentet. Røret lukkes med gummipropper, hvorefter det opbevares oprejst, for at sedimentet kan sætte sig. De øverste fem cm udtages og opbevares i en plastikpose. Prøverne fra samme tværsnit samles og homogeniseres ved at massere posen i to minutter. To mL af dette overføres til et 2 mL eppendorffrør og opbevares ved -18°C indtil DNA-ekstraktion.

3.2 DNA-ekstraktion

Til DNA-ekstraktion blev to forskellige kits anvendt. DNA fra sedimentprøver blev ekstaheret ved hjælp af FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA), og til filtrene fra vandprøverne blev kittet DNeasy PowerWater kit (Qiagen, Tyskland) anvendt. Workflowet for de to kits er illustreret i Figur 3.6.



Figur 3.6: Workflow for DNA-ekstraktion for henholdsvis FastDNA SPIN kittet til sedimentprøver og PowerWater kittet til vandprøver. Figur lavet ud fra protokollerne for DNA-ekstraktion [MP Biomedicine, 2021; QIAGEN, 2022].

Der blev ekstraheret DNA fra 500 mg sediment fra hver prøvetagningslokation og hele filteret fra hver vandprøve. Den præcise mængde sediment, der er ekstraheret DNA fra er vist i Bilag A.2. Ekstraktionen skete efter fabrikantens anbefalinger [MP Biomedicine, 2021; QIAGEN, 2022]. Elueringsvolumen var 100 µL og 80 µL nukleasefrit vand for henholdsvis vand- og sedimentprøverne.

Det ekstraherede DNA fra sedimentprøverne blev oprenset ved Solid Phase Reversible Immobilization bead purification (SPRI bead purification), for at fjerne eventuelle komponenter, der kan være til stede i det ekstraherede DNA, som kunne inhibere PCRreaktionen. Ved SPRI bead purification blev der tilført lige stor volumen af CleanNGS beads (CleanNA, Holland) og ekstraheret DNA fra sedimentprøverne. Dette blev blandet ved at pipettere op og ned og inkuberet i 5 minutter ved stuetemperatur. Herefter blev brøndpladen placeret på en magnet (Thermo Fisher Scientific, USA), så beadsene samlede sig i en pellet ved magneten. Da væsken var klar blev supernatenten fjernet. Efterfølgende blev pellet vasket med 175µL 80% ethanol, inkuberet i 30 sekunder og supernatanten blev fjernet. Dette trin blev gennemført to gange. Pelleten af beads blev lufttørret i 2 minutter, for at få alt ethanolen til at fordampe, hvorefter brøndpladen blev fjernet fra magneten. Pelleten blev herefter resuspenderet i 25µL nukleasefrit vand og inkuberet ved stuetemperatur i 5 minutter, for at eluere DNA'et. Brøndpladen blev efterfølgende sat tilbage på magneten og da væsken var klar blev supernatanten, med det opløste DNA, overført til en ny brøndplade. DNA-koncentrationen blev herefter målt med M1000 Pro plate reader (TECAN, Schweiz) ved anvendelse af kittet Qubit 1X dsDNA HS Assay (Invitrogen, USA) med 2 µL DNA input. Det ekstraherede DNA fra både vand- og sedimentprøverne blev opbevaret ved -18°C indtil amplificering ved PCR. Workflowet for SPRI bead purification er illustreret i Figur 3.7.



Figur 3.7: Illustrerer trinene i SPRI bead purification. Først tilsættes Clean NGS beads, hvilket DNA'et binder sig til. Herefter sættes prøverne på en magnet, så der dannes en pellet af Clean NGS beads. Dette tillader, at supernatanten kan fjernes uden at fjerne DNA'et. Efterfølgende vaskes pellet med 80 % ethanol og supernatanten fjernes. Dette trin udføres to gange. Prøverne tages af magneten så Clean NGS beads kan resuspenderes i nukleasefrit vand. DNA vil opløses i det nukleasefrie vand og prøven sættes tilbage på magneten, der igen vil danne en pellet, hvorved det oprensede DNA kan elueres. Figur fra [Beckman Coulter Life Sciences, 2021].

3.3 Polymerase Chain Reaction

Til amplificering af det ekstraherede DNA blev PCR anvendt. Alle reagenser samt PCRplader blev dekontamineret i en UV-bænk i 15 minutter, hvorefter reagenserne blev opbevaret på is.

Der blev i UV-bænken lavet fire primerblandinger, bestående af både forward og reverse primere i nukleasefrit vand med en primerkoncentration på 1μ M. Tabel 3.2 viser en oversigt over de primere der er blevet anvendt, samt hvilke organismer de har som target.

Tabel 3.2: Oversigt over de anvendte primere. Tabellen illustrerer hvilket gen de amplificerer, forward og reverse primer samt target organismer.

Primer	Target organismer	Reference
16S rRNA/F515-R806 (V4)	Bakterier/archaea	[Caporaso et al., 2011]
COI/BF3-BR2 (BF3)	Invertebrater	[Elbrecht og Leese, 2017]
Mitokondrielt 16S rRNA/Vert-16S-eDNAF1-R1 (Vert)	Ferskvandsvertebrater	[Vences et al., 2016]
18S rRNA/SSU-F04-R22 (SSU)	Meiofauna	[Creer et al., 2010]

3.3.1 Metabarcoding

Til amplificering af DNA fra vand- og sedimentprøverne, blev der lavet fire forskellige master mixes i UV-bænken. Tabel 3.3 illustrerer reagenserne i hvert master mix.

Reagens	Volumen pr. reaktion	Endelig koncentration
Template DNA	2 μL	
2X PCRBIO Ultra mix	$12,5 \ \mu L$	1X
Primerblanding (1µM)	10 µL	400 µM
Nukleasefrit vand	0,5 μL	
Total volumen	25 μL	

 Tabel 3.3: Illustrerer reagenserne i hvert master mix.

Der blev lavet fire PCR-reaktioner per prøve, en for hver primerblanding. Yderligere blev der lavet en negativ kontrol for hver primerblanding, der ikke indeholdte template DNA. Reaktionerne blev inkuberet i en thermocycler (VWR, USA) med programmet illustreret i Tabel 3.4.

Tabel 3.4: Programmet der blev anvendt til Polymerase chain reaction. Trinene markeret med grøn illustrerer en cyklus. Annealing temperaturen, angivet med XX, afhænger af hvilken primerblanding der inkuberes med.

Trin	Temperatur	Tid
Indledende denaturering	$95^{\circ}\mathrm{C}$	$2 \min$
Denaturering	$95^{\circ}C$	15 sek
Annealing af primere	XX°C	15 sek
Elongering af Taq polymerase	$72^{\circ}\mathrm{C}$	1 min
Endelig elongering	$72^{\circ}\mathrm{C}$	$5 \min$
Lagring	$10^{\circ}\mathrm{C}$	∞

Der blev kørt 40 cyklusser for vandprøver og 30 cyklusser for sedimentprøver, da vandprøverne indeholdte mindre DNA end sedimentprøverne. Annealing temperaturen, angivet med XX i Tabel 3.4 var 57°C for reaktionerne med primersættet SSU-F04-R22, mens den for de resterende primerblandinger var 50°C.

3.3.2 Kvalitetstjek af PCR-produkter

Kvalitetstjek af PCR-produkterne blev udført på TapeStation 4150 (Agilent Technologies, Danmark) ved undersøgelse af DNA-fragmenternes størrelse fra fire stikprøver, henholdsvis to vandprøver og to sedimentprøver, udvalgt så alle primerblandinger var repræsenterede. Herefter blev der oprenset ved SPRI bead purification, som beskrevet i Afsnit 3.2 og illustreret i Figur 3.7. Den eneste ændring er, at der nu blev tilføjet en 4:5 volumen af CleanNGS beads til PCR produkterne. Herefter blev DNA-koncentrationen af PCR produkterne målt med M1000 Pro plate reader, ved anvendelse af kittet Qubit 1X dsDNA HS Assay med 2 μ L DNA input.

3.4 Klargøring af DNA-library

PCR-produkterne fra hver prøvetagningslokation blev multiplexet, så der for hver lokation for henholdsvis vand- og sedimentprøver var en samlet brønd med 24 µL PCR-produkter fra de fire primersæt. Dette blev gjort ved at tilføre 50 fmol af de fire forskellige PCR produkter, der var inkuberet med hver sin primerblanding, og tilføje nukleasefrit vand for at opnå en volumen på 24 µL. Dette var ikke muligt for alle prøver, da DNA-koncentrationen i nogle prøver var for lav. Derfor blev prøver, hvor der skulle tilføjes mere end 100 µL for at opnå en koncentration på 50 fmol af en prøve fjernet fra datasættet, da det vurderes at der ikke var tilstrækkeligt DNA heri. Hvis der derimod skulle tilføjes mellem henholdsvis 16 og 20 µL eller 20 og 99 µL, blev der tilføjet henholdvis 10 og 5 µL af den pågældende prøve, da det her vurderes, at DNA-koncentrationen var tilstrækkelig høj.

Til barcoding blev reagenserne i Tabel 3.5 blandet i hver af brøndene med 24 μL prøve.

Reagens	Volumen
PCR barcode $(10 \ \mu M)$	1 µL
PCR produkt $(0,5 \text{ nM})$	24 µL
LongAmp Taq 2x master mix	$25 \ \mu L$

 Tabel 3.5: Reagenser anvendt til barcoding af produkter fra polymerase chain reaction

Reaktionerne blev inkuberet i en thermocycler med programmet illustreret i Tabel 3.6, hvor der blev kørt 15 cyklusser.

Trin	Temperatur	Tid
Indledende denaturering	$95^{\circ}\mathrm{C}$	$3 \min$
Denaturering	$95^{\circ}C$	15 sek
Annealing af primere	$62^{\circ}\mathrm{C}$	15 sek
Elongering af Taq polymerase	$65^{\circ}\mathrm{C}$	$1 \min$
Endelig elongering	$65^{\circ}\mathrm{C}$	$8 \min$
Lagring	$10^{\circ}\mathrm{C}$	∞

Tabel 3.6: Programmet der blev anvendt til barcoding af produkterne fra Polymerase chain reaction. Trinene markeret med grøn illustrerer en cyklus, som blev gentaget 15 gange.

Efter barcoding blev der udført endnu en oprensning ved SPRI bead purification, som beskrevet i Afsnit 3.2 og illustreret i Figur 3.7 med en 4:5 volumen af CleanNGS beads per prøve. Herefter blev DNA-koncentrationen af prøverne målt med M1000 Pro plate reader, ved anvendelse af kittet Qubit 1X dsDNA HS Assay med 2 μ L DNA input.

De barcodede prøver blev samlet i et 1,5 mL eppendorfrør, ved at tilføje 30 ng DNA fra hver prøve. Dette blev oprenset ved SPRI bead purification, som beskrevet i Afsnit 3.2 og illustreret i Figur 3.7, med en 1:1 volumen af CleanNGS beads og DNA, og en elueringsvolumen på 50 μ L nukleasefrit vand. Herefter blev DNA-koncentrationen målt med M1000 Pro plate reader, ved anvendelse af kittet Qubit 1X dsDNA HS Assay med 1 μ L DNA input.

Til den resterende klargøring af DNA-library, bestående af DNA-repair, end-prep, adapter ligering, clean-up og loading af SpotON flowcelle, blev kittene Ligation Sequencing Kit 1D (SQK-LSK110) og PCR Barcoding Expansion Pack 1-96 (EXP-PBC096) (Oxford Nanopore Technologies, USA) anvendt, og producentens anbefalinger blev fulgt. Dog afviger fremgangsmåden til klargøring af DNA-library til loading af SpotON flowcellen fra producentens anbefalinger, da blandingen i dette projekt bestod af reagenserne i Tabel 3.7.

Reagens	Volumen
Sequencing Buffer II	$37,5~\mu L$
Loading beads II	$25,5~\mu L$
DNA-library	2 μL
Elution Buffer	10 µL

Tabel 3.7: Reagenser til loading af DNA-library i flowcellen.

Da den endelige DNA-koncentration i DNA-library var 25,8 ng/µL, blev der kun tilsat 2 µL så flowcellen ikke blev overmættet.

3.5 Databehandling

Sekventeringsdata fra de fire anvendte primersæt samles i ét datasæt. Det rå sekventeringsdata blev genereret ved live-basecalling under nanopore sekventeringen. Dette blev gjort ved hjælp af softwaren Guppy, der kan omdanne de elektriske signaler til nukleotider. Programmet Porechop blev anvendt til at fjerne adaptersekvenser, chimeric reads og sekvenser af lav kvalitet. Yderligere anvendes Porechop til at sortere sekvenserne efter barcodes [Wick, 2018]. Herefter blev programmerne NanoPlot, der danner QC-plots og dermed tjekker kvaliteten af sekvenserne, og NanoFilt, der udvælger sekvenser af en bestemt længde (150-600 basepar) og kvalitet, anvendt til kvalitetskontrol og størrelsesselektion [Coster et al., 2018]. For at korrigere for den fejlrate nanopore sekventering har, anvendes programmerne Minimap2 og Racon til polishing, hvor der genereres konsensussekvenser [Vaser et al., 2017; Li, 2018]. Til sidst samles sekvenser, med >97% lighed, i OTU'er ved hjælp af programmet VSEARCH og OTU'er med færre end 10 reads blev sorteret fra [Rognes et al., 2016]. Taksonomisk klassificering blev udført ved SINTAX algoritmen, som er implementeret i VSEARCH programmet. Til klassificering af 16S og 18S rRNA blev SILVA anvendt som database. Yderligere taksonomisk bestemmelse blev foretaget i NCBI Nucleotide BLAST, med Standard databases og Highly similar sequences (megablast).

Alt statistik er udført i RStudio version 2023.03.0+386 ved hjælp af ampvis2-pakken. Der er udregnet alfa- og beta-diversitet ved henholdsvis Shannon-indeks og Bray-Curtis.

Alle resultater fra sekventeringen, uafhængigt af primersæt, er samlet i ét datasæt. Derfor kan OTU'er identificeret ved hjælp af alle fire primersæt indgå i alle figurerne. Dog har 810 ud af 5249 OTU'er ikke fået tildelt taksonomi. Disse indgår stadig i datasættet, og har indflydelse på alfa- og beta-diversitet, PCA- og NMDS-plots samt statistiske tests, men ikke på heatmaps. Dog vil de ikke indgå, når data opdeles i archaea, bakterier, eukaryoter og invertebrater.

4.1 DNA-ekstraktion, amplificering og sekventeringskvalitet

Efter ekstraktionen af DNA fra vand- og sedimentprøverne, blev DNA-koncentrationen målt og resultaterne er præsenteret i Bilag B.1. Her ses det, at der blev ekstraheret DNA fra alle 27 prøver. Der blev kørt fire PCR-reaktioner per prøve, en med hvert primersæt. Efter oprensning blev DNA-koncentrationen målt, og resultaterne er præsenteret i Bilag B.3. Her ses en succesfuld amplificering af langt de fleste prøver, men for SN50 og S0 amplificeret med Vert-16S-eDNAF1-R1 observeres en meget lav DNA-koncentration på 0,1 ng/ μ L, hvilket medfører at disse prøver ikke medtages når der multiplexes. Yderligere tilføjes der mindre end de ønskede 50 fmol ved multiplexing for VO10, SN50, SN30 og SN10 amplificeret med BF3-BR2, SN100, SN45 og SN25 amplificeret med Vert-16S-eDNAF1-R1 samt VN20, SN20, SN5, SO10 og SO25 amplificeret med både BF3-BR2 og Vert-16S-eDNAF1-R1. For SO50 blev der tilføjet mindre end 50 fmol for alle fire PCR-reaktioner.

Ud fra rarefractionkurven på figur 4.1 ses det, at sekventeringen har været tilstrækkelig, da kurven når at knække inden sekventeringen stopper. Bemærk at der for VN75 og VN10 identificeres væsentligt flere OTU'er end for de resterende vandprøver. Da der arbejdes i et økosystem med høj diversitet og der amplificeres med fire universelle primersæt, forventes der ikke en asymptotisk rarefactionkurve.



Figur 4.1: Rarefactionkurve for henholdsvis vand- og sedimentprøver, der på x-aksen viser antal reads og på y-aksen viser antal observerede OTU'er.

4.2 Sammenligning af prøvetyper

Sammenlignes resultaterne fra vand- og sedimentprøver er det kun *Rhodoferax*, der er blandt de 10 mest abundante slægter, klassificeret til det lavest mulige taksonomiske niveau, for begge prøvetyper. Endvidere varierer den relative abundans af *Rhodoferax* afhængigt af prøvetypen, jævnfør Figur 4.2.



Figur 4.2: Heatmaps, hvor den bedst mulige taksonomi er vist, for de 10 mest abundante slægter identificeret i henholdsvis vandprøver (blå) og sedimentprøver (rød). Prøverne er sorteret således at de passer med prøvetagningsstrækningen, startende med 50 meter opstøms. Domæne er angivet med (E) for eukaryoter og (B) for bakterier.

En Goodnes of Fit (GoF)-test viser, at der er signifikant forskel mellem indholdet i vandog sedimentprøver (p = 0.001), hvilket understøttes af Figur 4.3, der illustrerer statistisk forskellighed mellem prøvetyperne, da de grupperes hver for sig. Aksernes vægtning i PCAplottet er illustreret i et screeplot i Bilag D.1. Som konsekvens af den statistiske forskel vil de respektive prøvetyper fremadrettet blive behandlet hver for sig.



Figur 4.3: PCA plot, der illutrerer den statistiske forskel mellem vand- og sedimentprøverne.

4.3Alfa- og beta-diversitet

Der er udregnet Shannon-indeks, som mål for alfa-diversiteten, for samtlige prøver. $\frac{\text{Shannon-indeks}}{\ln(\text{Antal OTU})}$, hvor der er korrigeret for Endvidere er der udregnet evenness, som variationen i antallet af OTU'er, der er identificeret per prøve. Begge resultater er illustreret i Bilag C.1. Gennemsnitsværdierne for henholdsvis antallet af OTU'er, Shannon-indeks og evenness for vand- og sedimentprøver, både opstrøms og nedstrøms, er præsenteret i Tabel 4.1.

vand- og sedimentprøver, opdelt i prøver taget henholdsvis opstrøms og nedstrøms.				
Prøvetype	Gns. antal OTU'er	Gns. Shannon-indeks	Gns. evenness	

Tabel 4.1: Viser gennemsnitsværdierne for antallet af OTU'er, Shannon-indeks og evennes for

Vand opstrøms	1885	5,71	0,76
Vand nedstrøms	2299	6,22	0,80
Sediment opstrøms	2750	6,34	0,80
Sediment nedstrøms	3047	6,41	0,80
		•	•

Der er ved one-way ANOVA testet for signifikante forskelle i middelværdien for Shannonindeks og evenness, mellem prøver indsamlet henholdsvis opstrøms og nedstrøms. De udregnede p-værdier er illustreret i Tabel 4.2.

Tabel 4.2: Resultater, i form af p-værdier, fra one-way ANOVA, der tester om der er signifikant forskel i henholdsvis Shannon-indekset og evenness mellem variablene i første kollonne i tabellen. Den grønne farve angiver at der er signifikant forskel mellem de pågældende variable ($p \le 0.05$).

Variable	p-værdi (Shannon)	p-værdi (evenness)
Opstrøms-nedstrøms (vand)	0,018	0,0054
Opstrøms-nedstrøms (sediment)	0,80	1

Der ses for vandprøverne en signifikant forskel i Shannon-indeks og evenness opstøms og nedstrøms. For sedimentprøverne er der ingen signifikant forskel i Shannon-indeks eller evenness opstrøms og nedstrøms. Dette illustreres grafisk på Figur 4.4, der viser udviklingen i Shannon-indeks gennem prøvetagningsstrækningen for både vand- og sedimentprøver. Fra Tabel 4.1 og Figur 4.4(a) kan det udledes, at Shannon-indekset er signifikant højere nedstrøms end opstrøms for vandprøverne.



Figur 4.4: Scatterplot, der illustrerer udviklingen i Shannon-indekset gennem den undersøgte strækning i vandløbet for henholdsvis vandprøver (a) og sedimentprøver (b). Prøverne er sorteret således at de passer med prøvetagningsstrækningen, startende med 50 meter opstøms. Den vertikale linje adskiller opstrøms og nedstrøms.

Da prokaryoter udgør 67% af de observerede OTU'er i datasættet, og derfor bidrager meget til udregningen af Shannon-indeks, vil der undersøges for udviklingen i Shannonindeks i et datasæt, hvor archaea og bakterier er udeladt. Data er illustreret i Bilag C.2. Gennemsnitsværdierne for henholdsvis antallet af OTU'er, Shannon-indeks og evenness for vand- og sedimentprøver, for et datasæt uden prokaryote OTU'er, både opstrøms og nedstrøms, er præsenteret i Tabel 4.3.
Prøvetype	Gns. antal OTU'er	Gns. Shannon-indeks	Gns. evenness
Vand opstrøms	762	4,57	0,69
Vand nedstrøms	855	4,96	0,74
Sediment opstrøms	316	3,53	0,65
Sediment nedstrøms	736	4,32	0,66

Tabel 4.3: Viser gennemsnitsværdierne for antallet af OTU'er, Shannon-indeks og evennes for vand- og sedimentprøver opdelt i prøver taget henholdsvis opstrøms og nedstrøms. Udregnet fra datasæt, hvor prokaryoter er sorteret fra.

Der er ved one-way ANOVA testet for signifikante forskelle i middelværdien for Shannonindeks og evenness, mellem prøver indsamlet henholdsvis opstrøms og nedstrøms. De udregnede p-værdier er illustreret i Tabel 4.4.

Tabel 4.4: Resultater, i form af p-værdier, til one-way ANOVA, der tester om der er signifikant forskel i henholdsvis Shannon-indekset og evenness mellem variablene i første kollonne i tabellen, hvor prokaryoter er udeladt fra datasættet. Den grønne farve angiver at der er signifikant forskel mellem de pågældende variable ($p \le 0.05$).

Variable	p-værdi (Shannon)	p-værdi (Evenness)
Opstrøms-nedstrøms (vand)	0,0037	0,0011
Opstrøms-nedstrøms (sediment)	0,013	0,95

Der ses for både vand- og sedimentprøverne en signifikant forskel i Shannon-indeks opstrøms og nedstrøms. Evenness er ligeledes signifikant forskelligt for vandprøverne, men ikke for sedimentprøverne. Dette kan skyldes den store variation i antallet af læste OTU'er for sedimentprøverne, illustreret i Bilag C.2. Udviklingen i Shannon-indeks gennem prøvetagningsstrækningen for både vand- og sedimentprøver er illustreret grafisk på Figur 4.5, der sammen med Tabel 4.4 viser at Shannon-indekset er signifikant højere nedstrøms end opstrøms for begge prøvetyper.



Figur 4.5: Scatterplot, der illustrerer udviklingen i Shannon-indekset gennem den undersøgte strækning i vandløbet for hendholdsvis vandprøver (a) og sedimentprøver (b), hvor prokaryoter er sorteret fra. Prøverne er sorteret således at de passer med prøvetagningsstrækningen, startende med 50 meter opstøms. Den vertikale linje adskiller opstrøms og nedstrøms.

Yderligere ses en tendens til en positiv korrelation mellem Shannon-indeks og afstanden fra udledningspunktet nedstrøms for vandprøverne, hvor Shannon-indekset for sedimentprøverne er mere tilfældigt fordelt.

Til vurdering af den biologiske variation prøverne imellem, er der udregnet betadiversitet ved Bray-Curtis, for et datasæt hvor prokaryoter igen indgår, og de eksakte værdier for beta-diversiteterne er præsenteret i Bilag C.3.1 og Bilag C.3.2. Der ses en biologisk variation ved sammenligning af prøver taget henholdsvis opstrøms og nedstrøms. Dette er illustreret i Figur 4.6, hvor afstanden prøverne imellem er baseret på betadiversiteten. Det bemærkes at prøver indsamlet henholdsvis opstrøms, nedstrøms og ved udledningspunktet grupperes hver for sig, hvilket indikerer en forskel i det biologiske indhold mellem indsamlingslokaliteterne. Forskellen, testet ved en GoF-test, er signifikant for sedimentprøverne (p = 0,009), men ikke for vandprøverne (p = 0,29).



Figur 4.6: NMDS plot, baseret på Bray-Curtis, der illustrerer forskellen i det biologiske indhold opstrøms, nedstrøms og ved udledningspunktet for henholdsvis vand- og sedimentprøver. Stress-værdierne er 0,024 for vandprøverne og 0,15 for sedimentprøverne.

4.4 Analyse af biologiske samfund

For at bestemme den optimale prøvetagningsafstand fra udledningspunktet til estimering af effekten herfra, betragtes heatmaps, der illustrerer den bedst mulige taksonomiske klassificering for de 10 mest abundante slægter indenfor henholdsvis archaea, bakterier, eukaryoter og invertebrater for hver prøvetagningslokation.

Nitrososphaeraceae -	50	18.2	33.3	20	40.5	9.1	11.1	12.5	16.7	26.1	20	Polynucleobacte	er- 20	.4 12	.2 15.8	8.1	1	9.8	14.9	5.3	3.7	0.7	6.9
Woesearchaeales -	50	18.2	11.1	20	9.5	0	11.1	25	50	8.7	30	Rhodofera	IX - 11	.9 7.	16	6.8	1.6	12.7	5.6	10.2	8.7	2.3	7.2
Methanobacterium -	0	18.2	5.6	10	9.5	9.1	22.2	25	0	8.7	0	Flavobacteriur	m - 2.	4 4	4.3	4.8	2.8	4	4.6	4.2	3.5	2.5	3.9
Methanosaeta -	0	9.1	5.6	0	0	18.2	5.6	12.5	33.3	8.7	10	Crenothri	i x - 3.	34.	2 4.5	2.7	0.3	2	4.5	2.4	5.8	0.4	3.5
Methanobrevibacter -	0	18.2	16.7	0	4.8	27.3	11.1	0	0	6.5	10	Chloroplas	st - 1.	2 3	2.2	2.7	3.9	1.1	1.8	1.7	3.4	2.1	1.8
Nitrosarchaeum -	0	9.1	5.6	20	4.8	0	11.1	12.5	0	4.3	10	Prevotell	la - 2	2.	8 2.6	3.1	0.1	2	3.3	2	2.3	0	2.3
Methanosarcina -	0	9.1	5.6	0	9.5	27.3	0	0	0	15.2	0	Acidovora	IX - 3.	7 2	1.6	1.5	0.8	2.5	1.6	1.8	1.1	0.9	1.7
Methanoregula -	0	0	0	0	4.8	0	11.1	12.5	0	6.5	10	Dechloromona	IS - 0.	60.	6 0.3	1.2	1.8	1.9	0.7	1.3	1.1	2.4	1.5
AR15-	0	0	0	10	4.8	0	5.6	0	0	4.3	10	Bacteroide	IS- 1	1.	7 1.8	2	0.1	1.2	1.3	1	1.6	0.1	1.3
Nitrosotaleaceae -	0	0	5.6	10	2.4	0	5.6	0	0	2.2	0	Aeromona	IS - 1.	7 1.	8 1.5	1.6	0	1.1	1.6	1	1.4	0	1.1
	V050	V025	V010	-ON	VN10	VN20	VN30	VN40	VN50	VN75	VN100		VOSO	VO25	V010-	N0	VN10	VN20	VN30	VN40	VN50	VN75	VN100
(a) Archaea								(1	o) E	Bakt	eriei	:											
Chlamydomonas	- 37.3	2 34.9	9 27.1	28.9	21.7	25.5	27.7	22.3	25.6	21.8	27.9	Cyclops -	38.5	35.6	59.7	16.1	14	35	51	45.7	7.7	40.7	24.6
Chlamydomonas	- 37.: - 15.:	2 34.9 7 16.5	9 27.1 5 12.1	28.9 13	21.7 9.2	25.5	27.7	22.3 10.5	25.6 11.5	21.8 8.6	27.9	Cyclops - Simulium -	38.5 7.7	35.6 37.3	59.7 9.2	16.1 54.8	14 76.2	35 15	51 2	45.7 22.9	7.7 53.8	40.7	24.6 31.6
Chlamydomonas Chlamydomonadaceae Mallomonas	- 37.: - 15.: - 4.3	2 34.9 7 16.5 3 5.5	 27.1 12.1 7.7 	28.9 13 3.6	21.7 9.2 3	25.5 12 6.7	27.7 13.1 6.4	22.3 10.5 4.1	25.6 11.5 1.7	21.8 8.6 4.8	27.9 12.2 4.9	Cyclops - Simulium - Asellus -	38.5 7.7 26.9	35.6 37.3 15.3	59.7 9.2 6.7	16.1 54.8 6.5	14 76.2 4.2	35 15 15	51 2 15.7	45.7 22.9 14.3	7.7 53.8 15.4	40.7 22.2 11.1	24.6 31.6 22.8
Chlamydomonas Chlamydomonadaceae Mallomonas Chlorophyceae	- 37.: - 15.: - 4.3 - 5.3	2 34.9 7 16.5 8 5.5 8 5.7	9 27.1 5 12.1 6 7.7 4.3	28.9 13 3.6 4.5	21.7 9.2 3 3.3	25.5 12 6.7 4.7	27.7 13.1 6.4 3.4	22.3 10.5 4.1 3.9	25.6 11.5 1.7 4.3	21.8 8.6 4.8 4	27.9 12.2 4.9 4.6	Cyclops - Simulium - Asellus - Sminthuridae -	38.5 7.7 26.9 3.8	35.6 37.3 15.3 5.1	59.7 9.2 6.7 5.9	16.1 54.8 6.5 6.5	14 76.2 4.2 1.4	35 15 15 20	51 2 15.7 3.9	45.7 22.9 14.3 2.9	7.7 53.8 15.4 15.4	40.7 22.2 11.1 7.4	24.6 31.6 22.8 1.8
Chlamydomonas Chlamydomonadaceae Mallomonas Chlorophyceae Sparganium	- 37.: - 15.: - 4.3 - 5.3 - 0	2 34.9 7 16.5 8 5.5 8 5.7 0.1	 27.1 12.1 7.7 4.3 0 	28.9 13 3.6 4.5 2.8	21.7 9.2 3 3.3 0.1	25.5 12 6.7 4.7 3.5	27.7 13.1 6.4 3.4 11.4	22.3 10.5 4.1 3.9 7.3	25.6 11.5 1.7 4.3 0.4	21.8 8.6 4.8 4 0.1	27.9 12.2 4.9 4.6 0.1	Cyclops - Simulium - Asellus - Sminthuridae - Daphnia -	38.5 7.7 26.9 3.8 7.7	35.6 37.3 15.3 5.1 3.4	59.7 9.2 6.7 5.9 5.9	16.1 54.8 6.5 6.5 6.5	14 76.2 4.2 1.4 0	35 15 15 20 0	51 2 15.7 3.9 5.9	45.7 22.9 14.3 2.9 0	7.7 53.8 15.4 15.4 0	40.7 22.2 11.1 7.4 5.6	24.6 31.6 22.8 1.8 7
Chlamydomonas Chlamydomonadaceae Mallomonas Chlorophyceae Sparganium Paraphysomonas	- 37.: - 15.: - 4.3 - 5.3 - 0 - 0.8	2 34.9 7 16.5 8 5.5 8 5.7 0.1 8 0.9	 27.1 12.1 7.7 4.3 0 1.2 	28.9 13 3.6 4.5 2.8 1.4	21.7 9.2 3 3.3 0.1 2.8	25.5 12 6.7 4.7 3.5 3.1	27.7 13.1 6.4 3.4 11.4	22.3 10.5 4.1 3.9 7.3 2.7	25.6 11.5 1.7 4.3 0.4 2.5	21.8 8.6 4.8 4 0.1 2.4	27.9 12.2 4.9 4.6 0.1 1.7	Cyclops - Simulium - Asellus - Sminthuridae - Daphnia - Itunella -	38.5 7.7 26.9 3.8 7.7 0	35.6 37.3 15.3 5.1 3.4 0	 59.7 9.2 6.7 5.9 5.9 2.5 	16.1 54.8 6.5 6.5 6.5 3.2	14 76.2 4.2 1.4 0 0.7	35 15 15 20 0 5	51 2 15.7 3.9 5.9 5.9	45.7 22.9 14.3 2.9 0 2.9	7.7 53.8 15.4 15.4 0	40.7 22.2 111.1 7.4 5.6 5.6	24.6 31.6 22.8 1.8 7 3.5
Chlamydomonas Chlamydomonadaceae Mallomonas Chlorophyceae Sparganium Paraphysomonas Cryptomonas	- 37.: - 15.: - 4.3 - 5.3 - 0 - 0.8 - 1.6	2 34.9 7 16.5 8 5.5 8 5.7 0.1 8 0.9 8 2.2	 27.1 12.1 7.7 4.3 0 1.2 1.9 	28.9 13 3.6 4.5 2.8 1.4 2.1	21.7 9.2 3 3.3 0.1 2.8 1	25.5 12 6.7 4.7 3.5 3.1 1.8	27.7 13.1 6.4 3.4 11.4 1.4 1.9	22.3 10.5 4.1 3.9 7.3 2.7 1.5	25.6 11.5 1.7 4.3 0.4 2.5 3.1	21.8 8.6 4.8 0.1 2.4 1.7	27.9 12.2 4.9 4.6 0.1 1.7 2.1	Cyclops - Simulium - Asellus - Sminthuridae - Daphnia - Itunella - Rhyacophila -	38.5 7.7 26.9 3.8 7.7 0 0	35.6 37.3 15.3 5.1 3.4 0 0	 59.7 9.2 6.7 5.9 5.9 2.5 0 	16.1 54.8 6.5 6.5 3.2 6.5	14 76.2 4.2 1.4 0 0.7 2.1	35 15 15 20 0 5 0	51 2 15.7 3.9 5.9 5.9 0	45.7 22.9 14.3 2.9 0 2.9 8.6	7.7 53.8 15.4 0 0 0	40.7 22.2 11.1 7.4 5.6 5.6 1.9	24.6 31.6 22.8 1.8 7 3.5 3.5
Chlamydomonas Chlamydomonadaceae Mallomonas Chlorophyceae Sparganium Paraphysomonas Cryptomonas Gasterosteus	- 37.3 - 15.3 - 4.3 - 5.3 - 0.8 - 0.8 - 1.6 - 2.8	2 34.9 7 16.5 8 5.5 8 5.7 0.1 8 0.9 8 2.2 8 0.9	 27.1 12.1 7.7 4.3 0 1.2 1.9 1 	28.9 13 3.6 4.5 2.8 1.4 2.1 4.3	21.7 9.2 3 3.3 0.1 2.8 1 0	25.5 12 6.7 4.7 3.5 3.1 1.8 0	27.7 13.1 6.4 3.4 11.4 1.4 1.9 1.7	22.3 10.5 4.1 3.9 7.3 2.7 1.5 2.2	25.6 11.5 1.7 4.3 0.4 2.5 3.1 1.3	21.8 8.6 4.8 0.1 2.4 1.7 2.3	27.9 12.2 4.9 4.6 0.1 1.7 2.1 2.7	Cyclops - Simulium - Asellus - Sminthuridae - Daphnia - Itunella - Rhyacophila - Tropocyclops -	38.5 7.7 26.9 3.8 7.7 0 0 0 7.7	35.6 37.3 15.3 5.1 3.4 0 0 1.7	59.7 9.2 6.7 5.9 5.9 2.5 0 2.5	16.1 54.8 6.5 6.5 3.2 6.5 0	14 76.2 4.2 1.4 0 0.7 2.1 0	35 15 20 0 5 0 0	51 2 15.7 3.9 5.9 5.9 0 5.9	45.7 22.9 14.3 2.9 0 2.9 8.6 0	7.7 53.8 15.4 15.4 0 0 0	40.7 22.2 11.1 7.4 5.6 5.6 1.9 0	24.6 31.6 222.8 1.8 7 3.5 3.5 1.8
Chlamydomonas Chlamydomonadaceae Mallomonas Chlorophyceae Sparganium Paraphysomonas Cryptomonas Gasterosteus Synura	- 37.3 - 15.3 - 4.3 - 5.3 - 0 - 0.8 - 1.6 - 2.8 - 1.9	2 34.9 7 16.5 3 5.5 0.1 0.9 3 0.9 4 0.9 5 2.2 3 0.9 4 0.9	 27.1 12.1 7.7 4.3 0 1.2 1.9 1 2.9 	28.9 13 3.6 4.5 2.8 1.4 2.1 4.3 2.1	21.7 9.2 3 3 3.3 0.1 2.8 1 0 1	25.5 12 6.7 3.5 3.1 1.8 0 2.1	27.7 13.1 6.4 3.4 11.4 1.9 1.7 1.6	222.3 10.5 4.1 3.9 7.3 2.7 1.5 2.2 1.4	25.6 11.5 1.7 4.3 0.4 2.5 3.1 1.3 0.7	21.8 8.6 4.8 4. 0.1 2.4 1.7 2.3 1.4	27.9 12.2 4.9 4.6 0.1 1.7 2.1 2.1 1.1	Cyclops - Simulium - Asellus - Sminthuridae - Daphnia - Itunella - Rhyacophila - Tropocyclops - Candona -	38.5 7.7 26.9 3.8 7.7 0 0 7.7 7.7	35.6 37.3 15.3 5.1 3.4 0 0 1.7	59.7 9.2 6.7 5.9 5.9 2.5 0 2.5 2.5 2.5	16.1 54.8 6.5 6.5 6.5 6.5 6.5 0 0	14 76.2 4.2 1.4 0 0.7 2.1 0 0.7	35 15 20 0 5 0 0 0 5	51 2 15.7 3.9 5.9 5.9 0 5.9 2	45.7 22.9 14.3 2.9 0 2.9 8.6 0 0	7.7 53.8 15.4 0 0 0 0 0	40.7 22.2 111.1 5.6 5.6 1.9 0 3.7	24.6 31.6 22.8 1.8 7 3.5 3.5 1.8 0
Chlamydomonas Chlamydomonadaceae Mallomonas Chlorophyceae Sparganium Paraphysomonas Cryptomonas Gasterosteus Synura Pungitius	- 37.3 - 15.3 - 4.3 - 5.3 - 0.8 - 0.8 - 1.6 - 2.8 - 1.9 - 2.1	2 34.5 7 16.5 3 5.5 0.1 0.9 3 0.2 3 0.9 4 0.9 5 2.2 10 2.1 11.3 1.3	27.1 12.1	28.9 13 3.6 4.5 2.8 1.4 2.1 4.3 2.1 1.8	21.7 9.2 3 3 3.3 0.1 2.8 1 0 1 0	25.5 12 6.7 3.5 3.1 1.8 0 2.1	27.7 13.1 6.4 3.4 11.4 1.9 1.7 1.6 2.1	2223 10.5 4.1 3.9 7.3 2.7 1.5 2.2 1.4 1.5	25.6 11.5 1.7 4.3 0.4 2.5 3.1 1.3 0.7 3.7	21.8 8.6 4.8 4. 0.1 2.4 1.7 2.3 1.4 1.1	27.9 12.2 4.9 4.6 0.1 1.7 2.1 2.7 1.1 2.8	Cyclops - Simulium - Asellus - Sminthuridae - Daphnia - Itunella - Rhyacophila - Tropocyclops - Candona - Strandesia -	38.5 7.7 26.9 3.8 7.7 0 7.7 0 7.7 0 3.8	35.6 37.3 15.3 5.1 3.4 0 0 1.7 1.7	59.7 9.2 6.7 5.9 5.9 2.5 0 2.5 2.5 3.4	16.1 54.8 6.5 6.5 6.5 6.5 6.5 0 0	14 76.2 4.2 1.4 0 0.7 2.1 0 0.7 0.7	35 15 20 0 5 0 0 5 0	 51 2 15.7 3.9 5.9 6.9 6.9 2 0 . 	45.7 22.9 14.3 2.9 0 2.9 8.6 0 0 0 0 2.9	7.7 53.8 15.4 15.4 0 0 0 0 0 0	40.7 22.2 11.1 5.6 5.6 1.9 0 3.7 0	24.6 31.6 22.8 1.8 7 3.5 3.5 1.8 0 0
Chlamydomonas Chlamydomonadaceae Mallomonas Chlorophyceae Sparganium Paraphysomonas Cryptomonas Gasterosteus Synura Pungitius	- 37.1 - 15.1 - 4.3 - 5.3 - 0.8 - 0.8 - 1.6 - 2.8 - 1.9 - 2.1 - 2.1 - 0.0	2 34.9 7 16.5 8 5.5 0.1 0.9 2 2.2 10 0.9 2 1.3 10 1.3 10 1.3	P 27.1 5 12.1 6 7.7 4.3 0 0 1.2 1.2 1.9 1.2 1.9 1.2 1.9 1.2 1.2 1.2 1.2 1.2 1.2 1.2 1.2	28.9 13 3.6 4.5 2.8 1.4 2.1 4.3 2.1 1.8 2.1 1.8	21.7 9.2 3 3.3 0.1 2.8 1 0 0 1 0 0 0	25.5 12 6.7 3.5 3.1 1.8 0 2.1 0 0 0200	27.7 13.1 6.4 3.4 11.4 1.9 1.7 1.6 2.1 .0000	22.3 10.5 4.1 3.9 7.3 2.7 1.5 2.2 1.4 1.5 .0000	25.6 11.5 1.7 4.3 0.4 2.5 3.1 1.3 0.7 3.7 3.7	21.8 8.6 4.8 4.1 2.4 1.7 2.3 1.4 1.1 1.1 2.2 0 2.3 1.4	27.9 12.2 4.9 4.6 0.1 1.7 2.7 1.1 2.8 2.8	Cyclops - Simulium - Asellus - Sminthuridae - Daphnia - Itunella - Rhyacophila - Tropocyclops - Candona - Strandesia -	38.5 7.7 26.9 3.8 7.7 0 7.7 7.7 0 3.8 3.8 5 0 9 0 9 0 9 0 9 0 9 0 9 0 9 0 9 0 9 0	35.6 37.3 15.3 5.1 3.4 0 0 1.7 0 1.7 20 50	997 92 6.7 5.9 2.5 0 2.5 3.4 00	16.1 54.8 6.5 6.5 6.5 0 0 0 0 0	14 76.2 4.2 1.4 0 0.7 2.1 0 0.7 0.7 0 0.7	35 15 20 0 5 0 5 0 5 0 0 5 0 0 0 0 5	51 2 15.7 5.9 6.9 6.9 2 0 6.9 0 0 0 0 0	45.7 22.9 14.3 2.9 2.9 8.6 0 2.9 0 2.9 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	7.7 53.8 15.4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	40.7 2222 11.1 5.6 1.9 0 3.7 0 \$25	24.6 31.6 22.8 1.8 3.5 3.5 1.8 0 0 0 0

Figur 4.7: Heatmaps, hvor den bedst mulige taksonomi er vist, for de 10 mest abundante slægter indenfor archaea, bakterier, eukaryoter og invertebrater identificeret i vandprøverne. Prøverne er sorteret således at de passer med prøvetagningsstrækningen, startende med 50 meter opstøms.

Figur 4.7 viser en tendens til, at abundansen af de hyppigst identificerede slægter i vandprøverne, klassificeret til lavest mulige taksonomiske niveau, falder for både bakterier og invertebrater 10 meter nedstrøms for udledningspunktet, pånær for *Simulium*. Det bemærkes at *Sparganium* stort set ikke bliver identificeret opstrøms, mens den relative abundans stiger indtil 30 meter nedstrøms, hvorefter den igen falder. Modsat ses der er høj relativ abundans af slægterne *Daphnia* og *Tropocyclops* opstrøms, som falder efter udledningspunktet. Foruden dette ses intet generelt mønster i udviklingen af abundansen opstrøms og nedstrøms.



Figur 4.8: Heatmaps, hvor den bedst mulige taksonomi er vist, for de 10 mest abundante slægter indenfor archaea, bakterier, eukaryoter og invertebrater identificeret i sedimentprøverne. Prøverne er sorteret således at de passer med prøvetagningsstrækningen, startende med 50 meter opstøms.

Figur 4.8 illustrerer en umiddelbar tilfældig fordeling, både opstrøms og nedstrøms, af abundansen for de 10 mest abundante slægter i sedimentprøverne, klassificeret til lavest mulige taksonomiske niveau. Det bemærkes dog at slægten *Navicula* samt ordnerne Cymbellales og Chloroplast har en højere relativ abundans før udledningspunktet.

Der er ved GoF-test testet for signifikant forskellighed mellem de biologiske samfund opstrøms og nedstrøms for vand- og sedimentprøver. Der var ingen signifikante forskelle, hvilket også er illustreret i Figur 4.9(a), 4.9(b), 4.9(c), 4.9(f), 4.9(g) og 4.9(h), da opstrøms og nedstrøms grupperes oveni hinanden. Der ses en opdeling mellem opstrøms og nedstrøms i Figur 4.9(d) og 4.9(e), dog er forskellene ikke signifikante for hverken bakterier i sediment (p = 0,066) eller eukaryoter i vand (p = 0,15). Aksernes vægtning i PCA-plottene er illustreret i screeplots i Bilag D.2.



Figur 4.9: PCA-plots, der illustrerer forskellene i de biologiske samfund opstrøms og nedstrøms for både vand- og sedimentprøver, opdelt i archaea, bakterier, eukaryoter og invertebrater.

Diskussion 5

Til diskussionen anvendes heatmaps på slægtsniveau, hvor den bedst mulige taksonomiske klassifisering af en OTU anvendes. Derfor vil diskussionen af heatmaps i nogle tilfælde behandle en højere taksonomisk klassifisering, eksempelvis klasse og orden, som slægt. Endvidere er der 810 OTU'er, der ikke har fået tildelt taksonomi, hvilket kan betyde, at den relative abundans, der vises i heatmaps, havde været anderledes, hvis alle OTU'er havde fået tildelt taksonomi. Det kan ligeledes betyde, at der er nogle slægter, der ikke fremgår i heatmaps. Generelt vil tildelingen af fuld taksonomi til alle OTU'er, i forbindelse med eDNA-analyser være umuligt, da databaserne er ufuldkomne, samt at nogle arter ikke kan skelnes fra hinanden på baggrund af korte DNA-sekvenser, som udnyttes i dette projekt. Yderligere kan flere forskellige arter indgå i samme OTU, når der arbejdes med OTU'er, der samler sekvenser med $\geq 97\%$ lighed.

5.1 Forskel på vand- og sedimentprøver

Det forventes at artsdiversiteten mellem de indsamlede vand- og sedimentprøver varierer. Figur 4.2 illustrerer de 10 mest abundante slægter identificeret i henholdsvis vand- og sedimentprøverne, hvoraf kun en er at finde for begge prøvetyper, nemlig Rhodoferax. Det bemærkes også, at slægten ikke har samme placering i de to heatmaps, hvilket tyder på, at der er forskel på de biologiske samfund, der eksisterer i henholdsvis vandsøjlen og sedimentet. Dette var også forventet, da der er forskel på hvilke organismer, der lever i vandsøjlen og i sedimentet. Yderligere bevares DNA længere i sedimentet end i vandsøjlen, hvor det transporteres med strømretningen, og ikke er beskyttet mod nedbrydning fra eksempelvis ekstracellulære nukleaser [Barnes et al., 2014]. For at svare på om det er forskellige arter, der identificeres i vand- og sedimentprøverne, ville et heatmap over identificerede arter være optimalt. Dog er det ikke alle OTU'er, der kan bestemmes til artsniveau, hvorfor det illustreres med heatmaps på slægtsniveau, hvor den bedst mulige taksonomiske klassificering er vist. Generelt er det en udfordring at bestemme OTU'er til art ved denne slags undersøgelser, da databaserne for sekventerede genomer er ufuldkomne. Typisk anvendes der, ligesom i dette projekt, gensekvenser, der koder for eksempelvis 16S rRNA og COI, der ikke præcist kan klassificere alle sekvenser til artsniveau [Beng og Corlett, 2020]. Desuden er der stadig ukendte organismer, og der opstår hele tiden nye arter grundet mutationer, hvilket går specielt hurtigt for mikroorganismer med korte generationstider, hvorfor en database aldrig vil blive fuldkommen [Fraser et al., 2007].

Til at illustrere forskellen mellem vand- og sedimentprøverne, på baggrund af de identificerede OTU'er, betragtes Figur 4.3, der sammen med en GoF-test bekræfter, at der er signifikant forskel på prøvetyperne, hvorfor hypotese 4 omhandlende forskellen på de to prøvetyper bekræftes. Dette var ligeledes forventet, da DNA har forskellig nedbrydningstid og opholdstid i henholdsvis vand og sediment. Som konsekvens heraf vil vandprøverne give et øjebliksbillede af biodiversiteten i vandløbet og sedimentprøverne vil afsløre tendensen for biodiversiteten for en længere periode. Det betyder, at biodiversiteten i prøvetagningsperioden har afviget fra perioden inden prøvetagningen, hvilket understøttes af, at prøvetagningsperioden for DVFI går fra 1. februar til 30. april, hvor makroinvertebraterne findes i voksenstadiet [Wiberg-Larsen, 2011]. En organismes størrelse påvirker mængden af eDNA der afgives, og derved den detekterede biodiversitet.

5.2 Biodiversitet

Det var forventet at biodiversiteten ville være lavere nedstrøms end opstrøms fra udledningspunktet, da DVFI viste et tilsvarende mønster. Det rensede spildevand, der introduceres i Spegerborgrenden vil indeholde næringsstoffer, på trods af en biologisk rensning [DinGeo - Boliga, 2023]. Det estimeres, at 50 - 60% af vandføringen efter udledningspunktet består af renset spildevand [Gørtz, 2023]. Derfor forventes det, at mere næringstolerante arter vil dominere nedstrøms, og at nogle af de mere sensitive arter vil blive udkonkurreret grundet næringsforureningen, hvilket vil forringe biodiversiteten. Dog viser Figur 4.4(a) og Tabel 4.2, at biodiversiteten, udregnet ved Shannon-indekset, i vandsøjlen er signifikant højere nedstrøms, og Figur 4.4(b) og Tabel 4.2 viser, at udledningen ikke påvirker biodiversiteten i sedimentet. Resultatet for vandprøverne skyldes sandsynligvis, at der fra udledningspunktet tilføres store mængder bakterier eller DNA herfra, da disse udnyttes til biologisk rensning af spildevand [Nielsen et al., 2010]. At samme tendens ikke ses for sedimentprøverne, kan skyldes at strømretningen kan skifte, hvorfor bakterierne vil blive ledt i modsatte retning. Når strømretningen skifter tilbage, vil DNA i vandsøjlen ledes nedstrøms, hvorfor det ikke længere kan detekteres opstrøms. Nogle DNA-molekyler vil derimod bindes i sedimentet, hvor nedbrydningstiden er længere, hvilket understøtter forklaringen om at DNA fra disse bakterier potentielt kan detekteres i længere tid her [Barnes et al., 2014]. En undersøgelse af fire renseanlæg i Danmark viser en gennemsnitlig artsrigdom på 2150 bakterielle arter i bassiner, hvor der foregår biologisk rensning [Peces et al., 2022]. Da det rensede spildevand sandsynligvis vil indeholde nogle af disse bakterier, eller DNA herfra, kan det øge den samlede biodiversitet nedstrøms, hvorfor der er undersøgt for udviklingen i biodiversiteten, hvis prokaryoter udelades fra datasættet. Figur 4.5 og Tabel 4.4 viser dog stadig en signifikant højere biodiversitet nedstrøms sammenlignet med opstrøms i både vandsøjle og sediment, på trods af udeladelse af prokaryote OTU'er. Derfor afkræftes hypotese 2 om, at biodiversiteten er højere opstrøms end nedstrøms. Dette kan skyldes, at biodiversiteten i forvejen er påvirket af et udslip fra et overløbsbygværk uden bassin (Magleby Ravnemark) cirka 700 meter opstrøms fra udledningspunktet fra Skælskør renseanlæg [Danmarks Arealinformation - Danmarks miljøportal, 2023]. Desuden er vandløbet, som det fremgår af Figur 3.1, udrettet og manglen på snoede forløb gør vandløbet meget homogent. Dette begrænser mængden af forskellige nicher, hvilket også kan være en del af forklaringen på det lave DVFI på 2-3. Dog viser en uparret t-test, at der i løbet af de seneste 10 år er signifikant forskel på det gennemsnitlige DVFI opstrøms (3,33) og nedstrøms (2,95) [Miljødata - Danmarks miljøportal, 2023]. Samme test viser, at der ikke er signifikant forskel på andelen af arter fra positive diversitetsgrupper identificeret opstrøms og nedstrøms, men at signifikant flere arter fra negative diversitetsgrupper er identificeret nedstrøms. Dette tyder på at invertebrater, med forskellige nicher kan trives i forholdene nedstrøms fra udledningspunktet, hvilket også kan gøre sig gældende for andre organismegrupper.

Lokationen af vandløbet kan også påvirke diversiteten af arter, der lever heri. Samtlige målepunkter, både opstrøms og nedstrøms, i dette projekt lå op af en mark, hvor der potentielt kan være gødet og vandløbet kan være påvirket af næringsstoffer herfra. På den anden side af vandløbet ligger en trafikkeret vej, der sandsynligvis er blevet saltet op til prøvetagningstidspunktet, hvilket kan påvirke saliniteten i vandløbet. Desuden udløber Spegerborgrenden i et marint miljø, hvilket også kan påvirke saliniteten. Dette kan ligeledes påvirke artssammensætningen i vandløbet, da der i nærheden af udløbet til tider vil være salt- eller brakvand, hvorfor der sandsynligvis vil detekteres flere salttolerante arter her. Samlet set kan påvirkningen fra opstrøms udslip, saltslag, lokation og udretning være stor nok til, at effekten fra Skælskør Renseanlæg ikke kan påvises ved undersøgelser med eDNAteknikker.

For at undersøge om biodiversiteten er positivt korreleret med afstanden til renseanlægget betragtes Figur 4.5(a), der umiddelbart bekræfter korrelationen, da der ses en tydelig stigning i Shannon-indekset fra VN10 til VN75. Dog er der ikke lavet nogle gentagelser af forsøget, hvorfor der ikke kan laves en test, der definitivt kan be- eller afkræfte om stigningen er signifikant. For sedimentprøverne i Figur 4.5(b) ses der intet mønster i Shannon-indeksets udvikling henover prøvetagningsstrækningen, hvorfor biodiversiteten ikke er korreleret med afstanden til udledningspunktet for sedimentprøverne. Det var forventet, at biodiversiteten ved udledningspunktet ville falde, hvorefter effekten gradvist ville forsvinde, og biodiversiteten ville vende tilbage til udgangspunktet. På baggrund af resultaterne kan hypotese 1, omhandlende biodiversitetens positive korrelation med afstanden til udledningspunktet hverken be- eller afkræftes.

5.3 Mikrobielle samfund

Da Skælskør renseanlæg udleder næringsstoffer til Spegerborgrenden, forventes det, at der er forskel på hvilke mikroorganismer, der trives henholdsvis opstrøms og nedstrøms for udledningspunktet.

Betragtes Figur 4.7(b) ses det, at abundansen for mange af slægterne falder ved VN10, hvorefter den stabiliseres igen indtil VN75, hvor abundansen igen falder. Rarefractionkurven på Figur 4.1 viser for vandprøverne to kurver, tilhørende VN10 og VN75, hvor der er observeret flere OTU'er end for de resterende prøver. Det påvirker den relative abundans, som er den, der er illustreret i Figur 4.7(b), hvilket kan forklare udsvingene ved disse prøvetagningslokationer. Ifølge Figur 4.7(a) følger abundansen af archaea-slægterne intet generelt mønster i vandprøverne. Yderligere illustrerer PCAplottene på Figur 4.9(a) og 4.9(c), at der ikke er signifikant forskel på hvilke archaea og bakterielle OTU'er, der identificeres opstrøms og nedstrøms i vandprøverne, hvorfor Skælskør renseanlæg ikke påvirker artssammensætningen af de to domæner. Dette betyder, at det DNA fra archaea og bakterier, der bliver tilført fra renseanlægget, sandsynligvis allerede er i vandløbet, eventuelt tilført fra udledningspunktet ved Magleby Ravnemark. For sedimentprøverne betragtes Figur 4.8(b), der viser at abundansen ikke varierer meget opstrøms og nedstrøms, pånær for Chloroplast, Acidovorax og Rhizobacter, der har en højere relativ abundans opstrøms. De OTU'er, der indgår i Chloroplast, er kun bestemt til orden, og denne orden hører under rækken Cyanobakterier, der i visse tilfælde har heterocyster, og derfor kan fiksere frit kvælstof [Tsygankov, 2007]. Dette giver ikke nødvendigvis en konkurrencemæssig fordel nedstrøms, hvis der konstant frigives kvælstof til vandløbet, hvilket kan forklare faldet i den relative abundans. For archaea viser Figur 4.8(a) intet generelt mønster i abundansen henholdsvis opstrøms og nedstrøms for udledningspunktet i sedimentprøverne. PCA-plottet i Figur 4.9(b) illustrerer, at der ikke er signifikant forskel på, hvilke archaea OTU'er, der identificeres opstrøms og nedstrøms. I Figur 4.9(d) grupperes prøverne opstrøms og nedstrøms hver for sig, baseret på bakterielle OTU'er, hvilket indikerer en forskel mellem hvilke bakterielle OTU'er, der identificeres opstrøms og nedstrøms i sedimentprøverne. Dette afkræftes dog af en GoF-test. Da der hverken ses signifikant forskel for archaea eller bakterier henholdvis opstrøms og nedstrøms i både vand- og sedimentprøverne afkræftes hypotese 3, omhandlende forskellen på de mikrobielle samfund opstrøms og nedstrøms.

Der skal dog tages hensyn, når mikroorganismers relative abundans sammenlignes i et heatmap, da de har forskellige antal kopier af 16S rRNA-genet, som i dette projekt anvendes til at identificere archaea og bakterier. Et studie, der undersøgte 1690 bakterielle genomer, fandt at 15% blot havde en kopi af 16S rRNA-genet og at 21% havde to kopier. Det var yderligere normalt med 3-7 kopier af genet, men sjældent med over syv. Det højeste antal kopier, der blev fundet var 15 [Větrovský og Baldrian, 2013]. Det betyder, at nogle bakterier afgiver op mod 15 gange så mange kopier af 16S rRNA-genet end andre, hvilket påvirker den relative abundans, der fremgår i et heatmap. Dog kan heatmaps udnyttes til at sammenligne abundansen af den samme slægt langs prøvetagningsstrækningen i vandløbet, da arter fra samme række ikke har stor variation i antallet af 16S rRNA genkopier [Větrovský og Baldrian, 2013]. Skulle der sammenlignes på tværs af slægter, ville det være nødvendigt med et kendskab til antallet af 16S rRNA gen-kopier i genomet. Yderligere er det vigtigt at prøverne i et heatmap har nogenlunde samme antal OTU'er, for at den relative abundans kan sammenlignes.

5.4 Optimering af prøvetagningsmetode

For at optimere prøvetagningsmetoden, er den øgede opløsning fra eDNA-teknikken blevet udnyttet til at søge efter nye indikator-slægter. Der er blevet søgt efter organismegrupper, der enten var højt repræsenteret op- eller nedstrøms, og som kunne bruges som indikator for graden af påvirkning fra Skælskør renseanlæg. Fra Afsnit 5.3 vides det, at der ikke er forskel på hvilke archaea og bakterier, der detekteres opstrøms og nedstrøms, hvilket også er tilfældet for eukaryoter og invertebrater, jævnfør Figur 4.9(e), 4.9(f), 4.9(g) og 4.9(h). Dog viser Figur 4.7(c), at Sparganium følger det eftersøgte mønster med en lav relativ abundans opstrøms, efterfulgt af en stigende relativ abundans nedstrøms, der opnår sit højeste ved VN30, hvorefter abundansen falder igen for vandprøverne.

Figur 4.8(c) viser at slægten *Navicula* både har en høj relativ abundans opstrøms og nedstrøms, dog mere varierende nedstrøms. Ordenen Cymbellales, viser høj relativ abundans opstrøms og faldende abundans nedstrøms. Både *Navicula* og Cymbellales er kiselalger, der flere steder i Europa anvendes som indikator-gruppe, når et vandløb skal tildeles en økologisk tilstand [Feio et al., 2009]. Da Cymbellales er en orden, hvor der indgår en bred vifte af arter, kan det ikke bestemmes om tilstedeværelsen er en positiv eller negativ indikation. Arter fra *Navicula*-slægten indikerer typisk et vandløb med højt næringsindhold, hvilket indikerer, at næringsindholdet i Spegerborgrenden allerede er højt inden udledningspunktet [Kelly et al., 2001]. Dette kan ligeledes forklare, hvorfor der ikke ses en signifikant forskel mellem de mikrobielle samfund opstrøms og nedstrøms.

Som beskrevet i Afsnit 5.3, har påvirkningen fra renseanlægget ikke en indvirkning på hvilke forskellige archaea og bakterielle OTU'er der detekteres. Derfor vil der ikke kunne bestemmes en optimal afstand fra udledningspunktet til prøvetagning, på baggrund af udviklingen i den relative abundans af specifikke slægter.

Betragtes beta-diversiteterne i Bilag C.3, vil der være prøvelokaliteter nedstrøms med høj beta-diversitet sammenlignet med prøvelokaliteterne opstrøms. Dette gør sig eksempelvis gældende for SN75, hvor den højeste beta-diversitet, i forhold til opstrøms, for sedimentprøverne er påvist. Dog varierer SN75 kun meget fra SO50 og mindre for de resterende opstrøms prøver, hvorimod SN100 generelt har høj beta-diversitet, når der sammenlignes med prøver opstrøms. For vandprøverne udregnes den højeste beta-diversitet for VN10 sammenlignet med de opstrøms prøvelokaliteter. Da en stor del af VN10 vil bestå af vand fra renseanlægget, vil VN75 være anbefalingen til prøvetagningslokation, da denne også har høj beta-diversitet, når der sammenlignes med opstrøms prøver. Både SN100 og VN75 varierer meget biologisk i forhold til prøverne taget opstrøms, hvilket bekræftes af Figur 4.6. Derfor vil det, baseret på beta-diversiterne, være 75 og 100 meter nedstrøms for henholdsvis vand- og sedimentprøver, der kan anbefales til at måle effekten af Skælskør renseanlæg. Valg af opstrøms prøvetagningslokation påvirker beta-diversiteten tilstrækkeligt lidt til, at det anbefales at tage prøverne det lettest tilgængelige sted i vandløbet, dog indenfor 10-50 meter opstrøms fra udledningspunktet.

Det er vigtigt at behandle vand- og sedimentprøver hver for sig, da de indeholder forskellige informationer. Vandprøverne giver et øjebliksbillede af biodiversiteten og sedimentprøverne giver indsigt i tilstanden af biodiversiteten over en længere periode.

Der kan ud fra resultaterne ikke opstilles en standardiserbar metode til vurdering af effekten af et udledningspunkt fra et renseanlæg ved hjælp af eDNA. Dette skyldes, at der ikke er målt en tydelig effekt fra spildevandsudledningen fra Skælskør renseanlæg til Spegerborgrenden. For at kunne foreslå en standardiserbar metode til denne slags undersøgelser, kræves flere gentagelser samt undersøgelser af flere forskellige vandløb, af varierende type, der også er påvirket af spildevandsudledning. Endvidere vil prøvetagningslokationerne afhænge af vandløbets flow, andelen af spildevand i vandføringen og eventuel temperaturpåvirkning fra udslippet. Dette understreger nødvendigheden af, at der skal undersøges vandløb af forskellig type og størrelse.

Konklusion 6

I dette projekt er det blevet undersøgt, hvordan eDNA-baserede metoder kan anvendes til at vurdere effekten fra et renseanlæg. Ved denne undersøgelse er det, modsat forventningen, fundet at udledningspunktet øger den totale biodiversitet, men effekten kan ikke alene tilskrives udledningspunktet, da det undersøgte vandløb er påvirket af en række andre faktorer. Der ses ingen tydelig korrelation mellem afstanden nedstrøms fra udledningspunktet og biodiversiteten. Dog er der en tendens til, at biodiversiteten i vandsøjlen er positivt korreleret med afstanden til udledningspunktet, hvis prokaryote OTU'er udelades fra datasættet. Der kan ikke påvises en signifikant forskel mellem de mikrobielle samfund opstrøms og nedstrøms, og ligeledes ses der ingen tydelige mønstre i heatmpas, hvorfor der ikke kan udvælges specifikke mikroorganismer, der kan fungere som indikator for graden af påvirkning.

I Spegerborgrenden anbefales det, på baggrund af beta-diversiteten, at tage vand- og sedimentprøver henholdsvis 75 og 100 meter nedstrøms, og prøven opstrøms det lettest tilgængelige sted 10-50 meter fra udledningspunktet. Det har dog ikke været muligt at anbefale standardiserede prøvetagningslokationer til at estimere påvirkningen af en udledning fra et renseanlæg, ved hjælp af eDNA-analyser. For at anbefale standardiserbare prøvetagningslokationer kræves flere gentagelser af undersøgelsen, både i det samme vandløb, men også i andre vandløb af varierende type.

Perspektivering 7

Ved lignende undersøgelser anbefales det at vælge et vandløb med højere økologisk tilstand, da det forventes, at effekten fra et renseanlæg lettere vil kunne detekteres. Spegerborgrenden har lavt DVFI både opstrøms og nedstrøms for udledningspunktet, hvorfor effekten af udledningen af spildevand måske ikke er målbar med eDNA-teknikker. Ydermere er vandløbet påvirket af saltslag, og der er et udledningspunkt, fra et overløbsbygværk uden bassin, cirka 700 meter opstrøms for udledningspunktet fra Skælskør renseanlæg. Der er endvidere tydelig menneskelig påvirkning af vandløbet, eftersom der er lagt sten ud på bunden og vandløbet er blevet udrettet [Slagelse Kommune Tekning & Miljø, 2010]. Det havde været mere optimalt med et vandløb med DVFI omkring 5-6 opstrøms og 3-4 nedstrøms, samt et vandløb, der ikke er påvirket af alt for mange af de førnævnte faktorer, da de kan være med til at tilsløre effekten fra renseanlægget. I et sådant vandløb vil det potentielt være nemmere at detektere en effekt fra spildevandsudledningen. Eksempelvis kunne Klausholm Å ved Hjallerup renseanlæg udnyttes, hvor der i 2021 var DVFI på fem opstrøms (st. 6000212) og fire nedstrøms (st. 6000208).

For at kunne svare på problemformuleringen, anbefales det at lave flere gentagelser, både i samme vandløb og andre vandløb, af undersøgelserne for at få et statistisk grundlag for konklusionerne. Dette kunne ydermere have muliggjort et entydigt svar på hypotese 1 omhandlende korrelationen mellem biodiversiteten nedstrøms og afstanden til udledningspunktet.

Yderligere kunne det være spændende at kigge på egenskaberne for de forkellige arter, der lever opstrøms og nedtrøms for udledningspunktet. Dette kan give et indblik i, hvilke arter der foretrækker miljøer med højere næringskoncentrationer og der kunne eventuelt udvælges nogle organismer, der kunne være indikator for effekten fra udledningspunktet.

I dette projekt er der anvendt OTU'er, der samler sekvenser med $\geq 97\%$ lighed, hvilket kan gøre taksonomisk bestemmelse til artsniveau vanskeligt. Ved at anvende amplicon sequence variants (ASV'er), vil hver sekvens være unik og kunne variere så lidt som et enkelt basepar [Chiarello et al., 2022]. Derfor vil ASV'er, der kommer fra en allerede sekventeret art nemmere kunne bestemmes til artsniveau, end ved brug af OTU'er. Dog kan anvendelsen af ASV'er være en ulempe, når sekventeringen er udført med nanopore, da MinION, uden polering, har en fejlrate på 6-8%, hvilket potentielt kan føre til, at det er et minimalt antal af sekvenser der er ens, og at datasættet derfor vil blive enormt [Delahaye og Nicolas, 2021]. Et tidligere studie fandt at MiSeq Illumina generelt muliggør identifikation til artsniveau oftere end nanopore, hvilket kan skyldes den lavere fejlrate [Egeter et al., 2022]. Derfor kunne det i fremtidige undersøgelser overvejes, at anvende Illumina sekventering for at få en højere taksonomisk opløsning.

- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., og Lodge, D. M., 2014. Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. Environmental science technology, Vol. 48, s. 1819–1827.
- Beckman Coulter Life Sciences, 2021, AMPure XP for PCR Purification. https://www.beckman.com/reagents/genomic/cleanup-and-size-selection/pcr. Downloadet: 10-04-2023.
- Beng, K. C. og Corlett, R. T., 2020. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. Biodiversity and Conservation, Vol. 29, s. 2089–2121.
- Bista, I., Carvalho, G. R., Walsh, K., Seymour, M., Hajibabaei, M., Lallias, D., Christmas, M., og Creer, S., 2017. Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. Nature communications, Vol. 8, s. 14087–14087.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., og Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. PNAS, Vol. 108, s. 4516–4522.
- Cardinale, B. J., Duffy, J. E., Gonzalez, A., Hooper, D. U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., Mace, G. M., Tilman, D., Wardle, D. A., Kinzig, A. P., Daily, G. C., Loreau, M., Grace, J. B., Larigauderie, A., Srivastava, D. S., og Naeem, S., 2012. *Biodiversity loss and its impact on humanity.* Conservation Biology, Vol. 486, s. 59–67.
- Carraro, L., Stauffer, J. B., og Altermatt, F., 2020. How to design optimal eDNA sampling strategies for biomonitoring in river networks. Environmental DNA, Vol. 3, s. 157–172.
- Chen, Y., Nie, F., Xie, S.-Q., Zheng, Y.-F., Dai, Q., Bray, T., Wang, Y.-X., Xing, J.-F., Huang, Z.-J., Wang, D.-P., He, L.-J., Luo, F., Wang, J.-X., Liu, Y.-Z., og Xiao, C.-L., 2021. Efficient assembly of nanopore reads via highly accurate and intact error correction. Nature Communications, Vol. 12, s. 1–10.
- Chiarello, M., McCauley, M., Villéger, S., og Jackson, C. R., 2022. Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. PloS one, Vol. 17, s. e0264443–e0264443.

- Coster, W. D., D'Hert, S., Schultz, D. T., Cruts, M., og Broeckhoven, C. V., 2018. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. Bioinformatics, Vol. 34, s. 2666–2669.
- Creer, S., Fonseca, V. G., Porazinska, D. L., Giblin-Davis, R. M., Sung, W., Power,
 D. M., Packer, M., Carvalho, G. R., Blaxter, M. L., Lambshead, P. J. D., og Thomas,
 W. K., 2010. Ultrasequencing of the meiofaunal biosphere: practice, pitfalls and
 promises. Conservation Genet Resour, Vol. 19, s. 4–20.
- Danmarks Arealinformation Danmarks miljøportal, 2023, Danmarks Arealinformation. https: //arealinformation.miljoeportal.dk/html5/index.html?viewer=distribution.

Downloadet: 19-05-2023.

- DCE, 2019. VANDMILJØ OG NATUR 2018. NOVANA. Tilstand og udvikling faglig sammenfatning, Miljøstyrelsen.
- de Chadarevian, S., 2003. Portrait of a DiscoveryWatson, Crick, and the Double Helix. Isis, Vol. 94, s. 90–91.
- Delahaye, C. og Nicolas, J., 2021. Sequencing DNA with nanopores: Troubles and biases. PloS one, Vol. 16, s. 1–29.
- DinGeo Boliga, 2023, SKÆLSKØR renseanlæg. https://www.dingeo.dk/renseanlæg/184213. Downloadet: 26-04-2023.
- Díaz-Ferguson, E. E. og Moyer, G. R., 2014. History, applications, methodological issues and perspectives for the use of environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. Revista de biología tropical, Vol. 62, s. 1273–1284.
- Egeter, B., Veríssimo, J., Lopes-Lima, M., Chaves, C., Pinto, J., Riccardi, N., Beja, P., og Fonseca, N. A., 2022. Speeding up the detection of invasive bivalve species using environmental DNA: A Nanopore and Illumina sequencing comparison. Molecular ecology resources, Vol. 22, s. 2232–2247.
- Eisenstein, B. I., 1990. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. The New England Journal of Medicine, Vol. 322, s. 178–183.
- Elbrecht, V. og Leese, F., 2017. Validation and Development of COI Metabarcoding Primers for Freshwater Macroinvertebrate Bioassessment. frontiers in environmental science, Vol. 5, s. 1–9.
- Erlich, H. A., Gelfand, D., og Sninsky, J. J., 1991. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. Science, Vol. 252, Iss. 5013, s. 1643–1651.

- Farrell, M. J., Govender, D., Hajibabaei, M., van der Bank, M., og Davies, T. J., 2019. Bacterial diversity in the waterholes of the Kruger National Park: an eDNA metabarcoding approach. Genome, Vol. 62, s. 229–242.
- Feio, M. J., Almeida, S. F., Craveiro, S. C., og Calado, A. J., 2009. A comparison between biotic indices and predictive models in stream water quality assessment based on benthic diatom communities. Ecological indicators, Vol. 9, s. 497–507.
- Feng, Y., Zhang, Y., Ying, C., Wang, D., og Du, C., 2015. Nanopore-based Fourth-generation DNA Sequencing Technology. Elsevier, Vol. 13, s. 4–16.
- Fraser, C., Hanage, W. P., og Spratt, B. G., 2007. Recombination and the Nature of Bacterial Speciation. Science (American Association for the Advancement of Science), Vol. 315, s. 476–480.
- Ganivet, E., 2019. Growth in human population and consumption both need to be addressed to reach an ecologically sustainable future. Springer Nature, Vol. 22, s. 4979–4998.
- Gørtz, P., 2023. Email correspondence with biologist, freshwater streams and lakes, consultant, Per Gørtz, NIRAS, 24-05-2023.
- Hashimoto, M., Chen, P.-C., Mitchell, M. W., Nikitopoulos, D. E., Soper, S. A., og Murphy, M. C., 2004. Rapid PCR in a continuous flow device. Lab on a chip, Vol. 4, s. 638–645.
- Hering, D., Borja, A., Carstensen, J., Carvalho, L., Elliott, M., Feld, C. K., Heiskanen, A.-S., Johnson, R. K., Moe, J., Pont, D., Solheim, A. L., og van de Bund, W., 2010. *The European Water Framework Directive at the age of 10: A critical review of the achievements with recommendations for the future.* Science of the Total Environment, Vol. 408, s. 4007–4019.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., og White, T. J., 2012. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. eBook. Acedemic Press.
- Ishii, K. og Fukui, M., 2001. Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, s. 3753–3755.
- Jo, T. og Minamoto, T., 2021. Complex interactions between environmental DNA (eDNA) state and water chemistries on eDNA persistence suggested by meta-analyses. Molecular ecology resources, Vol. 21, s. 1490–1503.

- Joseph, C., Faiq, M. E., Li, Z., og Chen, G., 2022. Persistence and degradation dynamics of eDNA affected by environmental factors in aquatic ecosystems. Hydrobiologia, Vol. 849, s. 4119–4133.
- Kelly, M. G., Adams, C., Graves, A.-C., Jamieson, J., Krokowski, J., Lycett, E. B., Murray-Bligh, J., Pritchard, S., og Wilkins, C., 2001. *The Trophic Diatom Index: A User's Manual. Revised Edition*, Environment Agency.
- Kusanke, L. M., Panteleit, J., Stoll, S., Korte, E., Sünger, E., Schulz, R., og Theissinger, K., 2020. Detection of the endangered European weather loach (Misgurnus fossilis) via water and sediment samples: Testing multiple eDNA workflows. Ecology and evolution, Vol. 10, s. 8331–8344.
- Li, H., 2018. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. Bioinformatics, Vol. 34, s. 3094–3100.
- Longmire, J. L., Maltbie, M., og Baker, R. J., 1997. USE OF "LYSIS BUFFER"IN DNA ISOLATION AND ITS IMPLICATION FOR MUSEUM COLLECTIONS. Occasional Papers, Vol. 163, s. 1–4.
- Miljø- og Fødevareministeriet, 2017. *Punktkilder 2015*, Styrelsen for Vand- og Naturforvaltning.
- Miljødata Danmarks miljøportal, 2023, Spegerborgrenden, 50 m OS rensenlæg, 100, NS renseanlæg. https://miljoedata.miljoeportal.dk/?et=Datamart%20Bundfauna% 20DVFI%20Vandl%C3%B8b&polygonId=fa0d4651-97a0-4afd-89ab-82a6fa9a4715. Downloadet: 26-04-2023.
- Miljøministeriet miljøstyrelsen, 2023a, Søer og vandløb. https://mst.dk/natur-vand/vandmiljoe/soeer-og-vandloeb/. Downloadet: 21-02-2023.
- Miljøministeriet miljøstyrelsen, 2023b, Overvågning vandløb. https://mst.dk/natur-vand/overvaagning-af-vand-og-natur/vandloeb/. Downloadet: 03-03-2023.
- Miljøstyrelsen, 1998. *Biologisk bedømmelse af vandløbskvalitet*. Vejledning fra Miljøstyrelsen.
- Mori, A. S., 2020. Advancing nature-based approaches to address the biodiversity and climate emergency. Ecology Letters, Vol. 23, s. 1729–1732.
- MP Biomedicine, 2021. FastDNA SPIN Kit for Soil. PDF.

- National Human Genome Research Institute, 2023, NANOPORE DNA SEQUENCING. https://www.genome.gov/genetics-glossary/Nanopore-DNA-Sequencing. Downloadet: 04-05-2023.
- Nevers, M. B., Przybyla-Kelly, K., Shively, D., Morris, C. C., Dickey, J., og Byappanahalli, M. N., 2020. Influence of sediment and stream transport on detecting a source of environmental DNA. PloS one, Vol. 15, s. e0244086–e0244086.
- Nielsen, P. H., Mielczarek, A. T., Kragelund, C., Nielsen, J. L., Saunders, A. M., Kong, Y., Hansen, A. A., og Vollertsen, J., 2010. A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. Water research (Oxford), Vol. 44, s. 5070–5088.
- Okabe, S. og Shimazu, Y., 2007. Persistence of host-specific Bacteroides-Prevotella 16S rRNA genetic markers in environmental waters: xts of temperature and salinity. Applied Microbial Technologies, Vol. 76, s. 935–944.
- Peces, M., Dottorini, G., Nierychlo, M., Andersen, K. S., Dueholm, M. K. D., og Nielsen, P. H., 2022. Microbial communities across activated sludge plants show recurring species-level seasonal patterns. ISME, Vol. 2, s. 1–11.
- Pereira, C. L., Gilbert, M. T. P., Araújo, M. B., og Matias, M. G., 2021. Fine-tuning biodiversity assessments: A framework to pair eDNA metabarcoding and morphological approaches. Methods in ecology and evolution, Vol. 12, s. 2397–2409.

QIAGEN, 2022. DNeasy powerwater kit handbook. PDF.

- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R., Gough, K. C., og Crispo, E., 2014. *REVIEW: The detection of aquatic animal species using* environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. The Journal of applied ecology, Vol. 51, s. 1450–1459.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., og Mahé, F., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ (San Francisco, CA), Vol. 4, s. e2584–e2584.
- Rétaux, S. og Casane, D., 2013. Evolution of eye development in the darkness of caves: adaptation, drift, or both? EvoDevo, Vol. 4, s. 26–37.
- Sakata, M. K., Yamamoto, S., Gotoh, R. O., Miya, M., Yamanaka, H., og Minamoto, T., 2020. Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. Environmental DNA (Hoboken, N.J.), Vol. 2, s. 505–518.
- Sanger, F., Nicklen, S., og Coulson, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS, Vol. 74, s. 5463–5467.

Slagelse Kommune Tekning & Miljø, 2010. Spegerborgrenden, nedre del. PDF.

- Suter, L., Polanowski, A. M., Clarke, L. J., Kitchener, J. A., og Deagle, B. E., 2021. Capturing open ocean biodiversity: Comparing environmental DNA metabarcoding to the continuous plankton recorder. Molecular ecology, Vol. 30, s. 3140–3157.
- Thomsen, P. F. og Willerslev, E., 2015. Environmental DNA An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. Elsevier, Vol. 183, s. 4–18.
- Tsygankov, A. A., 2007. Nitrogen-fixing cyanobacteria: A review. Applied biochemistry and microbiology, Vol. 43, s. 250–259.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, 2017. World Population Prospects 2017 - Data Booklet, Population division.
- Vaser, R., Sović, I., Nagarajan, N., og Šikić, M., 2017. Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. Genome research, Vol. 27, s. 737–746.
- Vences, M., Lyra, M. L., Perl, R. G. B., Bletz, M. C., Stankovic, D., Lopes, C. M., Jarek, M., Bhuju, S., Geffers, R., Haddad, C. F. B., og Steinfartz, S., 2016. Freshwater vertebrate metabarcoding on Illumina platforms using double-indexed primers of the mitochondrial 16S rRNA gene. Conservation Genet Resour, Vol. 8, s. 323–327.
- Vosa, J. M. D., Joppa, L. N., Gittleman, J. L., Stephens, P. R., og Pimm, S. L., 2014. Estimating the normal background rate of species extinction. Conservation Biology, Vol. 22, s. 452–462.
- Větrovský, T. og Baldrian, P., 2013. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. PloS one, Vol. 8, s. e57923–e57923.
- Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y., og Au, K. F., 2021. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. Nature Biotechnology, Vol. 39, s. 1348–1365.
- Wiberg-Larsen, P., 2011. Teknisk anvisning for makroinvertebrater (smådyr) i vandløb. Teknisk anvisning fra Fagdatacenter for Ferskvand, DCE, no. TA-V07, Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet.
- Wick, R., 2018, *Porechop.* https://github.com/rrwick/Porechop. Downloadet: 23-05-2023.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., og Madden, T. L., 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics, Vol. 13, s. 1–11.

Živa Fišer Pečnikar og Buzan, E. V., 2014. 20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application. Animal Genetics, Vol. 55, s. 43–52.

A.1 Mængde filtreret vand

Tabel A.1: Tabel, der angiver mængden af vand (mL) brugt på at mætte filteret ved hver prøvelokation. VNXX læses som vandprøve indsamlet XX meter nedstrøms, og VOXX læses som vandprøve indsamlet XX meter opstrøms fra udledningspunktet. Prøven fra udledningspunktet er markeret med orange.

Prøve	Volumen filtreret (mL)
VN100	360
VN75	330
VN50	530
VN40	360
VN30	430
VN20	360
VN10	340
V0	400
VO10	410
VO25	340
VO50	420

A.2 Mængde sediment, der er ekstraheret DNA fra

Tabel A.2: Tabel, der angiver hvor meget sediment der er ekstraheret DNA fra, fra hver prøve. SNXX læses som sedimentprøve indsamlet XX meter nedstrøms, og SOXX læses som sedimentprøve indsamlet XX meter opstrøms fra udledningspunktet. Prøven fra udledningspunktet er markeret med orange.

Prøve	Vægt (mg)
SN100	504,6
SN75	485,2
SN50	490,4
SN45	506,2
SN40	496,6
SN35	514,7
SN30	513,9
SN25	507,9
SN25	507,9
SN20	489,2
SN15	504,5
SN10	501,8
SN5	505,3
S0	494,6
SO10	495,8
SO25	486,6
SO50	483,1

B.1 DNA-koncentration efter DNA-ekstraktion.

Tabel B.1: Viser koncentrationen af det ekstraherede DNA inden SPRI bead purification. VNXX og SNXX læses som henholdsvis vand- og sedimentprøve indsamlet XX meter nedstrøms, VOXX og SOXX læses som henholdsvis vand- og sedimentprøve indsamlet XX meter opstrøms fra udledningspunktet. Prøven fra udledningspunktet er markeret med orange.

Prøve	Koncentration $(ng/\mu L)$
VN100	28,7
VN75	44,9
VN50	7,4
VN40	26,0
VN30	24,3
VN20	3,4
VN10	6,3
V0	18,5
VO10	14,5
VO25	5,1
VO50	10,3

Prøve	Koncentration $(ng/\mu L)$
SN100	71,2
SN75	112,2
SN50	88,4
SN45	4,4
SN40	61,1
SN35	119,7
SN30	64,6
SN25	63,9
SN20	79,1
SN15	119,1
SN10	65,8
SN5	63,8
$\mathbf{S0}$	40,3
SO10	58,2
SO25	76,1
SO50	100,3

B.2 DNA-koncentration for sedimentprøver efter SPRI bead purification

Tabel B.2: DNA-koncentration af sedimentprøver efter SPRI bead purification. SNXX læses som vandprøve indsamlet XX meter nedstrøms, og SOXX læses som vandprøve indsamlet XX meter opstrøms fra udledningspunktet. Prøven fra udledningspunktet er markeret med orange.

Prøve	Koncentration (ng/ μ L)
SN100	88,9
SN75	127,7
SN50	106,9
SN45	81,5
SN40	69,1
SN35	126,0
SN30	78,1
SN25	98,7
SN20	81,6
SN15	127,8
SN10	52,3
SN5	67,0
SO	42,2
SO10	76,7
SO25	86,2
SO50	103,1

B.3 DNA-koncentration efter PCR og SPRI bead purification

B.3.1 Vandprøver

Tabel B.3: DNA-koncentration af vandprøver efter PCR og SPRI bead purification. VNXX læses som vandprøve indsamler XX meter nedstrøms, VOXX læses som vandprøve indsamlet XX meter opstrøms fra udledningspunktet. Prøverne fra udledningspunktet er markeret med orange.

Prøve:	Koncentration	Prøve:	Koncentration	Prøve:	Koncentration
$\operatorname{primers}$	$(ng/\mu L)$	primersæt	$(\mathrm{ng}/\mathrm{\mu L})$	primersæt	$({ m ng}/{ m \mu L})$
VN100:V4	4,4	VN40:SSU	5,5	V0:Vert	4,5
VN100:BF3	5,9	VN30:V4	4,3	V0:SSU	8,6
VN100:Vert	3,2	VN30:BF3	4,6	VO10:V4	13,4
VN100:SSU	9,8	VN30:Vert	3,6	VO10:BF3	0,9
VN75:V4	12,9	VN30:SSU	5,1	VO10:Vert	11,7
VN75:BF3	27,1	VN20:V4	8,6	VO10:SSU	55,9
VN75:Vert	6,9	VN20:BF3	0,4	VO25:V4	6,3
VN75:SSU	17,6	VN20:Vert	0,3	VO25:BF3	6,0
VN50:V4	4,1	VN20:SSU	9,0	VO25:Vert	8,5
VN50:BF3	3,8	VN10:V4	16,3	VO25:SSU	14,9
VN50:Vert	3,5	VN10:BF3	16,4	VO50:V4	4,1
VN50:SSU	5,7	VN10:Vert	8,2	VO50:BF3	7,6
VN40:V4	4,9	VN10:SSU	17,0	VO50:Vert	10,1
VN40:BF3	5,6	V0:V4	3,9	VO50:SSU	24,1
VN40:Vert	5,0	V0:BF3	4,0		

B.3.2 Sedimentprøver

Tabel B.4: DNA-koncentration af sedimentprøver efter PCR og SPRI bead purification. SNXX læses som sedimentprøve indsamlet XX meter nedstrøms og SOXX læses som sedimentprøve indsamlet XX meter opstrøms fra udledningspunktet. Prøverne fra udledningspunktet er markeret med orange.

Prøve:	Koncentration	Prøve:	Koncentration	Prøve:	Koncentration
primersæt	$(ng/\mu L)$	primersæt	$(ng/\mu L)$	primersæt	$(ng/\mu L)$
SN100:V4	10,6	SN35:Vert	2,1	SN5:V4	4,1
SN100:BF3	1,7	SN35:SSU	8,9	SN5:BF3	0,9
SN100:Vert	0,2	SN30:V4	6,8	SN5:Vert	0,3
SN100:SSU	39,3	SN30:BF3	0,8	SN5:SSU	26,8
SN75:V4	1,6	SN30:Vert	1,5	S0:V4	3,6
SN75:BF3	2,7	SN30:SSU	8,2	S0:BF3	2,7
SN75:Vert	1,2	SN25:V4	6,3	S0:Vert	0,1
SN75:SSU	31,1	SN25:BF3	1,8	S0:SSU	4,7
SN50:V4	3,9	SN25:Vert	0,3	SO10:V4	6,8
SN50BF3	0,9	SN25:SSU	10,9	SO10:BF3	0,2
SN50:Vert	0,1	SN20:V4	13,9	SO10:Vert	0,6
SN50:SSU	13,9	SN20:BF3	0,9	SO10:SSU	10,6
SN45:V4	6,1	SN20:Vert	0,2	SO25:V4	2,7
SN45:BF3	1,4	SN20:SSU	9,7	SO25:BF3	0,3
SN45:Vert	0,3	SN15:V4	3,4	SO25:Vert	0,2
SN45:SSU	9,6	SN15:BF3	1,3	SO25:SSU	2,9
SN40:V4	6,3	SN15:Vert	1,7	SO50:V4	0,7
SN40:BF3	2,6	SN15:SSU	25,1	SO50:BF3	0,3
SN40:Vert	1,2	SN10:V4	1,3	SO50:Vert	0,3
SN40:SSU	9,8	SN10:BF3	1,3	SO50:SSU	0,2
SN35:V4	10,5	SN10:Vert	5,6		
SN35:BF3	1,7	SN10:SSU	29,0		

B.4 DNA-koncentration efter barcoding ved polymerase chain reaction.

Tabel B.5: DNA-koncentration af de poolede og barcodede prøver efter barcoding polymerase chain reaction. VNXX og SNXX læses som henholdsvis vand- og sedimentprøve indsamlet XX meter nedstrøms, VOXX og SOXX læses som henholdsvis vand- og sedimentprøve indsamlet XX meter opstrøms fra udledningspunktet. Prøven fra udledningspunktet er markeret med orange.

Koncentration $(ng/\mu L)$
11,8
12,8
23,5
9,4
10,9
15,3
10,2
8,7
10,0
11,6
5,1

Prøve	Koncentration $(ng/\mu L)$
SN100	9,4
SN75	9,6
SN50	7,1
SN45	9,3
SN40	7,8
SN35	5,7
SN30	7,0
SN25	7,4
SN20	7,5
SN15	7,6
SN10	8,6
SN5	8,8
SO	3,8
SO10	7,5
SO25	9,0
SO50	9,2

B.5 DNA-koncentration efter de forskellige processer i klargøring af DNA-library

Tabel B.6: DNA-koncentration af den barcodede og poolede prøve efter de forskellige processer i klargøring af DNA-library.

Proces	Koncentration $(ng/\mu L)$
SPRI bead purification	22,8
DNA-repair og end-prep	20,6
Adapter ligering og clean-up	25,8

C.1 Alfa-diversitet

Tabel C.1: Viser for hver vandprøve antallet af læste OTU'er, det udregnede Shannon-indeks og evenness. VNXX læses som vandprøve indsamler XX meter nedstrøms, VOXX læses som vandprøve indsamlet XX meter opstrøms fra udledningspunktet. Prøverne fra udledningspunktet er markeret med orange.

Vandrøve	Antal OTU'er	Shannon indeks	Evenness
VN100	2099	6,03	0,79
VN75	2991	6,73	0,84
VN50	1833	6,02	0,80
VN40	2010	6,00	0,79
VN30	2248	6,02	0,78
VN20	2115	6,26	0,82
VN10	2797	6,47	0,82
V0	2004	6,13	0,81
VO10	1934	5,67	0,75
VO25	2006	5,80	0,76
VO50	1715	5,65	0,76

Tabel C.2: Viser for hver sedimentprøve antallet af læste OTU'er, det udregnede Shannonindeks og evenness. SNXX læses som sedimentprøve indsamlet XX meter nedstrøms og SOXX læses som sedimentprøve indsamlet XX meter opstrøms fra udledningspunktet. Prøverne fra udledningspunktet er markeret med orange.

Sedimentrøve	Antal OTU'er	Shannon indeks	Evenness
SN100	2269	6,10	0,79
SN75	3172	6,01	0,75
SN50	2985	6,41	0,80
SN45	3526	6,64	0,81
SN40	3058	6,38	0,79
SN35	2955	6,38	0,80
SN30	3079	6,15	0,77
SN25	3120	6,50	0,81
SN20	3185	6,31	0,78
SN15	2819	6,55	0,82
SN10	3437	6,32	0,78
SN5	2953	7,17	0,90
S0	3324	6,35	0,78
SO10	2856	6,07	0,76
SO25	2644	5,89	0,75
SO50	2751	7,07	0,89

C.2 Alfa-diversitet for datasæt uden prokaryote OTU'er

Tabel C.3: Viser for hver vandprøve, hvor prokaryote OTU'er er udeladt fra datasættet, antallet af læste OTU'er, det udregnede Shannon-indeks og evenness. VNXX læses som vandprøve indsamler XX meter nedstrøms, VOXX læses som vandprøve indsamlet XX meter opstrøms fra udledningspunktet. Prøverne fra udledningspunktet er markeret med orange.

Lokation	Antal OTU	Shannon	Evenness
VN100	958	5,04	0,73
VN75	947	5,13	0,75
VN50	795	4,98	0,75
VN40	877	4,98	0,73
VN30	946	4,91	0,72
VN20	621	4,84	0,75
VN10	842	4,84	0,72
V0	863	5,03	0,74
VO10	672	4,38	0,67
VO25	810	4,63	0,69
VO50	805	4,69	0,70

Tabel C.4: Viser for hver sedimentprøve, hvor archaea og bakterielle OTU'er er udeladt fra datasættet, antallet af læste OTU'er, det udregnede Shannon-indeks og evenness. SNXX læses som sedimentprøve indsamlet XX meter nedstrøms og SOXX læses som sedimentprøve indsamlet XX meter opstrøms fra udledningspunktet. Prøverne fra udledningspunktet er markeret med orange.

Lokation	Antal OTU	Shannon	Evenness
SN100	454	3,72	0,61
SN75	988	4,48	0,65
SN50	585	3,80	0,60
SN45	950	4,76	0,69
SN40	750	4,21	0,64
SN35	806	4,57	0,68
SN30	677	3,96	0,61
SN25	716	4,09	0,62
SN20	735	4,20	0,64
SN15	714	4,68	0,71
SN10	920	4,57	0,67
SN5	537	4,76	0,76
SO	819	4,34	0,65
SO10	456	3,46	0,57
SO25	397	3,35	0,56
SO50	95	3,78	0,83

C.3 Beta-diversitet

C.3.1 Vandprøver

Tabel C.5: Angiver forskellen mellem de biologiske samfund fra de individuelle vandprøver, udregnet ved Bray-Curtis.

Prøve	VN100	VN75	VN50	VN40	VN30	VN20	VN10	V0	VO10	VO25	VO50
VN100	0,00										
VN75	0,47	0,00									
VN50	0,30	0,46	0,00								
VN40	0,27	0,48	0,31	0,00							
VN30	0,30	0,52	0,37	0,35	0,00						
VN20	0,47	0,61	0,51	0,46	0,41	0,00					
VN10	0,52	0,34	0,49	0,51	0,56	0,61	0,00				
V0	0,29	0,49	0,30	0,31	0,31	0,52	0,52	0,00			
VO10	0,40	0,55	0,45	0,48	0,33	0,45	0,57	0,44	0,00		
VO25	0,33	0,54	0,39	0,42	0,28	0,48	0,56	0,33	0,29	0,00	
VO50	0,33	0,54	0,38	0,41	0,30	0,49	0,57	0,33	0,35	0,25	0,00

C.3.2 Sedimentprøver

Tabel C.6: Angiver forskellen mellem de biologiske samfund fra de individuelle sediment
prøver, udregnet ved Bray-Curtis.

Prøve	SN100	SN75	SN50	SN45	SN40	SN35	SN30	SN25	SN20	SN15	SN10	SN5	S0	SO10	SO25	SO50
SN100	0,00															
SN75	0,53	0,00														
SN50	0,54	0,47	0,00													
SN45	0,54	0,34	0,43	0,00												
SN40	0,39	0,39	0,47	0,42	0,00											
SN35	0,44	0,39	0,48	0,43	0,34	0,00										
SN30	0,56	0,39	0,48	0,35	0,40	0,40	0,00									
SN25	0,50	0,42	0,34	0,41	0,45	0,49	0,49	0,00								
SN20	0,50	0,34	0,43	0,29	0,41	0,40	0,35	0,41	0,00							
SN15	0,61	0,53	0,53	0,48	0,53	0,52	0,51	0,57	0,48	0,00						
SN10	0,57	0,35	0,42	0,31	0,45	0,45	0,38	0,43	0,33	0,53	0,00					
SN5	0,54	0,60	0,49	0,50	0,48	0,54	0,48	0,48	0,46	0,55	0,53	0,00				
S0	0,65	0,46	0,51	0,35	0,51	0,55	0,42	0,52	0,38	0,54	0,34	0,52	0,00			
SO10	0,66	0,49	0,50	0,39	0,55	0,58	0,42	0,52	0,42	0,53	0,39	0,57	0,31	0,00		
SO25	0,62	0,46	0,42	0,36	0,52	0,56	0,41	0,45	0,38	0,52	0,38	0,56	0,35	0,29	0,00	
SO50	0,66	0,69	0,55	0,57	0,59	0,62	0,58	0,57	0,57	0,55	0,62	0,50	0,56	0,49	0,51	0,00

Screeplot D

D.1 Sammenligning af prøvetyper



Figur D.1: Screeplot, der illusstrerer vægtningerne af akserne i PCA-plottet på Figur 4.3



D.2 Sammenligning af opstrøms og nedstrøms

