



Proof-of-concept: Kan eDNA anvendes til at vurdere naturkvalitet?

Af Kristian Fogh Drejer



AALBORG UNIVERSITET

Institut for Kemi og Biovidenskab

Frederik Bajers Vej 7H

DK-9220 Aalborg Ø

<http://bio.aau.dk>

Titel

Proof-of-concept: Kan eDNA anvendes til at vurdere naturkvalitet?

Projektperiode

2/9/2024-17/8/2025

Forfatter

Kristian Fogh Drejer

Vejledere

Jeppe Lund Nielsen

Søren Østergaard Gertsen

Morten Larsen (Limfjordsrådet)

Sidetæl

51

Forord

Der skal rettes stor tak til vejledere Jeppe Lund Nielsen og Søren Østergaard Gertsen fra Aalborg Universitet samt Morten Larsen fra Limfjordsrådets Sekretariat. Indholdet af denne rapport samt arbejdet der ligger til grunde for rapporten har gavnnet gevaldigt af deres fortsatte samarbejdsvillighed, hjælp og rådgivning.

Abstract

This proof-of-concept study investigates whether environmental DNA (eDNA) can be used as a supplement to or replacement for traditional field-based methods for assessing nature quality in Danish terrestrial habitats. Profiles of eDNA were obtained for plants, vertebrates and invertebrates from air samples, and for bacteria, archaea and methanogens from soil samples, which were collected from nine sites with varying High Nature Value (HNV) scores within a single study area in Vendsyssel.

Results showed no linear correlation between species richness or biodiversity and HNV-score, and no obvious and consistent patterns in genus-level composition across HNV-scores. However, ordination analyses using NMDS and CCA revealed differences in eDNA community composition between certain groupings of HNV-scores (HNV-categories) for plants, invertebrates, bacteria, archaea and methanogens, while vertebrates showed no clear separation of the HNV-categories. Several taxa were exclusively found in specific HNV-categories, and a literature review found that their ecology matched the corresponding habitat, which indicates a potential for finding indicator species for specific HNV-scores.

Overall, the findings suggest that eDNA from both air and soil has potential for reflecting nature value and identifying indicator species. However, the method requires further refinement and validation. Future studies should include more replicates, a wider range of nature types, and optimized laboratory protocols to ensure reliable eDNA-based assessments of nature quality.

Indholdsfortegnelse

Introduktion.....	1
Formål og Hypoteser	6
Metode	7
Områdebeskrivelse	7
Prøveindsamling.....	8
Indsamling af Luftprøver.....	9
Indsamling af Jordprøver	9
DNA-Ekstrahering.....	10
Amplicon PCR.....	10
Barcoding PCR og Sekventering	11
Databehandling.....	12
Statistik	14
Resultater.....	15
Alfa-Diversitet for Luftprøver	15
Alfa-Diversitet for Jordprøver.....	17
Taksonomisk Sammensætning af Luftprøver	18
Taksonomisk Sammensætning af Jordprøver	20
Beta-Diversitet for Luftprøver	22
Beta-Diversitet for Jordprøver	24
Arter og Slægter i HNV-kategorier for Luftprøver	26
Arter og Slægter i HNV-kategorier for Jordprøver	28
Diskussion.....	30
Luftprøver	30
Jordprøver	34
Perspektivering	38
Konklusion.....	41
Bilag.....	42
PCR-forhold	42
Rarefaction-Kurver	43
Ordinationsplots	45
Kilder.....	47

Introduktion

På global plan ser vi et fald i biodiversitet på grund af den menneskelige effekt på naturen. Biodiversitet er et bredt begreb, der oftest anvendes til at beskrive antallet af forskellige arter inden for et givent område, samt hvor ligeligt fordelt proportionerne af arterne er (Ejrnæs et al., 2021). Arter er estimeret til at uddø med en 100 gange højere rate, end hvis naturen ikke var under antropogenisk påvirkning, hvilket har givet denne uddøen titlen af jordens sjette masseuddøen (Ejrnæs et al., 2021). I forlængelse af masseuddøen bliver økosystemers processer og funktioner påvirket, interaktioner mellem arter reduceres og naturtyper samt -områder forsvinder med tiden (Ejrnæs et al., 2021). Danmark er ikke en undtagelse til dette.

Danmark er blandt de mest opdyrket lande i EU, hvilket har transformeret daværende natur til monokulturer og fragmenteret den natur, der er tilbage (Ejrnæs et al., 2021). De Forenede Nationer (FN) har opstillet verdensmål for deres medlemslande, der inkluderer at tabet i biodiversitet skal standses (Ejrnæs et al., 2021). Evaluering af Danmarks biodiversitet i år 2010 og efterfølgende år 2020 fra henholdsvis Danmarks Miljøundersøgelser samt det Nationale Center for Miljø og Energi (DCE) konkluderer begge, at der stadig er signifikant tilbagegang i den danske biodiversitet (Ejrnæs et al., 2021).

For at standse tabet af biodiversitet og natur har Danmark indgået i lovgivning, der har til formål at beskytte naturområder og arterne heri. Danmark er under EU's naturbeskyttelsesdirektiver påkrævet til at bevare specifikke arter og naturtyper, der er dømt sjældne, truede eller karakteristiske (Naturstyrelsen, 2014). Naturbeskyttelsesdirektiverne har givet anledning til Natura 2000, som er et netværk af beskyttede såkaldte Natura 2000-områder, der har til formål at bevare og beskytte udvalgte områder og arter samt skabe et forbundet netværk af fredet natur med høj konnektivitet (Naturstyrelsen, 2014). Udpegningen af Natura 2000-områder bliver udført på baggrund af basisanalyser, der inkluderer en kortlægning af naturtyperne samt levesteder for arter og en vurdering af naturtilstanden samt trusler herimod (Naturstyrelsen, 2014). Danmark har yderligere opstillet naturbeskyttelsesloven, som også sigter at beskytte landets natur, miljø samt vilde arter, således at samfundet kan udvikles på et bæredygtigt grundlag (Miljø- og Ligestillingsministeriet, 2019). En del af denne lov er beskyttelsen af tilstanden af heder, moser, strandenge, strandsumpe, ferske enge, biologiske overdrev, søer med et areal over 100 m² samt specifikke beskyttede vandløb (Miljø- og Ligestillingsministeriet, 2019). Vurderingen af naturtilstanden af disse såkaldte §3-områder er hertil essentiel for udpegningen og beskyttelsen af den danske natur, og ligesom for Natura 2000-områder bliver denne vurdering udført med tilstandsvurderingssystemet fra Danmarks Miljøundersøgelser og DCE (Fredshavn & Skov, 2005; Miljø- og Ligestillingsministeriet, 2019; Naturstyrelsen, 2014).

Tilstandsvurderingssystemet anvendes til at udregne et naturtilstandsindeks for et givent område på baggrund af simple observationer i felten (Fredshavn & Skov, 2005). Naturtilstandsindekset kan scores på en skala mellem ét og nul, hvor indeksværdien kan falde i én af fem tilstandsklasser (Figur 1).

Tilstandsklasse		Indeksværdi
I	Høj	1,0 - 0,8
II	God	0,8 - 0,6
III	Moderat	0,6 - 0,4
IV	Ringe	0,4 - 0,2
V	Dårlig	0,2- 0,0

Figur 1: De fem tilstandsklasser som naturområder kan tildeles på baggrund af naturtilstandsindexet udregnet ved brug af tilstandsvurderingssystemet (<https://novana.au.dk/naturtyper/kortlaegning/naturtilstand>, besøgt d. 31/7/25).

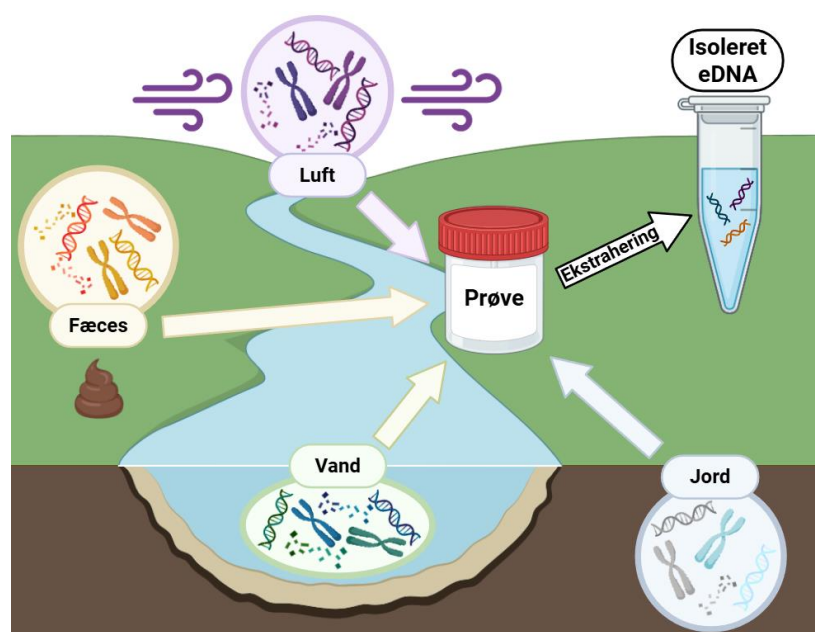
For at et område kan beskrives som værende af gunstig naturtilstand, så skal det tildeles tilstandsklasse I eller II, hvilket betyder at området skal have et naturtilstandsindex på 0,6 og over (Fredshavn & Skov, 2005). Indexet beregnes på baggrund af et struktur- og artsindex, der henholdsvis beskriver strukturelle indikatorer og artssammensætningen af området (Fredshavn & Skov, 2005). Strukturindexet anvendes til at udregne en score ud fra indikatorer såsom vegetationsstruktur, hydrologi, afgræsning, påvirkning af jordbrugsdrift og karakteristiske strukturer for den pågældende naturtype (Fredshavn & Skov, 2005). Artsindexet anvendes i stedet til at udregne en score baseret på hvilke immobile indikatorarter, der findes inden for en dokumentationscirkel med radius på fem meter, hvor centrum af cirklen er placeret i et område, der er karakteristisk for den pågældende naturtype (Fredshavn & Skov, 2005). Her vil sjældne og sårbare arter lede til en højere score, mens skadelige og invasive arter leder til en lavere score (Fredshavn & Skov, 2005). Scoringen af strukturindikatorer og indikatorarter er specificeret til de enkelte naturtyper, hvor eksempler på disse naturtyper er strandeng, ferske enge, kalkrige moser og så videre (Fredshavn & Skov, 2005). Dette betyder, at en indikator der leder til et højere naturtilstandsindex i én naturtype kan have en mindre eller ingen påvirkning på naturtilstandsindexet i en anden naturtype (Fredshavn & Skov, 2005). Selvom tilstandsvurderingssystemet ser bred anvendelse i hele Danmark på tværs af kommuner, så har metoden stadig nogle begrænsninger, der kan påvirke det endegyldige naturtilstandsindex. Systemet er udviklet til at kunne vurdere naturtilstanden af et område baseret på hurtige observationer (Fredshavn & Skov, 2005). Dette leder dog til bias, idet den endegyldige score er afhængig af hvilke strukturer og arter der observeres, og der er ikke nogen systematisk eller gentagelig tilgang der sikrer, at de samme indikatorer observeres ved flere gentagelser. Specielt artsindexet er sårbart over for dette. Artsindexet kræver at personen i felten kan finde og artsidentificere alle indikatorarter i den pågældende naturtype (Fredshavn & Skov, 2005). Placeringen af dokumentationscirklen har dog større bias, da personen i felten selv dømmer, hvilket område der er mest karakteristisk for naturtypen (Fredshavn & Skov, 2005). Dette kan samlet lede til, at et område kan score forskellige naturtilstandsindexe alt efter hvem, der vurderer området. Derudover kræver tilstandsvurderingen oftest uddannet personale, der skal bruge tid i felten til at vurdere hver lokation, hvilket resulterer i omkostninger og kan være tidskrævende.

Et andet indeks for tilstanden er naturen er High Nature Value (HNV), der er udviklet til at kunne udpege arealer med de bedste forhold for høj biodiversitet (Ejrnæs et al., 2012). Danmark er som medlemsland af EU forpligtet til at have udviklet og årligt opdatere en national HNV-indikator, med formålet at det kan anvendes til at udpege arealer med høj naturværdi, således at økonomisk støtte kan prioriteres hertil (Ejrnæs et al., 2012). Den danske HNV-indikator er opbygget af 14 bi-nære kortlag med en opløsning på 9,6 x 9,6 meter, således at indikatoren er kompatibel med geografiske informationssystemer (GIS) og kan opdateres løbende (Ejrnæs et al., 2012). Eksempler på disse kortlag er:

- Om arealet er et beskyttet §3-område.
- Om arealet er under ekstensiv landbrugsdrift.
- Om der er mindst én rødlisteart i området.
- Om området er i nærhed til småbiotoper og skov.
- Om området har et artsindeks fra naturtilstandsindexet på over 0,6.
- Om området har et artsindeks fra naturtilstandsindexet på over 0,8.

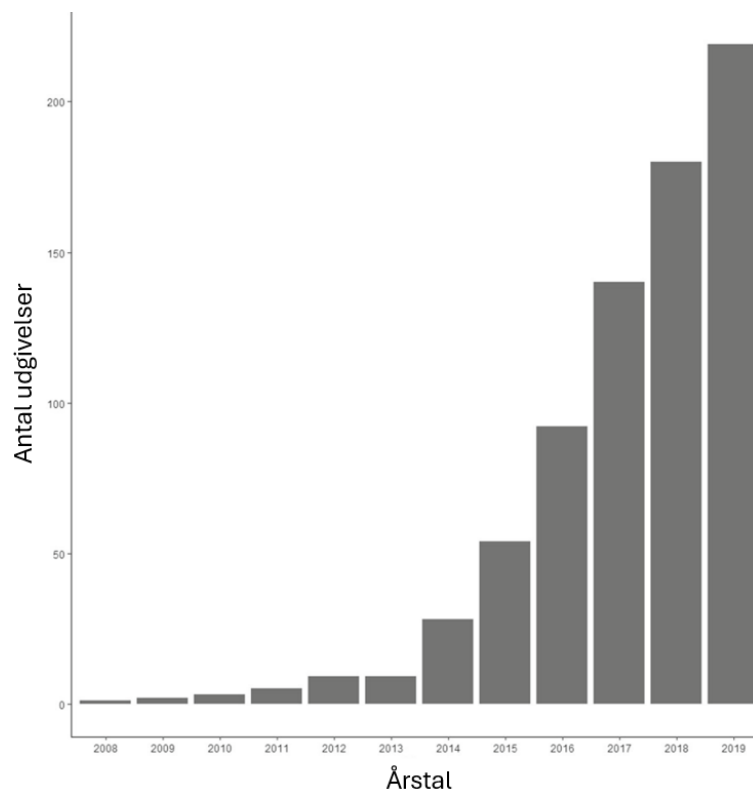
Et areal kan få tildelt enten 0 eller 1 point per kortlag, hvor værdien 1 angiver tilstedeværelsen af et element, der indikerer høj naturværdi (Ejrnæs et al., 2012). Derfor er den teoretiske højeste såkaldte HNV-score for et areal 14, men denne værdi forekommer ikke nogen steder i Danmark (Ejrnæs et al., 2012). I stedet er den højeste reelle HNV-score 13 (Ejrnæs et al., 2012). Eftersom HNV-scoren af et område er påvirket af individuelle observationer herunder det fornævnte artsindeks, så er det også påvirket af det samme bias som naturtilstandsindexet.

En nymoderne metode, der ikke påvirkes af de samme begrænsninger som observationsbaseret vurderinger, er indsamlingen og analyseringen af miljø-DNA (eDNA). DNA er unikt for alle organismer, og alle organismer udskiller genetisk materiale til det omkringværende miljø i form af eksempelvis hår, hud, urin, fæces eller døde celler (Beng & Corlett, 2020). Dette DNA kan indsamles og isoleres fra jord, vand, luft eller organisk materiale såsom fæces, hvor det kan anvendes til at analysere, hvilke organismer der er til stede eller har været til stede i miljøet (Figur 2) (Beng & Corlett, 2020). Metoden er af den årsag ikke invasiv, da indsamlingen af disse prøver ikke påvirker det omkringliggende økosystem betydeligt (Beng & Corlett, 2020).



Figur 2: Miljøer eDNA kan forekomme i og indsamles fra til formålet af eDNA-analyser.

Derudover kan eDNA anvendes til mange formål, og metoden er hurtig, effektiv og relativt billig når sammenlignet med andre fremgangsmåder, der også detekterer og analyserer arter, populationer og biologiske samfund (Beng & Corlett, 2020). Alt efter hvilke gener der målrettes, så kan eDNA anvendes til at kortlægge arters udbredelse, analysere diet og biologiske interaktioner, undersøge hele økosystemer og detektere specifikke arter såsom sjældne, sårbare eller invasive arter (Beng & Corlett, 2020). Metoden kan altså anvendes til mange formål, hvilket gør det nemt at analysere flere aspekter af et økosystem med én prøve. Genetisk materiale nedbrydes dog med tiden, når det er udsat for miljøet, hvor forskellige abiotiske og biotiske faktorer dikterer, hvor hurtigt det degraderes (Beng & Corlett, 2020). Høje temperaturer, UV-indstråling fra solen, vand og nedbrydelsen af mikrober mindsker overlevelsestiden af eDNA (Beng & Corlett, 2020; Garrett et al., 2023). Andre faktorer der påvirker nedbrydningshastigheden af eDNA inkluderer regn, fugtighed, salinitet med mere (Beng & Corlett, 2020; Garrett et al., 2023). Eksempelvis kan eDNA forblive i kolde og tørre miljøer såsom permafrost i op til flere tusinde år, mens det i tempereret søer kan nedbrydes inden for få timer (Beng & Corlett, 2020). Spredningsevnen af eDNA er også meget påvirket af hvilket miljø, det befinder sig i. Som eksempel kan vind og vandstrømme bære eDNA med sig, hvilket kan påvirke mængden af indsamlet eDNA samt udvide arealet, der indsamles fra (Beng & Corlett, 2020; Johnson et al., 2023). Anvendelsen af eDNA er dog stadig et meget nyt forskningsområde, og undersøgelsen af metodens anvendelse og begrænsninger er steget drastisk inden for det sidste årti (Figur 3) (Beng & Corlett, 2020). Derfor er der stadig begrænset viden om, hvordan forskellige parametre påvirker eDNA-analyser (Beng & Corlett, 2020).



Figur 3: Antallet af udgivet studier der anvender eDNA, som kan findes ved brug af søgeordene "environmental DNA" eller "eDNA" fra perioden mellem d. 1/1/2008 og den 31/12/2019 (Modificeret fra: Beng & Corlett).

Anvendelsen af eDNA har dog også velkendte begrænsninger. Når eDNA anvendes bliver amplificeringen af specifikke gener målrettet med specifikke genetiske sekvenser kaldet primers (Prieto et al., 2024). En primer kan designes til enten at ramme enkelte arter eller større taksonomiske grupper (Beng & Corlett, 2020). Der findes dog ikke en såkaldt universel primer, der ligeligt amplificerer alle taksonomiske grupper (Beng & Corlett, 2020; Prieto et al., 2024). Dette primer bias resulterer i, at alt efter hvilken primer der anvendes, så vil nogle taksonomiske grupper være underrepræsenteret eller udeladt fra eDNA-analysen, selv hvis det var tilsigtet at inkludere dem (Prieto et al., 2024). Eksempelvis findes der primers som målretter planter, der mere effektivt amplificerer blomstrende planter end ikke-blomstrende planter og mosser (Prieto et al., 2024). En prøve af eDNA kan også være kontamineret af genetisk materiale fra organisk materiale, der ikke stammer fra et levende individ fra prøvetagningslokationen (Beng & Corlett, 2020). Som nævnt tidligere kan eDNA blive båret af eksempelvis vind, men fæces fra et rovdyr kan også kontaminere en lokation med genetisk materiale (Beng & Corlett, 2020). Som eksempel kan en frø i én sø blive spist af et rovdyr, hvorefter rovdyret kan defækere i en anden sø uden en bestand af frøer. En eDNA-analyse af den anden sø kan så drage den forkerte konklusion, nemlig at levende frøer findes i søen (Beng & Corlett, 2020). Yderligere er den taksonomiske identifikation af eDNA ekstremt afhængige af databaser af genetiske sekvenser. En sekvens af eDNA bliver taksonomisk identificeret ved at sammenligne den imod genetiske sekvenser i en database for at finde en matchende sekvens, der allerede er blevet tildelt en taksonomisk betegnelse (Beng & Corlett, 2020). Hvis databasen ikke allerede indeholder en matchende genetisk sekvens fra arten, som sekvensen af eDNA stammer fra, så kan sekvensen af eDNA ikke blive korrekt taksonomisk klassificeret (Aziz et al., 2017; Beng & Corlett, 2020; Prieto et al., 2024). I stedet kan sekvensen få tildelt en forkert taksonomi alt efter hvilke tærskelværdier, der anvendes (Beng & Corlett, 2020). Andre begrænsninger involverer at eDNA kan komme fra døde organismer, at udskillelses-raten af eDNA varierer mellem organismer, at organismer indeholder et forskelligt antal kopier af gener med mere (Beng & Corlett, 2020).

På trods af disse begrænsninger ser man stadig en stor udvikling i anvendelsen af eDNA til formålet af naturforvaltning og -beskyttelse på grund af metodens lave omkostninger, ikke-invasive tilgang, reproducerbarhed, tidsbesparende fremgangsmåde, og brede anvendelighed (Beng & Corlett, 2020). Der er dog begrænset vidensgrundlag for, om eDNA kan anvendes til at supplere eller erstatte de eksisterende metoder for vurderingen af naturtilstand og naturværdi på trods af metodens mange styrker.

Formål og Hypoteser

Denne rapport undersøger som et proof-of-concept, om der kan findes tegn på, at miljø-DNA (eDNA) kan anvendes som supplement til eller erstatning af de eksisterende metoder, der i Danmark anvendes til at vurdere tilstanden og kvaliteten af natur. Undersøgelsen baseres på en sammenligning af eDNA-profiler for planter, vertebrater, invertebrater fra luftprøver samt bakterier, arkæer og methanogener fra jordprøver, som er blevet indsamlet fra forskellige lokaliteter med varierende HNV-score i ét naturområde. Formålet er at afklare, om eDNA-profilen på en lokalitet afspejler lokalitetens HNV-score. Derudover vil der forsøges at finde arter og slægter som udelukkende forekommer i specifikke HNV-scoringer, og hvis forekomst derfor kunne være indikatorer for HNV-scoren. For at besvare formålet er følgende hypoteser blevet opstillet:

Hypotese 1: Lokationernes HNV-score vil udvise en positiv sammenhæng med artsrigdommen samt biodiversitet af eDNA, således at artsrigdommen og biodiversiteten stiger i takt med en stigende HNV-score.

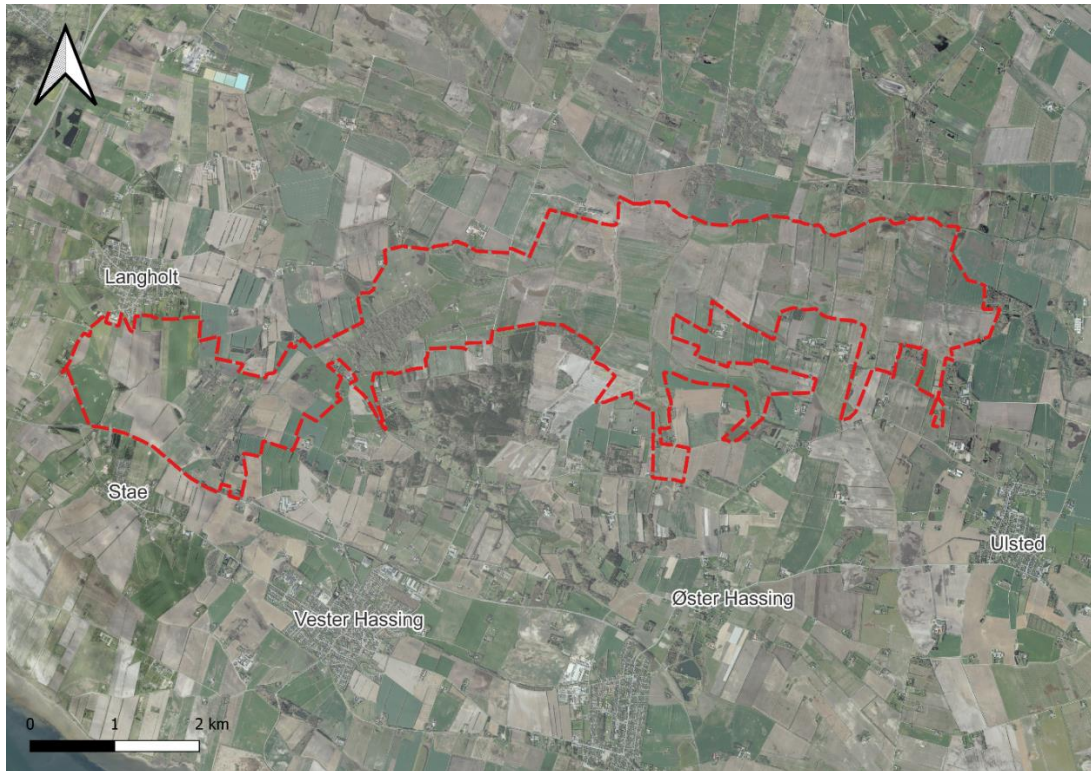
Hypotese 2: HNV-score eller grupperinger heraf kan adskilles på baggrund af eDNA-profiler, således at CCA og NMDS ordinationsplots kan finde forskel mellem prøver fra forskellige HNV-scoringer.

Hypotese 3: Der vil identificeres arter og slægter, som udelukkende forekommer i specifikke HNV-score eller grupperinger heraf, og hvis forekomst i de tilsvarende HNV-scoringer kan understøttes af eksisterende litteratur.

Metode

Områdebeskrivelse

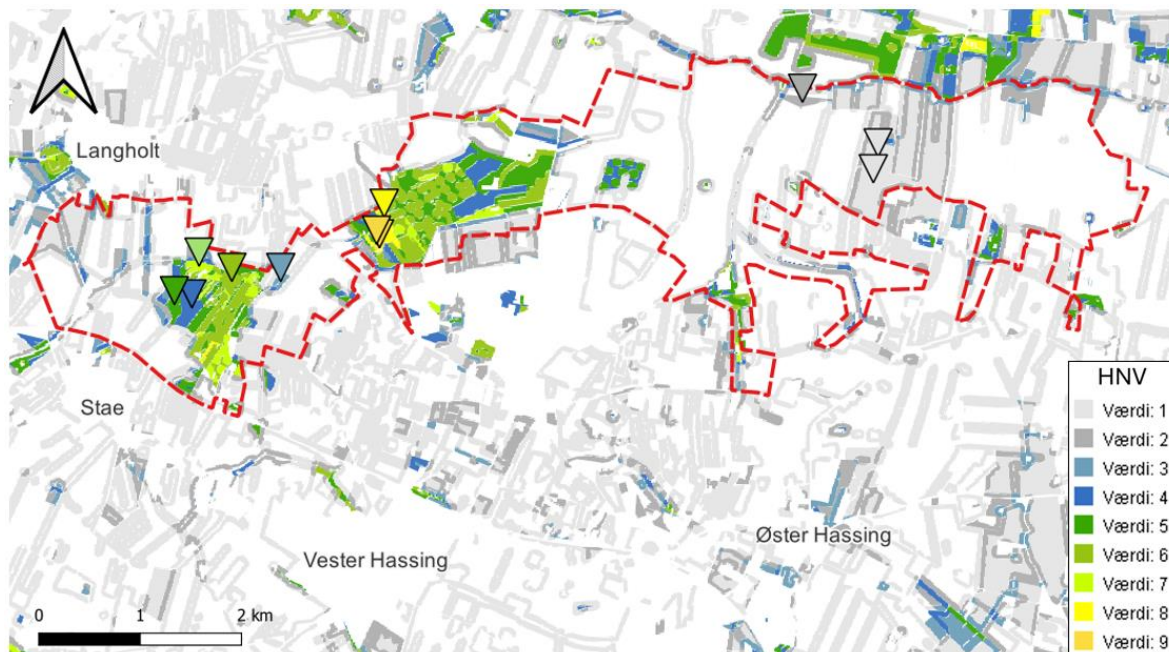
Prøveindsamlingsområdet fremover tiltalt som Bredeng, er et omtrent 1600 hektar område i Vendsyssel syd for Langholt og nord for Stæ, Vester Hassing, Øster Hassing samt Ulsted (Figur 4).



Figur 4: Kort over prøvetagningsområdet Bredeng, hvor det indtegnede område angiver den afgrænsning af projektområdet for lavbundsprojektet i Bredeng i 2024.

Bredeng er projektområde for et igangværende lavbundsprojekt af Limfjordsrådets Sekretariat, hvor vandstanden skal hæves for at reducere udledningen af kuldioxid. Den vestlige del af Bredeng indeholder mere paragraf 3 natur samt højere HNV-score end den østlige del, der i stedet er meget præget af landbrug og jagt.

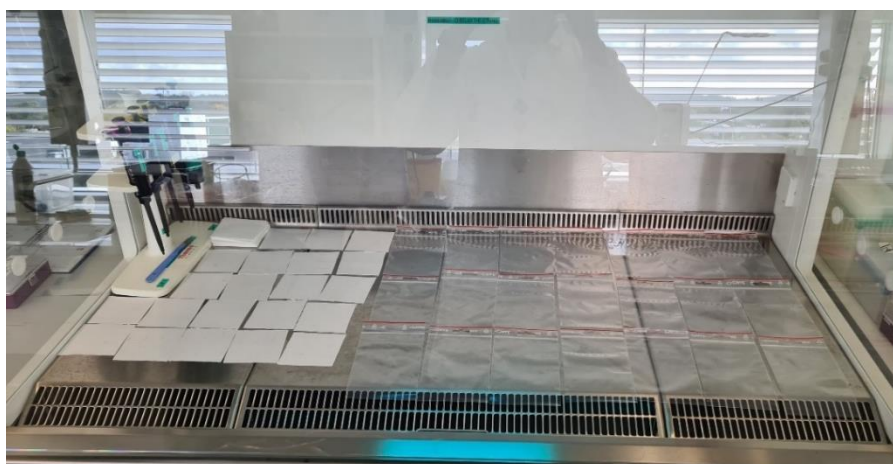
Lokationerne for prøveindsamling i Bredeng blev baseret på et transekt, som gik gennem hele projektområdet fra øst til vest. Ud fra dette transekt blev polygoner af HNV-scoring udvalgt, således at alle HNV-scoringer i Bredeng blev inkluderet. Derudover blev der lavet duplikater af den laveste og højeste score af henholdsvis 1 og 9, hvilket resulterede i et samlet antal af 11 prøvetagningslokationer. Den præcise lokation til prøveindsamling blev så defineret til at være centroiden af det tilsvarende polygon (Figur 5). Den centrale del af Bredeng kunne ikke inkluderes i prøveindsamlingen, da dette område enten indeholdt aktivt landbrug med græssende køer eller utilgængelig natur i form af moser.



Figur 5: Kort over HNV-scoring i prøvetagningsområdet Bredeng, hvor det indtegnede område angiver den nuværende afgrænsning af projektområdet for lavbundsprojektet i Bredeng. Punkterne angiver prøvetagningslokationerne, og farven af punkterne angiver HNV-scoringen af lokationen.

Prøveindsamling

Før prøveindsamlingen blev filtre til indsamling af luftprøver forberedt fra et Camfil EcoPleat Green Kompakt foldet panel filter bestående af 592x592x48 mm F7 finhed glasfiberpapir. I en LAF-bænk blev panelet åbnet og foldet ud, hvorefter plastiklamellerne, der holder panelet foldet, blev fjernet med en steril pincet. Det nu udfoldede glasfiberpapir blev så skåret ud i 8x8cm kvadrater med en steril skalpel. Disse filtre blev herefter UV-behandlet i 30 min på hver side med et tilsvarende antal ziplock-posere (Figur 6). Filtrene blev så overført til separate ziplock-posere.



Figur 6: Udskårne kvadrater af glasfiberpapir og ziplock-posere, som undergår UV-behandling i en LAF-bænk.

Prøveindsamling blev foretaget d. 4/10, 5/10, 6/10, 10/10, 12/10 og d. 14/10 i år 2024. Indsamling af luft- og jordprøver blev udført sterilt efter bedste evne iført nitrilhandsker, hvor nitrilhandsker såvel som redskaber blev behandlet med 80% ethanol når muligt.

Indsamling af Luftprøver

Luftprøver blev indsamlet ved brug af en Sanyo Denki Centrifugalblæser, 65.3cfm, 12 V DC, 97x97x33 mm, San Ace B97 Serien (Sanyo Denki, Japan). Centrifugalblæseren var fikseret til en plexiglasplade på en tripod og forbundet til en Power Station AC 300 (Sandberg A/S, Danmark) batteri (Figur 7). Denne opstilling refereres til fremover som en luftpumpe.



Figur 7: Luftpumpe bestående af en centrifugalblæser fikseret til en plexiglasplade og drevet af et batteri.

Højden af luftpumpen blev indstillet på den tilhørende tripod, således at åbningen af luftpumpen stod i en 1 m højde. Et af de forberedte filtre blev sat på pumpen med en steriliseret pincet og fæstnet med et steriliseret 3D-printet mundstykke, hvorefter luftpumpen blev tændt og trak luft gennem filtret i 90 minutter, hvilket tilsvarede omtrent 2548,5 L luft givet kapaciteten af centrifugalblæseren. Herefter blev filtret afmonteret og rullet sammen med en steriliseret pincet, således at siden, hvor luften blev trukket igennem, vendte indad. Det sammenrullede filter blev så overført til et 50 mL greinerrør, der blev lukket tæt og overført til en køleboks indeholdende køleelementer nedfrosset til $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Indsamling af Jordprøver

I samme tidsrum luftpumpen var tændt, blev jordprøver indsamlet. Prøverne blev indsamlet fra en dybde af 20 til 40 cm fra ét hul per lokation gravet med en spade. Her blev jorden skrabet fra siden af hullet ned i en 4L plastik frysepose med en plastik engangsske, således at der blev udtaget den samme mængde jord fra hele dybden. En knude blev bundet på fryseposen med jord, og posen blev herefter hurtigst muligt overført til en køleboks indeholdende kølelementer nedfrosset til $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. I tidsrummet luftpumpen var tændt, blev temperaturen målt med et elektrisk termometer og den gennemsnitlige og maksimale vindhastighed målt med et DT.82 MINI ANEMOMETER (CEM INSTRUMENTS, Indien).

Ved hjemkomst til laboratoriet blev både luft- og jordprøverne blev hurtigst muligt overført fra køleboksen til en fryser indstillet til $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

DNA-Ekstrahering

DNA fra luftprøverne blev ekstraheret ved anvendelse af DNeasy® PowerWater® Kit (Qiagen, Tyskland) på filtrene fra luftpumpen. Protokollen blev modificeret således at der blev anvendt 1,5 mL Solution PW1 i skridt 5 og prøverne blev vortexet og centrifugeret i henholdsvis 10 og 2 min. Dette blev gjort for at fragmentere og separere filteret tilstrækkeligt fra opløsningen. Endeligt blev prøverne elueret i 50 µL nukleasefrit vand i stedet for de anbefalede 100 µL for at opkoncentrere DNA.

Jordprøverne blev før ekstrahering homogeniseret ved manuel blanding, mens jorden stadig var i de aflukket fryseposer. Herefter blev 500 mg jord udtaget fra hver prøve, og DNA blev så ekstraheret fra hver prøve ved brug af FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA) efter fabrikantens instrukser med undtagelsen, at prøverne til sidst blev elueret i 150 µL nukleasefrit vand i stedet for de anbefalede 50-100 µL.

Koncentrationen af DNA i hver prøve blev herefter kontrolleret med enten Quibit® 4 fluorescens måler (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) eller Tecan Infinite® 200 PRO fluorescens måler (Tecan, Schweiz).

Amplicon PCR

Til amplicon PCR blev der udvalgt tre forskellige primerpar til luftprøverne til identificering af planter, vertebrater og invertebrater og tre forskellige primerpar til jordprøverne til identificering af bakterier, arkæer og methanogener (Tabel 1). Disse primerpar blev udvalgt baseret på deres forskellige amplicon længder samt hvilke taksonomiske grupper, de er designet til at identificere. Følgende tabel indeholder målgruppe, navn og længde af primerparrene, samt hvilket navn de fremover tillaes som:

Tabel 1: Primerparrene anvendt til at målrette planter, vertebrater, invertebrater, bakterier, arkæer og methanogener.

Målgruppe	Primerpar Navn	Forkortet Navn	Længde (basepar)	Kilde
Planter	357F%556R	rbcl gen	199	(Aziz et al., 2017)
Vertebrater	16SA-L%16SB-H	Vertebrat 16S rRNA gen	550	(Vences et al., 2005)
Invertebrater	LCO1490%HCO2198	COI gen	710	(Folmer et al., 1994)
Bakterier	FL16S-27F%FL16S-1378R	Bakterie 16S rRNA gen	1351	(Ward et al., 2012).
Arkæer	SSU1ArF%SSU1000ArR	Arkæ 16S rRNA gen	1000	(Bahram et al., 2019)
Methanogener	32-mer%23-mer	mcrA gen	464-491	(Luton et al., 2002)

Primerparrene for vertebrat 16S rRNA genet og rbcl genet (planter) var før forsøget blevet testet og optimeret imod fire andre primerpar på en testprøve indsamlet d. 19/11-2024, hvor de efter amplificering og kvalitetskontrol blev vurderet til at være de mest effektive primerpar til at identificere henholdsvis vertebrater og planter. De resterende primerpar er udvalgt baseret på deres almene anvendelse til at identificere deres tilsvarende taksonomiske grupper.

Sekventering af amplicons blev udført med en PromethION R.10.4.1 Flow Cell (Oxford Nanopore Technologies plc, UK), så hver af disse primerpar havde følgende Nanopore barcode adapters tilføjet til henholdsvis forward primer TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC og reverse primer ACTTGCCTGT-CGCTCTATCTTC.

Det anvendte mastermix for hver prøve bestod af 25 µL PCR BIO 2x Ultra Mix (PCR biosystems, Great Britain), 2 µL af 10 µM forward primer og 2 µL af 10 µM reverse primer. Mængden af nukleatsefrit vand og prøve DNA tilføjet til mastermix varierede alt efter prøve og primer, men der blev tilsigtet at tilføje omtrent 20 ng prøve DNA til hvert mastermix. I tilfælde hvor 20 ng ikke kunne opnås, blev der tilføjet så meget prøve DNA som muligt. Hvert mastermix med prøve var herefter opdelt i to 25 µL portioner før amplicon PCR, således at amplicon PCR af hver portion blev udført i separate VWR® termiske cyklere (VWR, USA). Temperaturer, tider og antal cykler for PCR-reaktionerne for hvert primerpar kan findes i Bilag 1-6.

Efter amplicon PCR blev der udført clean-up på hver prøve med AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc, USA) i volumenforholdende 2:1 og 0,8:1 AMPure XP beads til PCR-produkt for henholdsvis luft- og jordprøver. Efter cleanup blev koncentrationen af hver prøve målt med enten Qubit® 4 fluorescens måler eller Tecan Infinite® 200 PRO fluorescens måler, og længden af amplicons for tre tilfældige prøver per primerpar blev kontrolleret med et 4150 TapeStation System (Agilent, USA) ved brug af High Sensitivity D1000 og D1000 ScreenTape.

Barcoding PCR og Sekventering

Før barcoding PCR blev amplicons fra samme lokation og med forskellige længder ækvimolært poollet, således at den poollet opløsning havde en koncentration på 8,3 fmol/µL. Dette blev gjort da amplicons på samme barcode men med forskellige længder kan separeres gennem databehandling efter sekventering. Amplicons blev poollet således:

Amplicons af vertebrat 16S rRNA genet (Ca. 550 bp) og COI genet (Ca. 710 bp) blev poollet. Amplicons fra arkæ 16S rRNA genet (Ca. 1000 bp), rbcL genet (Ca. 209 bp) og mcrA genet for methanogener (Ca. 478 bp) blev poollet. Amplicons for bakterie 16S rRNA genet (Ca. 1351 bp) blev dog ikke poollet med andre amplicons og blev i stedet fortyndet til en koncentration på 8,3 fmol/ µL.

De pooled prøver samt bakterie 16S rRNA amplicons gennemgik herefter barcoding PCR og library preparation ved brug af protokollen PCR Barcoding Expansion Pack 1-96 (EXP-PBC096) efter fabrikantens anvisninger. Gennem anvendelsen af denne protokol gennemgik amplicons barcoding PCR, blev herefter poollet til én samlet prøve, blev så end-prepped og fik sidst ligeret adapters, således at prøven var klar til loading på en PromethION Flow Cell. Hver gang end-prep, liggering eller pooling blev udført, blev der efterfølgende udført en clean-up ved brug af AMPure XP beads. En PromethION Flow Cell blev så primet, hvorefter den pooled prøve med amplicons blev loadet og sekventeret med live basecalling.

Databehandling

OTU-tabellerne blev efter sekventeringen taksonomisk klassificeret ved brug af forskellige databaser. OTU-tabellen for rbcL genet blev identificeret ved brug af en omformatet version af "rbcL July library"-databasen (Bell, 2021). OTU-tabellerne for vertebrat 16S rRNA- og COI genet blev identificeret ved brug af MIDORI2-databasen (Version: GenBank265). OTU-tabellerne for bakterie- og arkæ 16S rRNA genet blev identificeret ved brug af GreenGenes2-databasen (Version: 2024.09). OTU-tabellen for mcrA genet blev identificeret ved brug af en kureret database af 17790 mcrA-sekvenser fra BLASTn (Version: BLASTn 2.14.1).

OTU-tabellerne med taksonomi blev så importeret og loadet i R Studio (Version: 2024.12.1+563) og behandlet med Ampvis2-pakken (Version: 2.8.9). Under importering blev singletons frafiltreret fra alle OTU-tabeller. Derudover blev der tilføjet en ny variabel til alle prøver kaldet HNV-kategori baseret på deres tilsvarende HNV-score. Prøver med en HNV-score fra 1 til 3 fik en HNV-kategori på "L" (lav). Prøver med en HNV-score fra 4 til 6 fik en HNV-kategori på "M" (mellem). Prøver med en HNV-score på 7 til 9 fik en HNV-kategori på "H" (høj). Rarefaction-kurver blev så lavet for alle ufiltreret OTU-tabeller.

Herefter blev hver OTU-tabel filtreret og behandlet individuelt. Alle OTUs med ordenen ingefær (*Zingiberales*) blev frafiltreret fra rbcL genet. OTUs med slægterne svin (*Sus*), egentlige okser (*Bos*) og junglehøns (*Gallus*) blev frafiltreret fra vertebrat 16S rRNA genet, og en af prøverne med en HNV-score på ni blev fjernet grundet en ikke repræsentativ fordeling af taksonomi. Derudover blev uklassificeret OTUs fra vertebrat 16S rRNA filtreret fra, hvis de havde en relativ proportion i top ti samt matchede med mennesker (*Homo sapiens*) i BLASTn. Rækkerne sæksvampe (*Ascomycota*), ægsporesvampe (*Oomycota*), basidiesvampe (*Basidiomycota*), grønalger (*Chlorophyta*) samt svampe fra rækken *Mucoromycota* blev filtreret fra COI genet. Prøven med en HNV-score på to blev filtreret fra bakterie 16S rRNA genet grundet et lavt antal reads. En af prøverne med en HNV-score på ét og prøven med en HNV-score på seks blev filtreret fra arkæ 16S rRNA genet grundet henholdsvis et lavt antal reads og en ikke repræsentativ fordeling af taksonomi. En af prøverne med en HNV-score på ni og prøven med en HNV-score på seks blev filtreret fra mcrA genet grundet henholdsvis et lavt antal reads og en ikke repræsentativ fordeling af taksonomi.

Efter filtrering blev Chao1- samt Shannon-indekset udregnet for hver prøve i alle OTU-tabeller. Chao1-indekset anvendes til at estimere den reelle artsrigdom af OTUs ved at estimere antallet af arter, der muligvis ikke er blevet detekteret.

$$Chao1 = N_{obs} + \frac{S^2}{2 * D},$$

$N =$ antal observeret arter, $S =$ antal arter observeret én gang,
 $D =$ antal arter observeret to gange

Resultater af Chao1-indekset vil fremover tiltales som artsrigdom, men det skal understreges at indekset i denne rapport anvendes på OTUs, og artsrigdommen er derfor også et mål for genetisk rigdom. Shannon-indekset anvendes i stedet til at udregne ligheden (evenness) af den relative abundans af arter som et mål for biodiversitet, og resultater af Shannon-indekset vil derfor fremover tiltales som biodiversitet.

$$Shannon = - \sum p_i * \ln(p_i)$$

$p_i =$ proportionen af hele artsrigdommen som arten i udgør

Shannon-indekset udregnes for alle arter i en prøve og lægges efterfølgende sammen. En høj artsrigdom og en ligelig fordeling af arter leder til et højere Shannon-indeks. I denne rapport er Shannon-indekset anvendt på OTUs, og biodiversiteten er derved også et mål for genetisk diversitet.

Lineære regressioner blev lavet for både Chao1- og Shannon-indekset ved brug af Pearson's korrelations koefficient, hvor R^2 - og tilhørende p -værdier blev udregnet med et signifikans-niveau på $\alpha \leq 0,05$.

Heatmaps på slægts-niveau på tværs af HNV-scorer blev så lavet. Dernæst blev NMDS-og CCA-plots for HNV-scorer og HNV-kategorier også produceret for alle OTU-tabeller, hvori der blev testet for signifikant korrelation med den gennemsnitlige vindhastighed, maksimale vindhastighed, temperatur, lufttryk og luftfugtighed med $\alpha \leq 0,005$ som signifikans-niveau.

OTU-tabellerne blev herefter anvendt til at sammenholde arts- og slægtssammensætningen i prøverne ved brug af Venn-diagrammer, for undersøge hvilke slægter og arter der udelukkende forekommer i hver HNV-kategori. Til dette formål blev OTU-tabellerne for vertebrat 16S rRNA- og COI genet yderligere filtreret for at fjerne kontamineringer i form af OTUs uden taksonomi fra utilsigtet organismer. OTU-tabellen for vertebrat 16S rRNA genet blev filtreret, så det udelukkende indeholdt OTUs fra ordnerne parrettåede hovdyr (*Artiodactyla*), hønsfugle (*Galliformes*), spurvefugle (*Passeriformes*), springpadder (*Anura*), gnavere (*Rodentia*), *Siphonostomatoidea* (En orden af marine vandlopper), græshopper (*Orthoptera*), rovdyr (*Carnivora*), flagermus (*Chiroptera*), andefugle (*Anseriformes*) og haredyr (*Lagomorpha*) samt OTUs fra klassen insekter (*Insecta*). OTU-tabellen for COI genet blev filtreret, så det udelukkende indeholdte OTUs fra rækken leddyr (*Arthropoda*).

Herefter blev der produceret et Venn-diagram for OTUs på tværs af HNV-kategorierne for hver OTU-tabel, således at der kunne findes arter og slægte som udelukkende forekom i specifikke HNV-kategorier. Inklusion af OTUs i diagrammet blev baseret på frekvensen af reads, så kun OTUs i de øverste percentil af reads blev inkluderet, således at der ikke blev inkluderet OTUs med et lavt antal af reads. Grunden til dette var, at der ikke blev fundet betydeligt flere nye arter og slægte, hvis flere OTUs blev inkluderet, og det reducerede det manuelle arbejde særdeles.

For Venn-diagrammerne af rbcL-, vertebrat 16S rRNA-, arkæ 16S rRNA- og mcrA genet blev OTUs anvendt, der havde et antal reads inden for de øverste 20 percentil. For bakterie 16S rRNA genet blev OTUs anvendt, der havde et antal reads inden for de øverste 30 percentil. For COI genet blev OTUs anvendt, der havde reads inden for de øverste 50 percentil.

Konsensussekvenser for de inkluderede OTUs blev herefter taksonomisk identificeret med BLASTn, hvor en tærskelværdi for procent identitet (*per. ident*) blev sat til 98 %. Procent identitet angiver den andel af nukleotider i sekvensen, der er identiske med reference-sekvensen over den sammenlignede længde. Søgeresultat med den højeste procent identitet for hvert OTU blev så anvendt til at lave et Venn-diagram for arter og slægte på tværs af HNV-kategorierne, hvis søgeresultatet havde en procent identitet over tærskelværdien. Billeder for arter og slægte blev derudover inkluderet i Venn-diagrammerne for rbcL-, vertebrat 16S rRNA- og COI genet.

Statistik

Pearson's korrelationskoefficient måler den lineære korrelation mellem to variabler, og udregnes med følgende formel (Obilor & Amadi, 2018):

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}},$$

x_i = værdi af første variabel, \bar{x} = gennemsnit af første variabel,

y_i = værdi af andet variabel, \bar{y} = gennemsnit af andet variabel

Den resulterende korrelationskoefficient kan have en værdi mellem -1 og 1. Hvis værdien er negativ, så er korrelationen negativ, og omvendt hvis den er positiv, så er korrelationen positiv (Obilor & Amadi, 2018). En perfekt lineær korrelation mellem de to variabler resulterer i en værdi på 1 eller -1, mens hvis korrelationen slet ikke er lineær, resulterer det i en værdi på 0 (Obilor & Amadi, 2018). Korrelationskoefficienten kan anvendes til at udregne en tilsvarende R^2 -værdi og t -statistik ved brug af følgende formler:

$$R^2 = r^2$$

$$t = \frac{r * \sqrt{n - 2}}{\sqrt{1 - R^2}}, n = \text{antal observationer}$$

En p -værdi for den lineære korrelation kan så findes ved eksempelvis opslag i en t -tabel.

Canonical Correspondence Analyse (CCA) er en constrained analyse, der anvendes til at lave approksimationer af unimodale forhold mellem en liste af arter eller OTUs og udvalgte forklarende miljøvariabler (Makarencov & Legendre, 2002). Analysen anvendes til at forklare hvordan kompositionen af arter eller OTUs afhænger af de udvalgte forklarende miljøvariabler og resulterer i to ordinationsakser, der tilnærmelsesvis repræsenterer gradienter i proportionerne af arter eller OTUs som beskrevet af de constrained forklarende miljøvariabler (Makarencov & Legendre, 2002). Eksempelvis kan en højere relativ proportion af én art eller ét OTU lede til en højere værdi på den første ordinationsakse for den tilsvarende prøve, mens en højere relativ proportion af en anden art eller OTU kan lede til en højere værdi på den anden akse.

Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) analyse er baseret på iterative udregninger og er modsat CCA ikke constrained til specifikke miljøvariabler, og metoden anvendes til at kortlægge forskellen i kompositionen af arter eller OTUs (Zhu & Yu, 2009). Til hvert NMDS-plot udregnes en tilsvarende stress-værdi, der beskriver om de to ordinationsakser er en god repræsentation af de reduceret dimensioner (Zhu & Yu, 2009). En stress-værdi på over 0,3 betyder, at repræsentationen er dårlig. En stress-værdi på under 0,2 betyder, at repræsentationen er god. En stress værdi på under 0,1 betyder, at repræsentationen er meget god.

Resultater

Sekvenseringsdybden blev testet med rarefaction-kurver, hvor kurverne for alle gener stadig steg med kun lille afbøjning (Bilag 6-11). Dette indikerer at prøverne ikke blev tilstrækkeligt sekventeret til at repræsentere den reelle genetiske diversitet i prøverne.

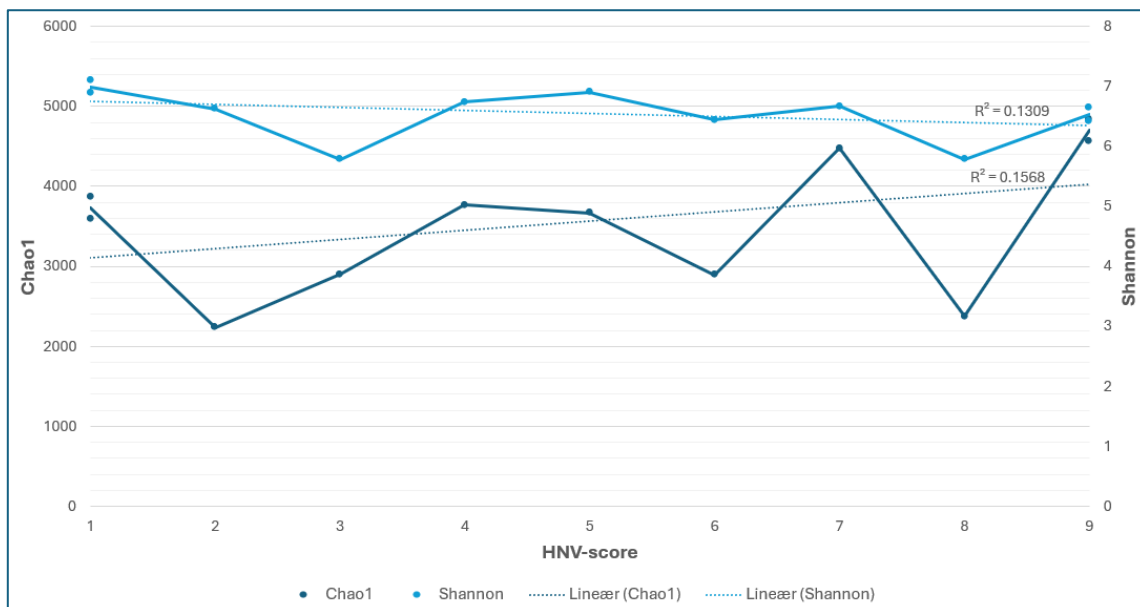
Efter filtrering af OTU-tabellerne havde de følgende gennemsnitlige antal reads per prøve og totale antal reads per OTU-tabel, hvor *rbcl* genet (planter), bakterie 16S rRNA genet og *mcrA* genet (methanogener) viste et betydeligt højere totalt og gennemsnitligt antal reads (Tabel 2).

Tabel 2: Det totale antal reads per gen samt det gennemsnitlige antal reads per prøve per gen.

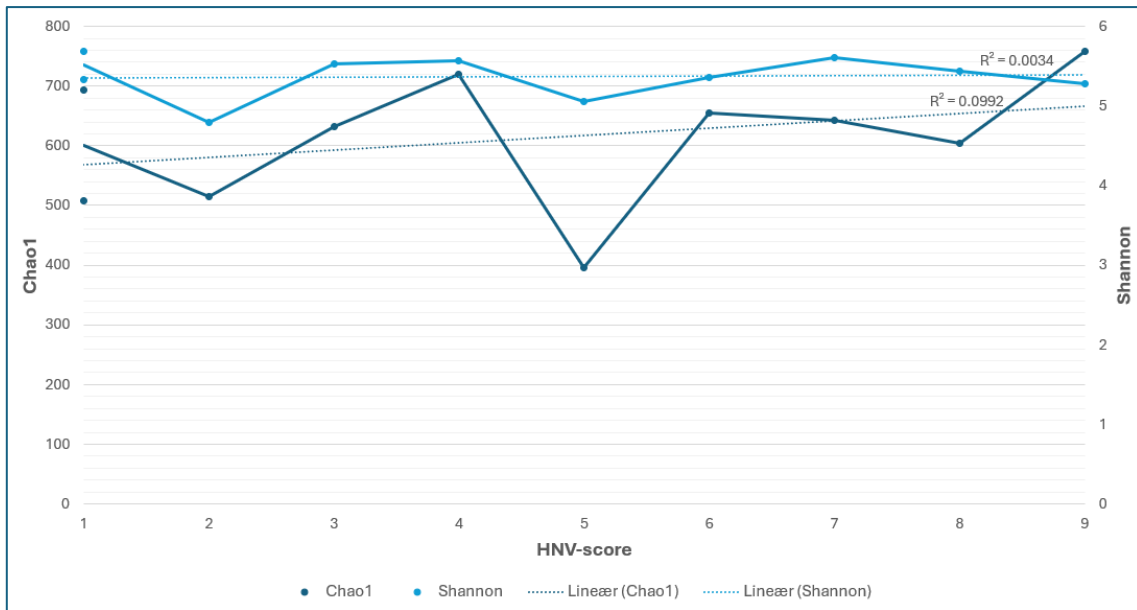
Gen	Total reads	Gennemsnit reads
rbcl	15407	1400,6
Vertebrat 16S rRNA	5952	595,2
COI	3761	341,9
Bakterie 16S rRNA	21978	2197,8
Arkæ 16S rRNA	9076	1008,4
mcrA	17826	1980,7

Alfa-Diversitet for Luftprøver

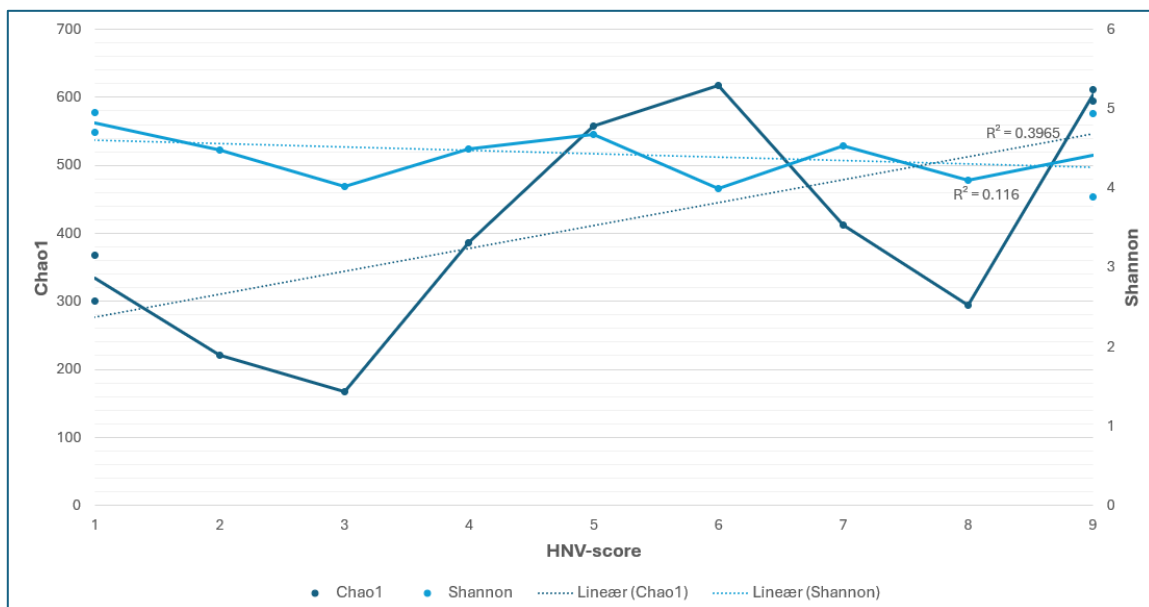
Artsrigdommen og biodiversiteten blev udregnet for luftprøverne med Chao1- og Shannon-indekset, hvor *rbcl* genet viste en højere artsrigthed og diversitet end indekserne for vertebrat 16S rRNA- og COI genet (Figur 8-10). HNV-scoren og diversitetsindeksene var kun fundet til at være signifikant korreleret for Chao1-indekset af COI genet ($R^2 = 0,397$; $p = 0,038$). De resterende korrelationer var ikke signifikante.



Figur 8: Alfa-diversiteten af prøverne for *rbcl* genet for hver HNV-score, hvor x-aksen angiver HNV-scoren og y-aksen angiver henholdsvis Chao1-indekset samt Shannon-indekset. Der er yderligere angivet en lineær regression for punkterne af Chao1-indekset ($p = 0,228$) og Shannon-indekset ($p = 0,274$) med en tilhørende R^2 -værdi.



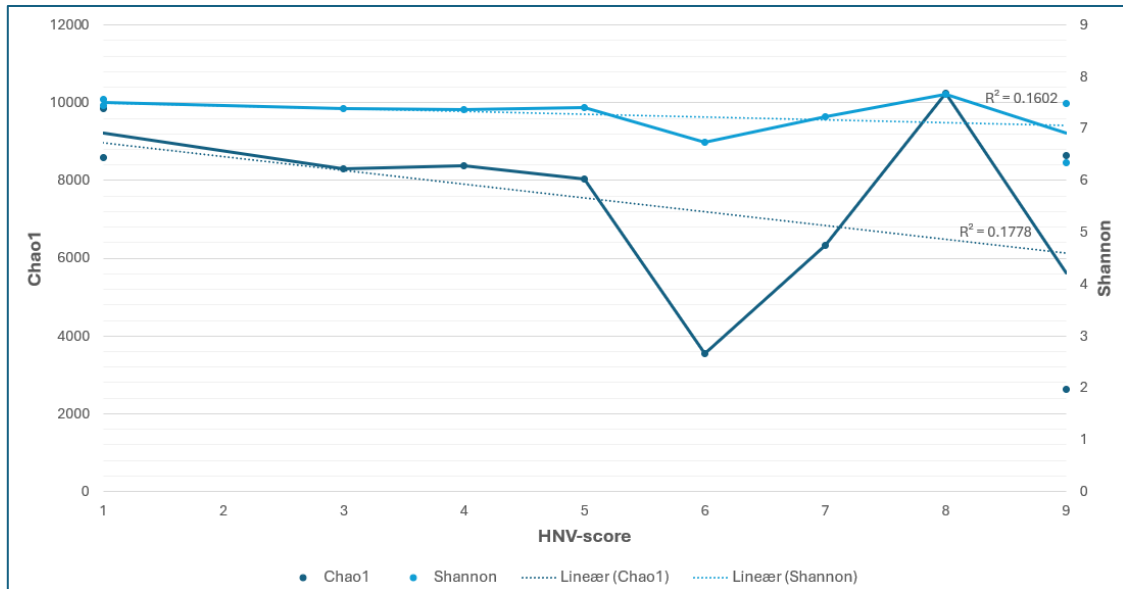
Figur 9: Alfa-diversiteten af prøverne for vertebrat 16S rRNA genen for hver HNV-score, hvor x-aksen angiver HNV-scoren og y-aksen angiver henholdsvis Chao1-indekset samt Shannon-indekset. Der er yderligere angivet en lineær regression for punkterne af Chao1-indekset ($p = 0,375$) og Shannon-indekset ($p = 0,872$) med en tilhørende R^2 -værdi.



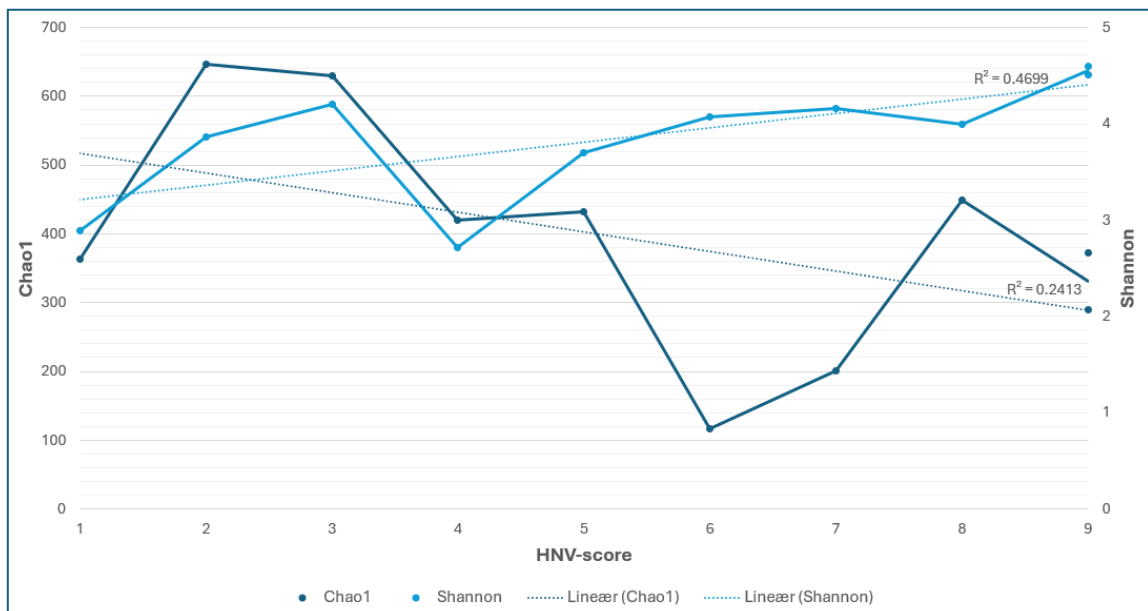
Figur 10: Alfa-diversiteten af prøverne for COI genen for hver HNV-score, hvor x-aksen angiver HNV-scoren og y-aksen angiver henholdsvis Chao1-indekset samt Shannon-indekset. Der er yderligere angivet en lineær regression for punkterne af Chao1-indekset ($p = 0,038$) og Shannon-indekset ($p = 0,305$) med en tilhørende R^2 -værdi.

Alfa-Diversitet for Jordprøver

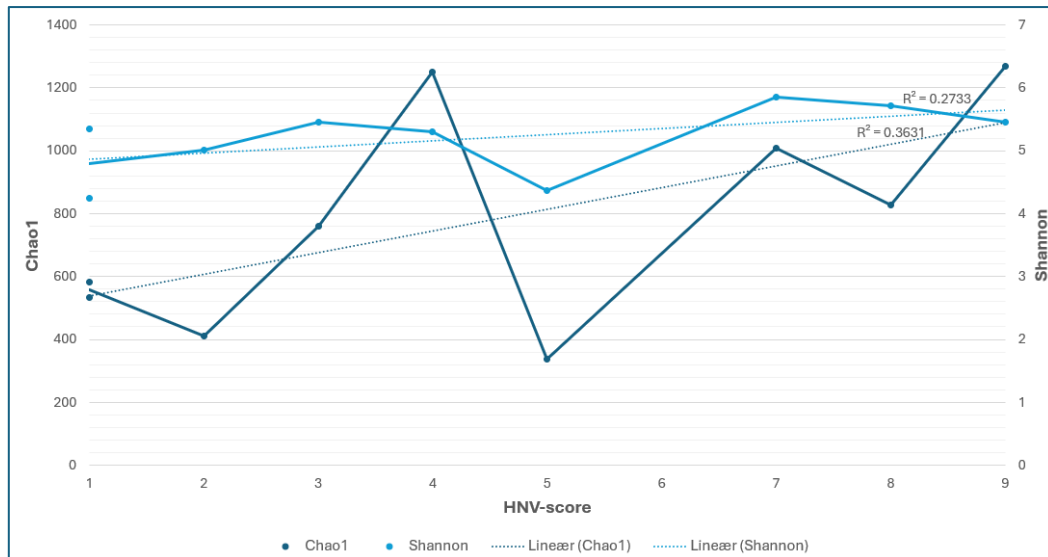
Artsrigdommen og biodiversiteten af blev også udregnet for jordprøverne med Chao1- og Shannon-indekset, hvor bakterie 16S rRNA genet viste en højere artsrigthed og diversitet end indekserne for arkæ 16S rRNA- og mcrA genet (Figur 11-13). HNV-scoren og diversitetsindeksene var kun fundet til at være signifikant korreleret for Shannon-indekset af arkæ 16S rRNA genet ($R^2 = 0,470$; $p = 0,029$). De resterende korrelationer var ikke signifikante.



Figur 11: Alfa-diversiteten af prøverne for bakterie 16S rRNA genet for hver HNV-score, hvor x-aksen angiver HNV-scoren og y-aksen angiver henholdsvis Chao1-indekset samt Shannon-indekset. Der er yderligere angivet en lineær regression for punkterne af Chao1-indekset ($p = 0,225$) og Shannon-indekset ($p = 0,252$) med en tilhørende R^2 -værdi.



Figur 12: Alfa-diversiteten af prøverne for arkæ 16S rRNA genet for hver HNV-score, hvor x-aksen angiver HNV-scoren og y-aksen angiver henholdsvis Chao1-indekset samt Shannon-indekset. Der er yderligere angivet en lineær regression for punkterne af Chao1-indekset ($p = 0,149$) og Shannon-indekset ($p = 0,029$) med en tilhørende R^2 -værdi.



Figur 13: Alfa-diversiteten af prøverne for *mcrA* genet for hver HNV-score, hvor x-aksen angiver HNV-scoren og y-aksen angiver henholdsvis Chao1-indekset samt Shannon-indekset. Der er yderligere angivet en lineær regression for punkterne af Chao1-indekset ($p = 0,086$) og Shannon-indekset ($p = 0,149$) med en tilhørende R^2 -værdi.

Taksonomisk Sammensætning af Luftprøver

Der blev for *rbcL* genet fundet, at slægterne med den højeste relative proportion på tværs af HNV-score var henholdsvis nælde (*Urtica*), kløver (*Trifolium*), poppel (*Populus*) og ranunkel (*Ranunculus*) (Figur 14). Det kan tydes at prøven med en HNV-score på seks adskiller sig fra de andre HNV-scoringer på grund af den lave relative proportion af poppel, ranunkel, pil (*Salix*) og det OTU fra rækken *Streptophyta*. Derudover adskiller HNV-scoren på tre sig ved på grund af den høje relative proportion af det OTU fra rækken *Streptophyta* samt det OTU fra familien *Cupressaceae* og den lave proportion af pil.

Urticaceae; <i>Urtica</i>	21.9	7.4	15.3	19.5	20.5	16.9	16.6	16.2	15.7
Fabaceae; <i>Trifolium</i>	11.6	19.1	2.1	1.8	13.3	12.8	6.1	10.4	4.9
Salicaceae; <i>Populus</i>	2.2	1.3	0.3	11.6	3.9	0.1	0.4	4.3	11
Ranunculaceae; <i>Ranunculus</i>	3.1	1.5	1.1	1.3	1.6	0.1	13.9	2	5.7
Salicaceae; <i>Salix</i>	2	0.2	0	3.5	2.2	0	2.7	0.5	1.6
Række: <i>Streptophyta</i> ; NA	0.4	0.6	4.7	1.1	0.3	0	1.4	1.8	2.3
Polygonaceae; <i>Polygonum</i>	0.3	0.2	0.2	1.1	1.9	2.9	0.5	4.5	0.6
Betulaceae; NA	0.5	0	0.6	0.1	1.8	0.3	0.5	2	1.6
Pinaceae; <i>Picea</i>	0.6	0.1	1.8	0.2	0.2	0.2	1.5	1.8	1.2
Cupressaceae; NA	0.1	0.1	5.3	0	0	0	0.1	0.2	0.6
Resterende taxa (1854)	57.2	69.5	68.6	59.7	54.2	66.8	56.2	56.4	54.9
	1	2	3	4	5	6	7	8	9

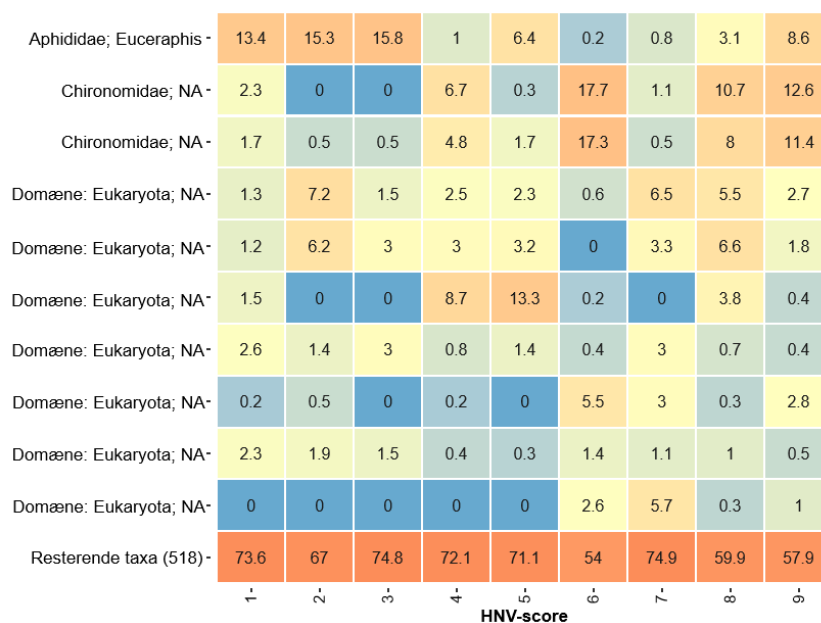
Figur 14: Heatmap på slægtsniveau for *rbcL* genet, hvor x-aksen indikerer HNV-score og y-aksen angiver familie efterfulgt af slægt. Hvis der ikke var angivet slægt for grupperne, angiver y-aksen i stedet det laveste tilgængelige taksonomiske niveau efterfulgt af NA.

For vertebrat 16S rRNA genet blev der fundet, at slægterne med den højeste relative proportion på tværs af HNV-score var henholdsvis frø (*Rana*), tudse (*Bufo*) og allike (*Coloeus*) (Figur 15). Derudover havde et OTU fra finke-familien (*Fringillidae*) den tredje højeste relative proportion på tværs af HNV-score. Det fremgår tydeligt på heatmappen, at mange af slægterne kun forekommer i enkelte eller få HNV-scoringer.

Ranidae; Rana	0.2	17.5	3.1	0	0	0	0	0	7.9
Bufo; Bufonidae; Bufo	5.8	0	0	0	0	0.3	0	7.8	0
Fringillidae; NA	0.1	0.4	0.1	0.4	0	5.9	0.8	2	5.5
Corvidae; Coloeus	0.5	0.4	0.1	6.1	0	0	1.9	1.2	2.6
Caligidae; Caligus	1.2	1.1	1.4	1.2	0.8	1	2.3	1	0.9
Muridae; Rattus	0.1	1.5	0	3.8	0	0	0.3	5.3	0.2
Cervidae; Capreolus	1.1	1.5	1.5	0.1	1.6	0.3	0	0.6	2.4
Fringillidae; NA	0	0.4	0	0.4	0	4.5	0	1.6	3.1
Fringillidae; Fringilla	0.9	2.2	0.4	0.5	0	2.5	0	0.1	2
Phasianidae; Phasianus	1	1.1	0	0.5	0	3	0.8	0	1.1
Resterende taxa (791)	89.3	74.1	93.3	86.8	97.6	82.6	94	80.3	74.3
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	HNV-score								

Figur 15: Heatmap på slægtsniveau for vertebrat 16S rRNA genet, hvor x-aksen indikerer HNV-score og y-aksen angiver familie efterfulgt af slægt. Hvis der ikke var angivet slægt for grupperne, angiver y-aksen i stedet det laveste tilgængelige taksonomiske niveau efterfulgt af NA.

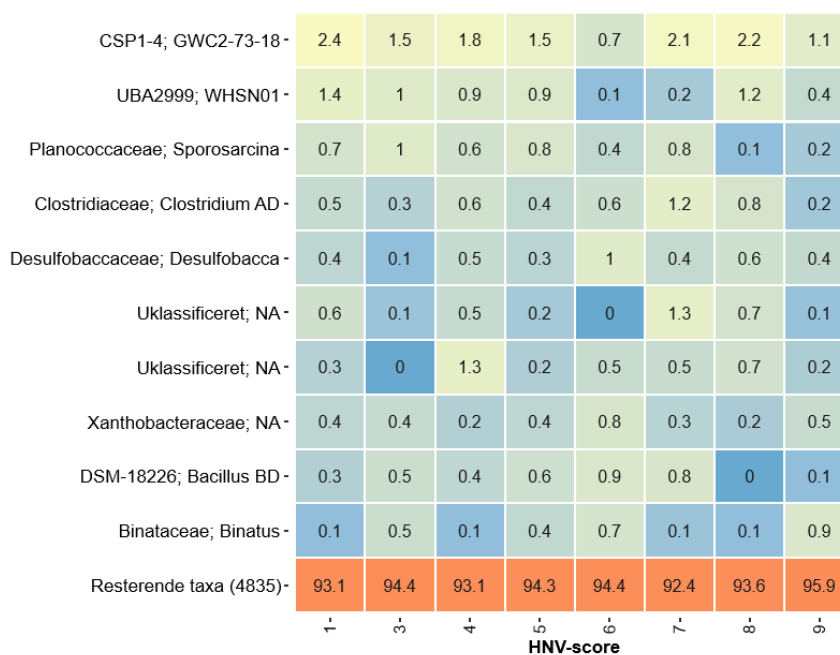
Der blev for COI fundet at slægten med den højeste relative proportion var bladlus (*Euceraphis*) (Figur 16). Resten af heatmappen viste udelukkende OTUs klassificeret til henholdsvis dansemyg-familien (*Chironomidae*) eller det eukaryote domæne. Der kan tydes at bladlus har en højere relativ proportion i HNV-scoringer på tre og under, mens dansemyg-familien har en højere relativ proportion i de HNV-scoringer på seks, otte og ni. Desuden forekommer der også svage mønstre for OTUs klassificeret til det eukaryote domæne. Eksempelvis ses der at det OTU i rank 10 udelukkende forekommer i HNV-score på seks og højere.



Figur 16: Heatmap på slægtsniveau for COI genet, hvor x-aksen indikerer HNV-score og y-aksen angiver familie efterfulgt af slægt. Hvis der ikke var angivet slægt for grupperne, angiver y-aksen i stedet det laveste tilgængelige taksonomiske niveau efterfulgt af NA.

Taksonomisk Sammensætning af Jordprøver

Der blev for bakterie 16S rRNA genet fundet, at slægterne med den højeste relative proportion på tværs af HNV-score var de uklassificeret *GWC2-73-18* og *WHSN01* efterfulgt af *Sporosarcina* og *Clostridium* (Figur 17). Prøverne fra hver HNV-score er meget divers og der ses hverken nogle meget dominerende slægte eller tydelige mønstre. Der kan dog anes mønstre som eksempelvis at *Sporosarcina* og *Bacillus BD* har mindre relative proportioner i HNV-scoringer på otte og ni.



Figur 17: Heatmap på slægtsniveau for bakterie 16S rRNA genet, hvor x-aksen indikerer HNV-score og y-aksen angiver familie efterfulgt af slægt. Hvis der ikke var angivet slægt for grupperne, angiver y-aksen i stedet det laveste tilgængelige taksonomiske niveau efterfulgt af NA.

For arkæ 16S rRNA genet blev der fundet, at ingen af grupperingerne af de ti OTUs med de højeste relative proportioner kunne navngives, da alle disse OTUs var uklassificeret af den tilsvarende database (Figur 18). På trods af den manglende taksonomi kunne der stadig ses forskel mellem de relative proportioner på tværs af HNV-score. Prøven fra lokationen med HNV-score på tre tydes at adskille sig fra de resterende på grund af den lave relative proportion af det OTU i rank ét, der har den højeste eller næsthøjeste relative proportion i alle andre HNV-scoringer.

Uklassificeret; NA -	28	17.1	1.8	39.2	20.7	13	13	5.3
Uklassificeret; NA -	16.9	8.8	0.4	27.4	12.6	2.5	6.8	1.9
Uklassificeret; NA -	12.5	11.5	0.1	2.2	0.4	0	15.7	2.3
Uklassificeret; NA -	0.5	6.7	16.4	0.1	11.8	0	0	2.9
Uklassificeret; NA -	14.4	9.6	0.2	1	0.1	0.6	11	1.7
Uklassificeret; NA -	0.1	2.7	8	0.1	5.1	2.5	3.6	4.8
Uklassificeret; NA -	0	3.8	7.4	0	6.9	0	0.1	0.9
Uklassificeret; NA -	0.1	1.3	6	0	1.6	0	0	1.7
Uklassificeret; NA -	0.1	1.7	4.9	0	0.2	0.6	0	1.7
Uklassificeret; NA -	0	0.6	1.5	0	3.1	0.6	1.5	1.7
Resterende taxa (656) -	27.6	36.1	53.4	30.1	37.5	80.1	48.1	75.3
	1	2	3	4	5	7	8	9
	HNV-score							

Figur 18: Heatmap på slægtsniveau for arkæ 16S rRNA genet, hvor x-aksen indikerer HNV-score og y-aksen angiver familie efterfulgt af slægt. Hvis der ikke var angivet slægt for grupperne, angiver y-aksen i stedet det laveste tilgængelige taksonomiske niveau efterfulgt af NA.

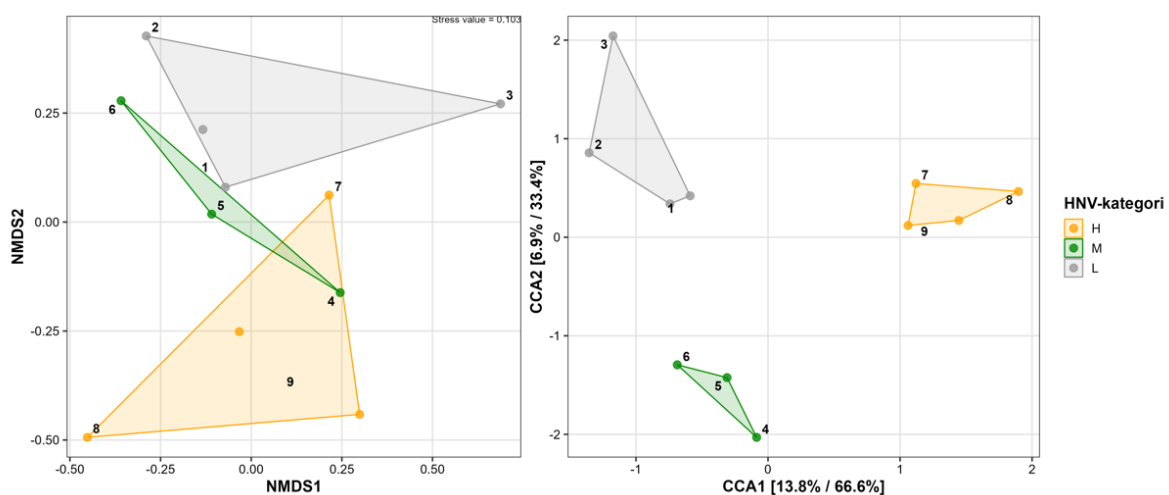
For mcrA genet blev der fundet, at slægten med den højeste relative proportion var henholdsvis *Methanosarcina*, *Methanobacterium*, *Methanocella* og *Methanoperedens* (Figur 19). Her kunne der igen findes forskel i relative proportioner på tværs af HNV-score. Prøven fra HNV-scoringen på to adskilte sig fra de andre HNV-scoringer, eftersom den havde en meget høj relativ proportion af *Methanoperedens*. Ligeledes havde HNV-scoringen på ét en meget høj relativ proportion af *Methanosphaera* sammenlignet med de andre HNV-scoringer. Der kunne ikke findes nogle tydelige mønstre i de relative proportioner på tværs af HNV-scoringer, men der kunne anes svage mønstre, såsom at *Methanosarcina* havde en lavere relativ proportion for HNV-scoring på syv og højere.

Methanosarcinaceae; Methanosarcina-	67.9	56.9	79	69.2	69.1	45.4	48.7	44.4
Methanobacteriaceae; Methanobacterium-	5.6	0.2	1.8	15.6	0.4	7.2	21.4	27.5
Methanocellaceae; Methanocella-	0.8	14.7	8.6	3.5	9.8	8.8	6.2	6.1
Methanoperedenaceae; Methanoperedens-	1.2	25.1	2	2.1	0.4	4	0.8	2.6
Methanoregulaceae; Methanoregula-	2.9	0.5	4.9	2.1	0	4	9.9	5.3
Methanotrichaceae; Fen-7-	3	0.7	0.2	0	15.1	4.2	0	2
Methanobacteriaceae; Methanosphaera-	8.3	0	0	0	0.4	0	0.3	0.3
Methanomicrobia; CAIKOD01-	0.7	0.3	0.3	2.6	0	3.8	3.7	1.7
Methanobacteriaceae; Methanobrevibacter-	4.4	0	1.4	0.5	0	0.3	0.3	0.4
Methanosaetaceae; Methanosaeta-	0.2	0	0.1	0	0	8.5	0	2.2
Resterende taxa (26)-	4.8	1.5	1.8	4.4	4.9	14	8.7	7.5
	1	2	3	4	5	6	7	8
	HNV-score							

Figur 19: Heatmap på slægtsniveau for *mcrA* genet, hvor x-aksen indikerer HNV-score og y-aksen angiver familie efterfulgt af slægt.

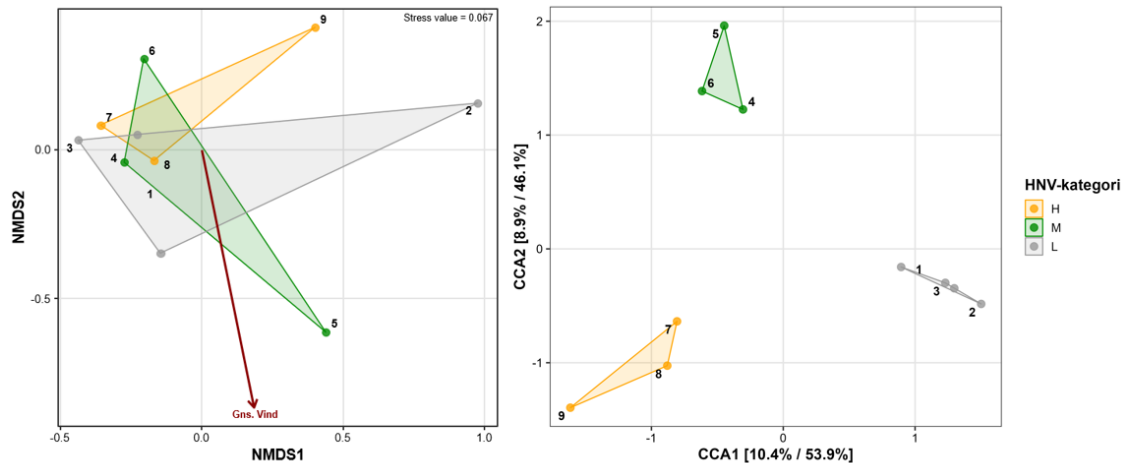
Beta-Diversitet for Luftprøver

For *rbcl* genet blev der fundet en adskillelse af eDNA-profilerne af alle HNV-kategoriene med undtagelsen af den mellem og høje HNV-kategori i NMDS-plottet, hvor prøven med en HNV-score på fire overlappede med den høje kategori (Figur 20). Hertil havde NMDS-plottet for *rbcl* genet en stress-værdi på 0,103, hvilket indikerer at ordinationsplottet er en god repræsentation af de reduceret dimensioner. CCA-plottet constrained til HNV-kategori viste en klar adskillelse af alle tre HNV-kategorier.



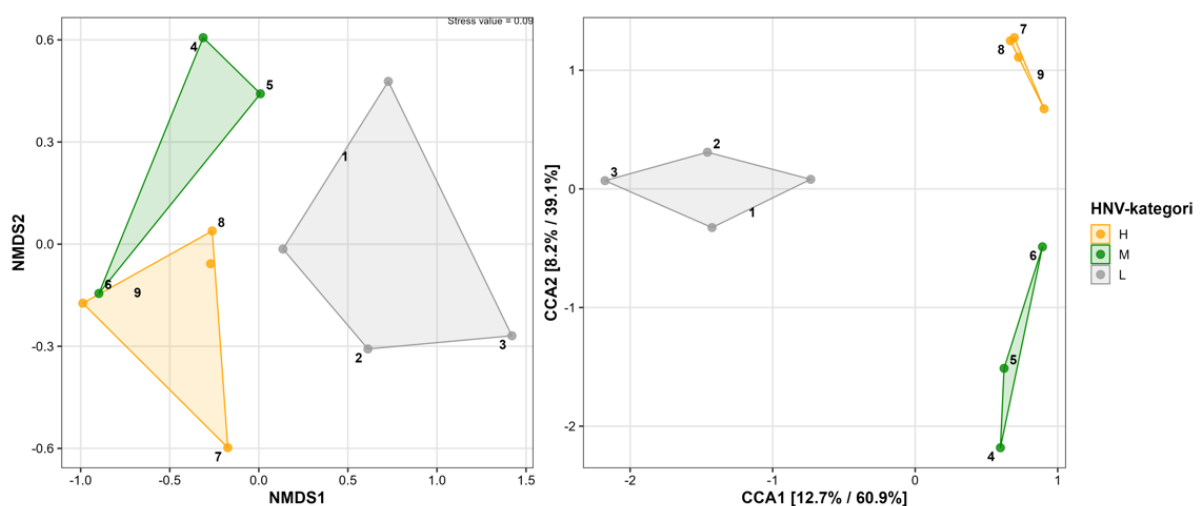
Figur 20: Beta-diversiteten af prøverne for *rbcl* genet, hvor x-aksen angiver den første ordinations-akse og y-aksen angiver den anden ordinations-akse. Den venstre graf er et NMDS-plot baseret på Bray-Curtis afstand, hvor stress-værdien er angivet i øverste højre hjørne. Den højre graf er et CCA-plot constrained udelukkende til variabelen HNV-kategori. Tal er angivet til hvert punkt for deres tilsvarende HNV-score, og polygoner grupperer disse punkter i deres tilsvarende HNV-kategori.

For vertebrat 16S rRNA genet blev der fundet en adskillelse af eDNA-profilerne af alle HNV-kategorierne i CCA-plottet, mens alle HNV-kategorier udviste overlap i NMDS-plottet (Figur 21). Hertil havde NMDS-plottet for vertebrat 16S rRNA genet en stress-værdi på 0,067, hvilket indikerer at ordinationsplottet er en meget god repræsentation af de reduceret dimensioner. Yderligere blev der fundet en signifikant effekt af den gennemsnitlige vindhastighed på ordinationen af NMDS-plottet, der tyder at have påvirket prøven fra HNV-scoren på fem.



Figur 21: Beta-diversiteten af prøverne for *rbcl* genet, hvor x-aksen angiver den første ordinations-akse og y-aksen angiver den anden ordinations-akse. Den venstre graf er et NMDS-plot baseret på Bray-Curtis afstand, hvor stress-værdien er angivet i øverste højre hjørne. Den højre graf er et CCA-plot constrained udelukkende til variabelen HNV-kategori. Tal er angivet til hvert punkt for deres tilsvarende HNV-score, og polygoner grupperer disse punkter i deres tilsvarende HNV-kategori. Røde pile samt tekst angiver effekten af variable med en statistisk signifikans ($\alpha = 0,005$) for ordinationsplottet.

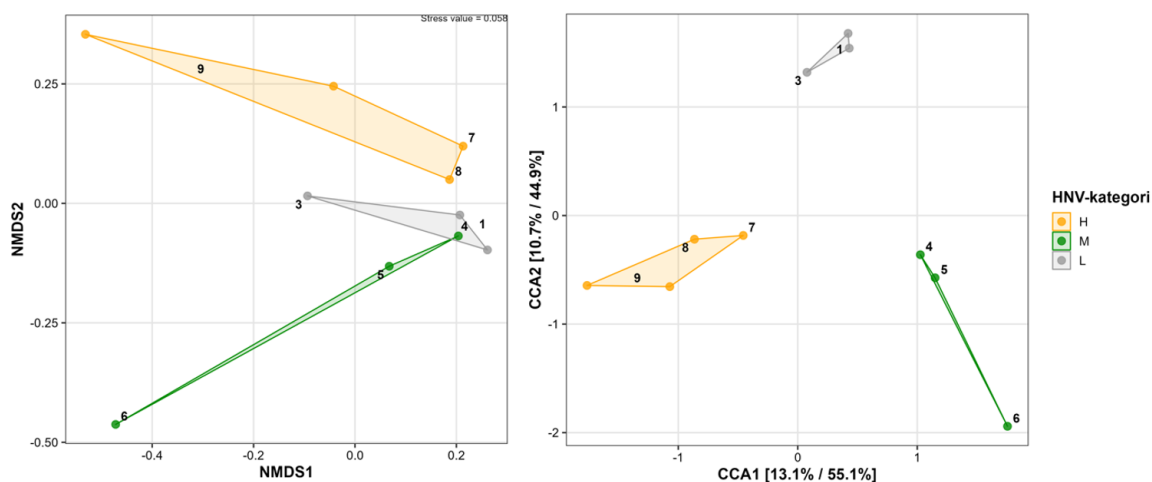
For COI genet blev der fundet en adskillelse af eDNA-profilerne af alle HNV-kategorierne i CCA-plottet såvel som NMDS-plottet (Figur 22). Prøven med en HNV-score på seks adskiller sig dog ikke meget fra den høje HNV-kategori. Hertil havde NMDS-plottet for COI genet en stress-værdi på 0,090, hvilket indikerer at ordinationsplottet er en meget god repræsentation af de reduceret dimensioner.



Figur 22: Beta-diversiteten af prøverne for *rbcl* genet, hvor x-aksen angiver den første ordinations-akse og y-aksen angiver den anden ordinations-akse. Den venstre graf er et NMDS-plot baseret på Bray-Curtis afstand, hvor stress-værdien er angivet i øverste højre hjørne. Den højre graf er et CCA-plot constrained udelukkende til variabelen HNV-kategori. Tal er angivet til hvert punkt for deres tilsvarende HNV-score, og polygoner grupperer disse punkter i deres tilsvarende HNV-kategori.

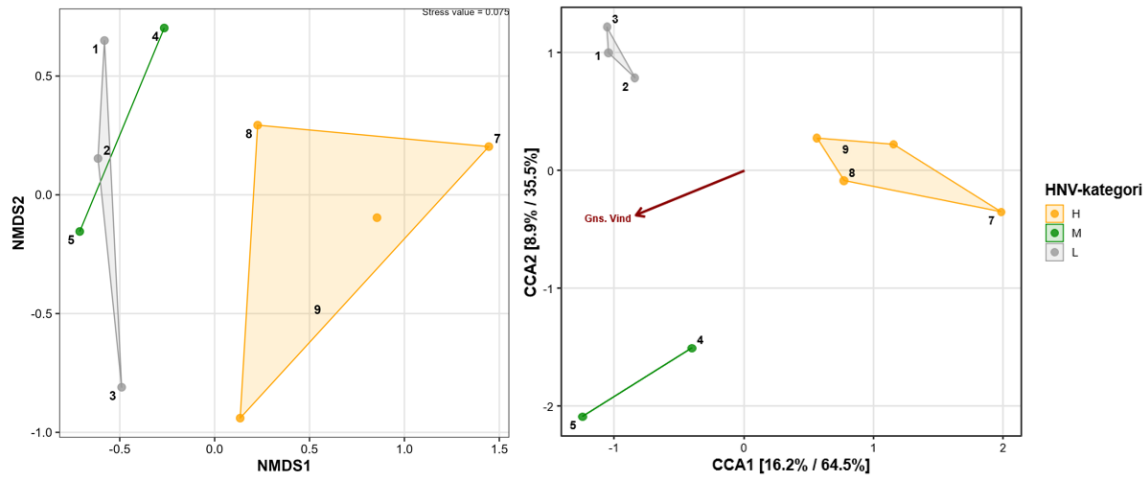
Beta-Diversitet for Jordprøver

For bakterie 16S rRNA genet blev der fundet en adskillelse af eDNA-profilerne af alle HNV-kategorierne med undtagelsen af den lave og mellem HNV-kategori i NMDS-plottet, hvor prøven med en HNV-score på fire overlappede med den lave kategori (Figur 23). Hertil havde NMDS-plottet for bakterie 16S rRNA genet en stress-værdi på 0,058, hvilket indikerer at ordinationsplottet er en meget god repræsentation af de reduceret dimensioner. CCA-plottet constrained til HNV-kategori viste en klar adskillelse af alle tre HNV-kategorier.



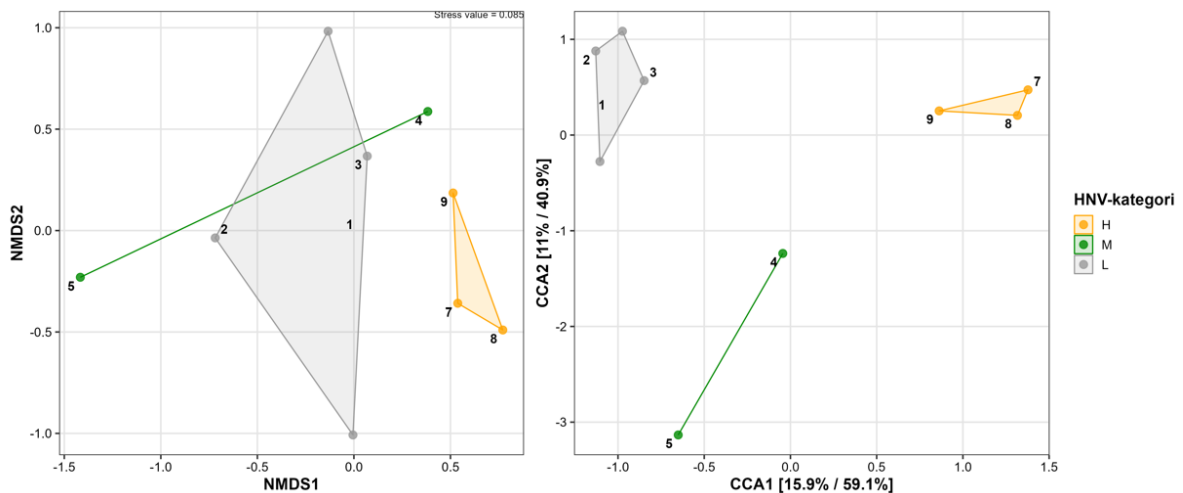
Figur 23: Beta-diversiteten af prøverne for bakterie 16S rRNA genet, hvor x-aksen angiver den første ordinations-akse og y-aksen angiver den anden ordinations-akse. Den venstre graf er et NMDS-plot baseret på Bray-Curtis afstand, hvor stress-værdien er angivet i øverste højre hjørne. Den højre graf er et CCA-plot constrained udelukkende til variabel HNV-kategori. Tal er angivet til hvert punkt for deres tilsvarende HNV-score, og polygoner grupperer disse punkter i deres tilsvarende HNV-kategori.

For arkæ 16S rRNA genet blev der fundet en adskillelse af eDNA-profilerne af alle HNV-kategorierne med undtagelsen af den lave og mellem HNV-kategori i NMDS-plottet (Figur 24). Hertil havde NMDS-plottet for arkæ 16S rRNA genet en stress-værdi på 0,075, hvilket indikerer at ordinationsplottet er en meget god repræsentation af de reduceret dimensioner. CCA-plottet constrained til HNV-kategori viste en klar adskillelse af alle tre HNV-kategorier, og der blev fundet en signifikant korrelation med ordinationsplottet og den gennemsnitlige vindhastighed, der tyder at påvirke prøven med en HNV-score på fem.



Figur 24: Beta-diversiteten af prøverne for arkæ 16S rRNA gen, hvor x-aksen angiver den første ordinations-akse og y-aksen angiver den anden ordinations-akse. Den venstre graf er et NMDS-plot baseret på Bray-Curtis afstand, hvor stress-værdien er angivet i øverste højre hjørne. Den højre graf er et CCA-plot constrained udelukkende til variabelen HNv-kategori. Tal er angivet til hvert punkt for deres tilsvarende HNv-score, og polygoner grupperer disse punkter i deres tilsvarende HNv-kategori. Røde pile samt tekst angiver effekten af variable med en statistisk signifikans ($\alpha = 0,005$) for ordinationsplottet.

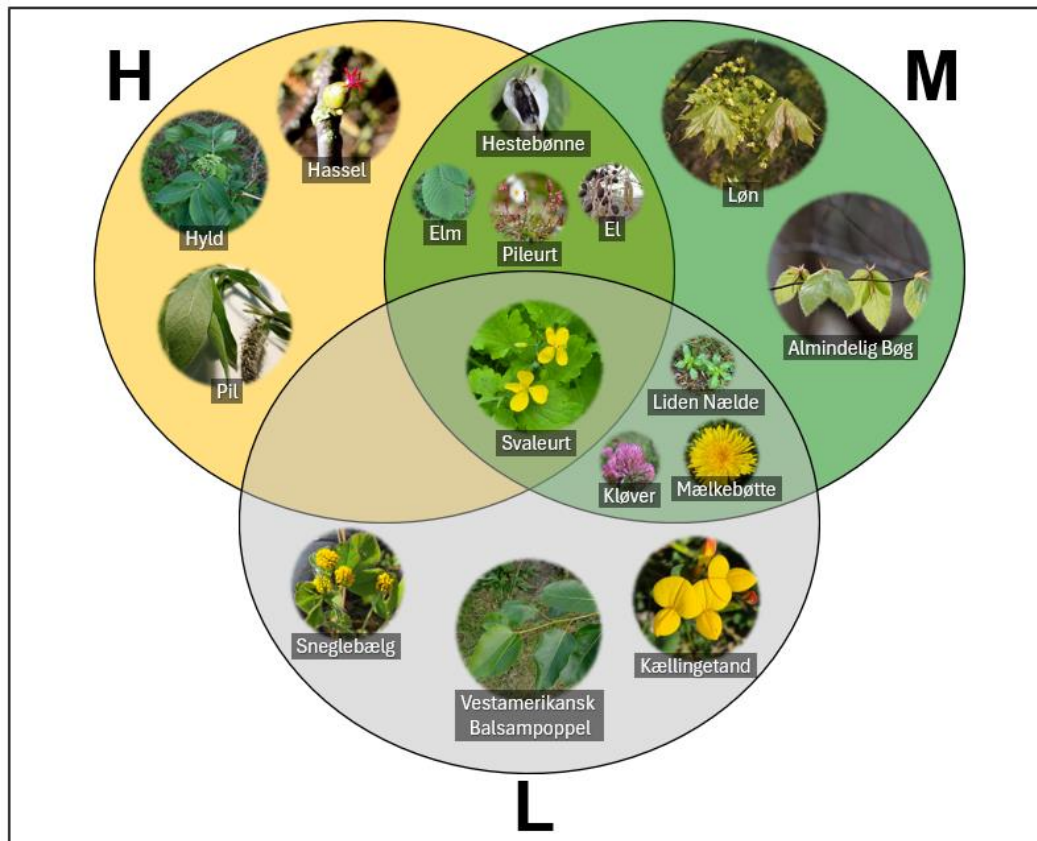
For *mcrA* genet blev der fundet en adskillelse af eDNA-profilerne af alle HNv-kategorierne med undtagelsen af den lave og mellem HNv-kategori i NMDS-plottet (Figur 25). Hertil havde NMDS-plottet for *mcrA* genet en stress-værdi på 0,085, hvilket indikerer at ordinationsplottet er en meget god repræsentation af de reduceret dimensioner. CCA-plottet constrained til HNv-kategori viste en klar adskillelse af alle tre HNv-kategorier.



Figur 25: Beta-diversiteten af prøverne for *mcrA* genet, hvor x-aksen angiver den første ordinations-akse og y-aksen angiver den anden ordinations-akse. Den venstre graf er et NMDS-plot baseret på Bray-Curtis afstand, hvor stress-værdien er angivet i øverste højre hjørne. Den højre graf er et CCA-plot constrained udelukkende til variabelen HNv-kategori. Tal er angivet til hvert punkt for deres tilsvarende HNv-score, og polygoner grupperer disse punkter i deres tilsvarende HNv-kategori.

Arter og Slægter i HNV-kategorier for Luftprøver

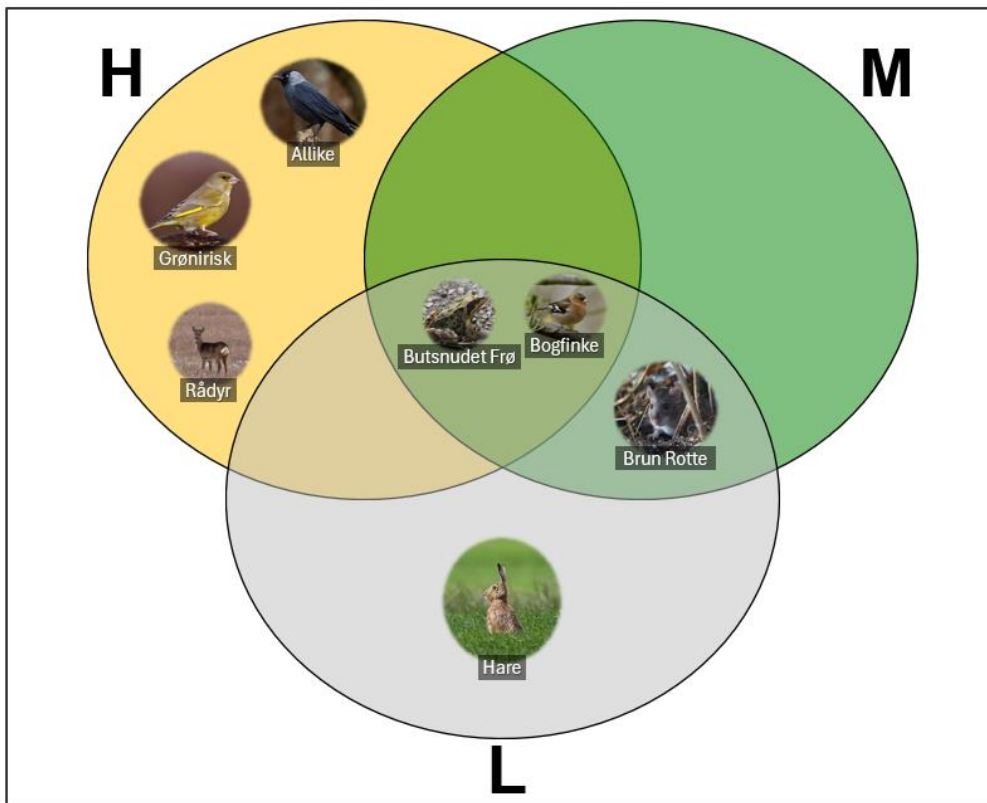
For *rbcl* genet blev der fundet 16 forskellige slægter og arter af planter, hvis forekomst var fordelt på tværs af alle HNV-kategorier og kombinationer heraf med undtagelsen af kombinationen af kategorierne høj og lav (Figur 26).



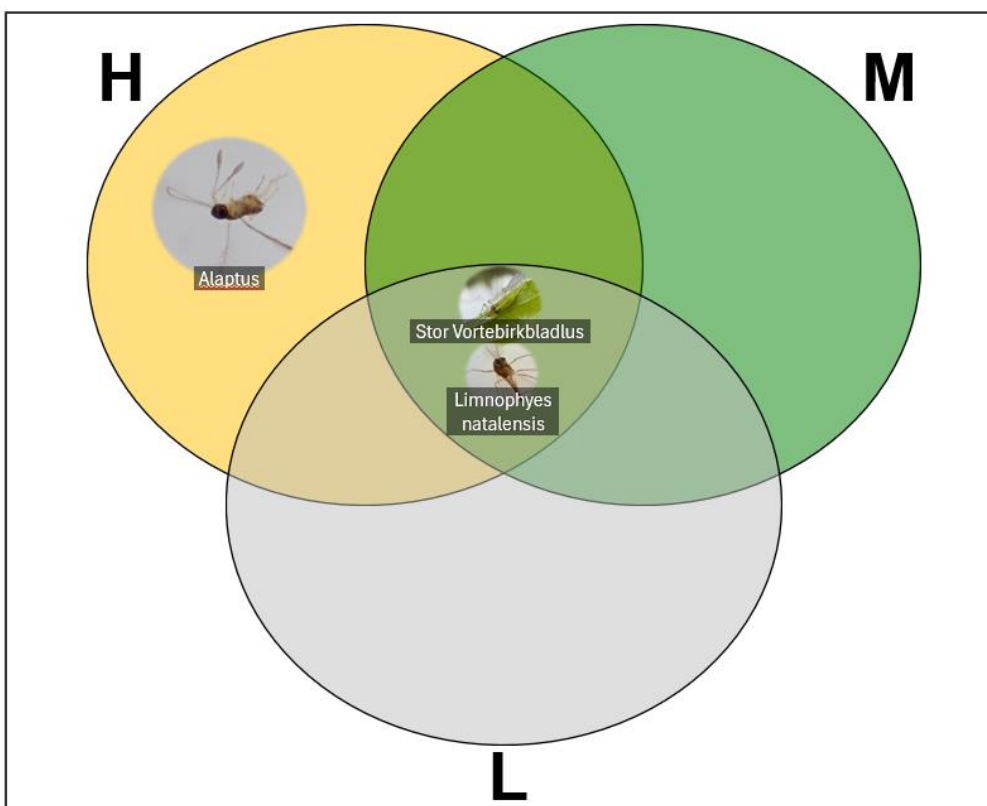
Figur 26: Venn-diagram for forekomsten af arter og slægter på tværs af HNV-kategorier baseret på OTUs fra *rbcl* genet, som er blevet taksonomisk klassificeret med BLASTn.

For vertebrat 16S rRNA genet blev der fundet syv forskellige slægter og arter af vertebrater, hvis forekomst var fordelt ud på den høje HNV-kategori, lave HNV-kategori, kombinationen af den lave og mellem HNV-kategori samt kombinationen af alle tre HNV-kategorier (Figur 27).

For COI genet blev der fundet tre forskellige slægter og arter af invertebrater, hvis forekomst var fordelt ud på den høje HNV-kategorierne samt kombinationen af alle tre HNV-kategorier (Figur 28).



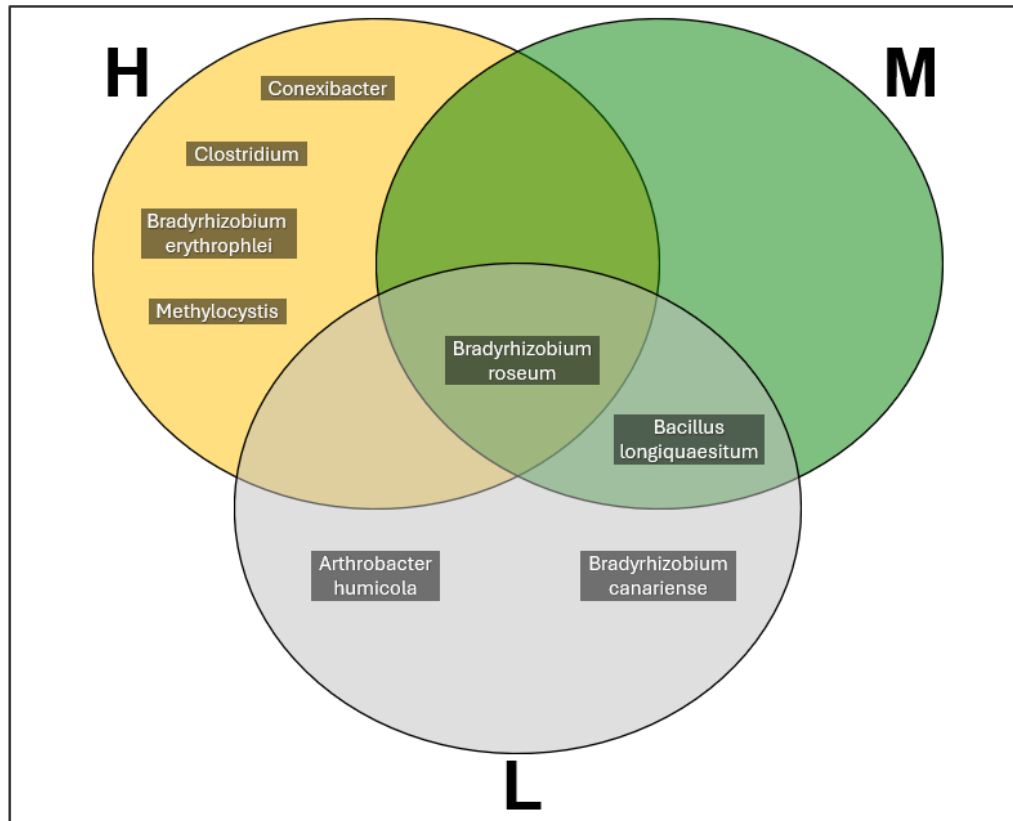
Figur 27: Venn-diagram for forekomsten af arter og slægter på tværs af HNV-kategorier baseret på OTUs fra vertebrat 16S rRNA genet, som er blevet taksonomisk klassificeret med BLASTn.



Figur 28: Venn-diagram for forekomsten af arter og slægter på tværs af HNV-kategorier baseret på OTUs fra COI genet, som er blevet taksonomisk klassificeret med BLASTn.

Arter og Slægter i HNV-kategorier for Jordprøver

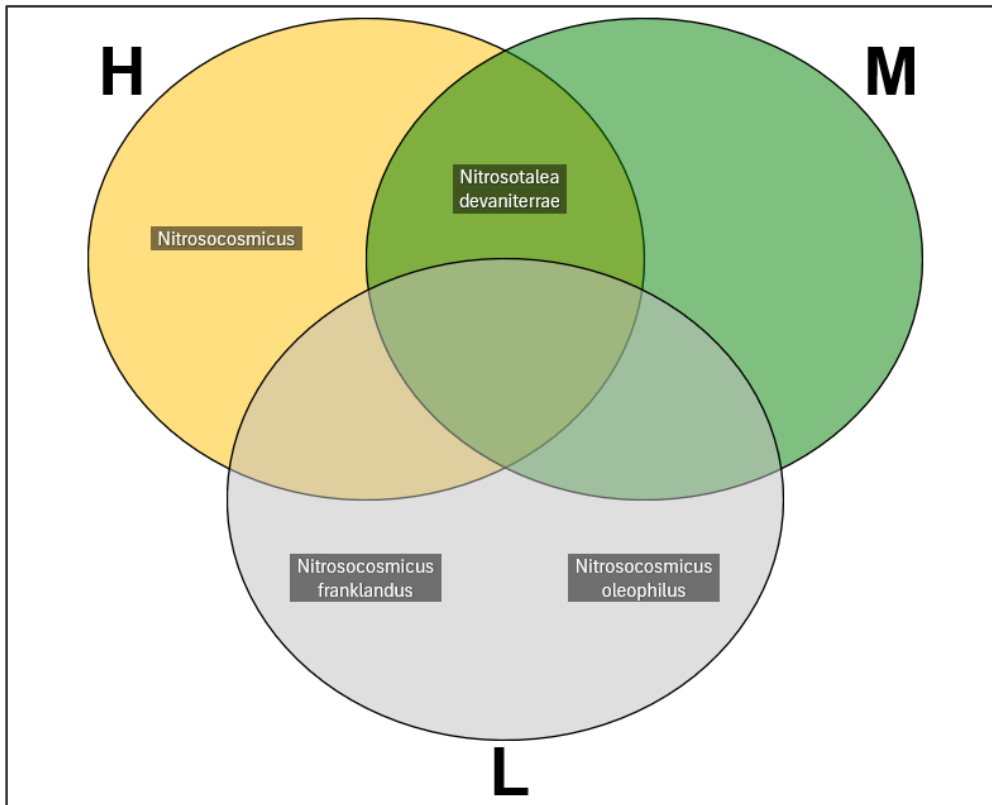
For bakterie 16S rRNA genet blev der fundet otte forskellige slægter og arter af bakterier, hvis forekomst var fordelt ud på den høje HNV-kategori, den lave HNV-kategori, kombinationen af den lave og mellem HNV-kategori samt kombinationen af alle tre HNV-kategorier (Figur 29).



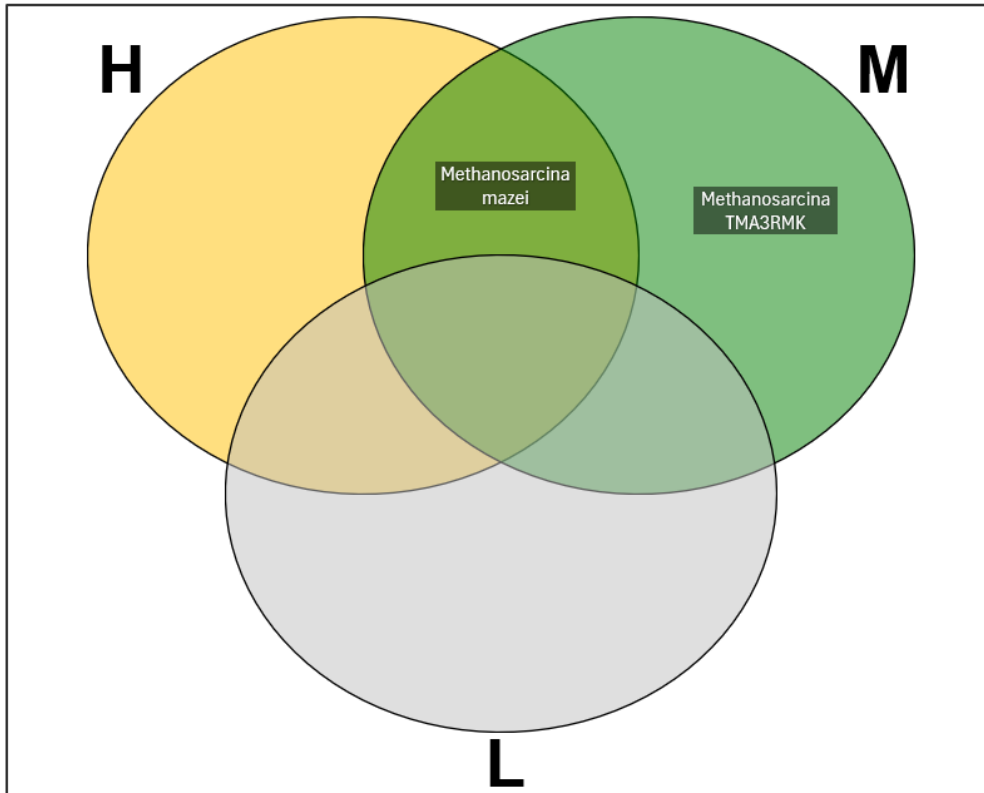
Figur 29: Venn-diagram for forekomsten af arter og slægter på tværs af HNV-kategorier baseret på OTUs fra bakterie 16S rRNA genet, som er blevet taksonomisk klassificeret med BLASTn.

For arkæ 16S rRNA genet blev der fundet fire forskellige slægter og arter af arkæer, hvis forekomst var fordelt ud på den høje HNV-kategori, den lave HNV-kategori samt kombinationen af den mellem og høje HNV-kategori (Figur 30).

For mcrA genet blev der fundet to forskellige arter af methanogener, hvis forekomst var fordelt ud på den mellem HNV-kategori samt kombinationen af den mellem og høje HNV-kategori (Figur 31).



Figur 30: Venn-diagram for forekomsten af arter og slægter på tværs af HNV-kategorier baseret på OTUs fra arkæ 16S rRNA genet, som er blevet taksonomisk klassificeret med BLASTn.



Figur 31: Venn-diagram for forekomsten af arter og slægter på tværs af HNV-kategorier baseret på OTUs fra mcrA genet, som er blevet taksonomisk klassificeret med BLASTn.

Diskussion

Denne rapport undersøger, om den moderne molekylære metode eDNA har potentiale til at bidrage til vurderingen af naturtilstand og -værdi. Vurderingen og registreringen af tilstanden af naturområder er traditionelt blevet udført af uddannede personer i felten, som er oplært i den specifikke metode, der anvendes. Et af de mest anvendte fremgangsmåder er tilstandsvurderingssystemet fra Danmarks Miljøundersøgelser, som benyttes bredt på tværs af kommuner i Danmark (Fredshavn & Skov, 2005; Miljø- og Ligestillingsministeriet, 2019; Naturstyrelsen, 2014). Systemet kombinerer strukturelle indikatorer for naturområder med registreringer af plantesamfundet inden for en given naturtype for at udregne en samlet vurdering af naturtilstanden (Fredshavn & Skov, 2005). Andre vurderingsmetoder, såsom Natura 2000-basisanalyser, baserer sig i stedet på forekomsten af sårbare arter, beskyttede naturtyper samt udpegede fuglebeskyttelsesområder for at identificere naturområder, hvis tilstand kræver særlig beskyttelse (Naturstyrelsen, 2014). Fælles for disse metoder er, at de er afhængige af observationer foretaget i felten, hvilket kan introducere bias og dermed påvirke den endelige vurdering. Derudover kan overvågning af arter herunder sårbare arter kræve invasive metoder såsom ketsjning eller fældefangst, hvilket potentielt kan forstyrre arternes adfærd eller overlevelse (Kjær et al., 2023).

På baggrund af disse udfordringer undersøger denne rapport potentialet i at anvende eDNA som et supplement eller alternativ til de traditionelle feltbaserede metoder. Anvendelsen af eDNA-analyser kan give indsigt i det biologiske samfunds sammensætning, analysere økosystemfunktioner samt identificere specifikke taksonomiske grupper herunder beskyttede arter (Garrett et al., 2023; Kjær et al., 2023; Roger et al., 2022). Indsamlingen af prøver til eDNA-analyse kan desuden udføres systematisk, gentageligt og ikke-invasivt ved anvendelsen af jord-, vand- eller luftprøver (García-Machado et al., 2023; Garrett et al., 2023; Guthrie et al., 2024). Denne rapport præsenterer derfor et proof-of-concept for anvendelsen af eDNA som redskab til vurdering af økologi og naturtilstand. Konceptet er baseret på analyser af eDNA fra luft- og jordprøver, som er blevet indsamlet fra 11 lokaliteter inden for ét naturområde. Formålet er at undersøge, om der findes en korrelation mellem eDNA-profiler og HNV-scorer i intervallet 1 til 9, med henblik på at vurdere, om eDNA har potentiale som metode til at indikere naturværdi.

Luftprøver

Efter filtrering havde datasættene for *rbcl*- (Planter), vertebrat 16S rRNA- og COI (Invertebrater) genet et totalt antal reads på henholdsvis 15407, 5952 og 3761, hvor det gennemsnitlige antal reads per prøve var henholdsvis 1401, 595 og 342 (Tabel 2). Et andet eDNA-studie af García-Machado et al. anvendte kun prøver med en sekventeringsdybde mellem 1000 og 100.000 reads per prøve men fandt, at sekventeringsdybde havde en ubetydelig effekt på vurderingen af fiskesamfund i en given sø (García-Machado et al., 2023). Mens datasættene for vertebrat 16S rRNA og COI genet i gennemsnit har under 1000 reads per prøve, vurderes prøverne til stadig at være repræsentative og anvendelige til analyse.

Kurverne for alfa-diversitet viste, at *rbcl*-genet og dermed planter havde den højeste artsrigdom og biodiversitet sammenlignet med vertebrat 16S rRNA og COI genet (Figur 8-10). Dette kan skyldes at planter er stationære og udgør en større andel af biomassen end vertebrater og invertebrater (Bar-On et al., 2018). Prøverne blev desuden indsamlet i efteråret, hvor mange planter undergår løvfald og derfor udskiller mere eDNA til omgivelserne (Donnelly et al., 2024). COI genet viste

den laveste artsrigdom, biodiversitet og antal reads. Det skyldes sandsynligvis frasorteringen af svampe fra datasættet, da svampe ellers stærkt overrepræsenterede prøverne. Unkovic et al. har vist, at luftbåren svampes diversitet og abundans er højest i efteråret, og Tordoni et al. har fundet, at eDNA kan være op til tre gange mere effektivt til at detektere svampe end traditionelle morfologiske metoder (Tordoni et al., 2021; Unković et al., 2018). Samlet kan dette forklare at størstedelen af datasættet for COI genet bestod af svampe, og frafiltreringen af disse har derfor betydeligt reduceret antallet af reads, artsrigdommen og biodiversiteten af datasættet.

Artsrigdommen og diversiteten af generne fra luftprøverne blev yderligere lineært korreleret med HNV-scoren under antagelsen om, at artsrigdommen og diversiteten ville stige med stigende HNV-score. Der blev udelukkende fundet en signifikant lineær korrelation mellem HNV-scoren og Chao1-indekset for COI genet, mens de resterende korrelationer ikke var signifikante. På baggrund af dette afkræftes **Hypotese 1** for luftprøverne, da artsrigdom og biodiversitet kun signifikant steg med stigende HNV-score i ét tilfælde ud af seks. Korrelationerne var dog lavet på baggrund af mellem ni til 11 observationer, og det kunne derfor være muligt at finde flere signifikante korrelationer, hvis der var lavet flere gentagelser per HNV-score. Yderligere viste rarefaction-kurverne for alle tre gener, at tilvæksten af nye OTUs ikke havde udjævnet sig (Bilag 7-9). Dette indikerer, at den sande diversitet endnu ikke er fuldt afdækket. Det er derfor muligt, at stærkere korrelationer kunne være fundet med større sekventeringsdybde eller flere gentagelser per HNV-score.

Plantegenet *rbcl* blev det fundet, at nælde- og kløver-slægten var dominerende i alle HNV-scoringer (Figur 14). Nælder og kløver er beskrevet som meget almindelig i hele Danmark, hvor nælder typisk findes på kulturjord og næringsrig bund, mens kløver kan trives på græsmarker, enge, i vejkanter og i skovkanter. Alle disse miljøer findes i Bredeng, hvilket kan forklare deres høje relative proportion. Der blev ikke fundet nogle tydelige mønstre for fordelingen af slægter på tværs af HNV-scoringer, men der kunne tydes svage mønstre såsom at gran-slægten (*Picea*) og Cypress-familien (*Cupressaceae*) forekom henholdsvis mindre og slet ikke i de mellem HNV-scoringer.

Der blev ikke identificeret nogen dominerende slægter af vertebrater, men i stedet at slægte forekom i høj relativ proportion i enkelte HNV-scoringer (Figur 15). Kun fiskelus (*Caligus*) forekom i alle prøver, men da denne slægt lever som parasit på fisk i primært salt- og brakvand, så er dens tilstedeværelse sandsynligvis resultatet af kontaminering eller fejl i identificering (Tavares-Dias & Oliveira, 2023). Svage mønstre blev observeret for enkelte fugleslægter som eksempelvis finkefamilien (*Fringillidae*), som typisk forekom i højere relativ proportion i HNV-scoringer over fem. Resultaterne antyder dog, at eDNA fra vertebrater er bedre egnet til presence-absence-analyser frem for kvantitativ analyse. Dette kan skyldes vertebraters høje mobilitet, som gør, at ét individ kan bevæge sig mellem meget forskellige naturtyper over en kort tidsperiode. Andre studier har ligeledes anvendt vertebrater som fugle, pattedyr og amfibier til presence-absence data (Garrett et al., 2023; Johnson et al., 2023).

Resultaterne for invertebrater fandt, at bladlus-slægten (*Eucera*) var den eneste identificeret slægt af de ti grupperinger af højeste relative proportioner samt var den mest dominerende gruppering med højeste relative proportioner i de lave HNV-scoringer (Figur 16). De to andre grupperinger med taksonomi var dansemyg-familien (*Chironomidae*), der typisk havde høje relative proportioner i HNV-scoringer over tre. Da dansemyg ofte lever ved eller i ferskvand, kan deres hyppighed i højere HNV-scoringer forklares af, at lokationerne til disse HNV-scoringer lå nær søer og vandhuller (Lei et al., 2024). Mens de andre grupperinger i heatmappen ikke var blevet identificeret, kunne der stadig ses mønstre. Eksempelvis tydes det på, at OTUs i rank otte og ti af heatmappen næsten udelukkende forekom i HNV-score på seks og over. Alle uidentificeret OTUs, der blev vist i denne

heatmap, er blevet forsøgt at identificeres ved brug af BLASTn, og alle disse OTUs var mest sammenlignelige med andre genetiske sekvenser fra invertebrater (Resultater ikke vist). Det antages derfor, at disse OTUs stadig repræsenterer invertebrater, selvom ingen af BLASTn-resultaterne havde en procent identitet på 80% eller over. Andre studier har dog succesfuldt identificeret insekter ved brug af eDNA og COI primerpar (Roger et al., 2022). Det kan derfor være at en optimering af metoden såsom valg af et andet primerpar kunne have ledt til flere identificeret OTUs.

Alle CCA-plots, som blev konstrueret med HNV-kategori som eneste forklarende variabel, viste en tydelig adskillelse mellem HNV-kategorierne for alle luftprøver (Figur 20-22). Da CCA-plots dog er constrained analyser, vil fokus i denne diskussion være på NMDS-plots, som bedre afspejler den underliggende variation i eDNA-profilerne mellem prøverne.

Der blev for rbcL genet fundet tydelig forskel mellem den lave og høje HNV-kategori, mens den lave og mellem HNV-kategori havde overlap. Dette indikerer at der er betydelig forskel mellem eDNA fra den høje og lave HNV-kategori, mens den mellem HNV-kategori tydes at have delte træk med den høje HNV-kategori. Under databehandlingen blev der yderligere lavet et PCA-plot for rbcL genet, som kun fandt minimalt overlap af den lave og mellem HNV-kategori samt den mellem og høje HNV-kategori og viser, at de tre HNV-kategorier ligger i rækkefølge fra lav til høj (Bilag 13). NMDS- og PCR-plottene indikerer samlet, at der forekommer en gradvis overgang i det indsamlede plante-eDNA fra den lave HNV-kategori til den mellem og videre fra den mellem til den høje HNV-kategori, samt at plante-eDNA er betydeligt forskellige mellem den lave og høje HNV-kategori.

Vertebrat 16S rRNA genet viste derimod overlap mellem alle tre HNV-kategorier, hvilket tyder på, at forskellene i eDNA fra vertebrater ikke er store nok til at adskille HNV-kategorierne på baggrund af sammensætning alene. Den manglende forskel kan igen forklares af mobiliteten af vertebrater, og at vertebrater derfor er mere egnede til presence-absence data. Der blev yderligere observeret en signifikant effekt af den gennemsnitlige vindhastighed på ordinationen, hvilket tydes at betydeligt påvirke prøven fra HNV-scoren på fem. Vind er en kendt abiotisk faktor med stor betydning for indsamlingen af luftbåren eDNA, og den høje vindhastighed på lokaliteten med HNV-score fem har sandsynligvis påvirket mængden og sammensætningen af indsamlet eDNA (Roger et al., 2022).

For COI genet og derved invertebrater blev der observeret en tydelig adskillelse mellem alle tre HNV-kategorier, selvom en stor andel af OTUs ikke var taksonomisk identificeret. Særligt var lav og høj HNV-kategori klart adskilte. Det bemærkes at HNV-scoren på seks næsten overlappede med den høje HNV-kategori, hvilket er logisk, da denne HNV-score er nærmest den høje HNV-kategori. Heatmappen for COI-genet viste også ligheder mellem HNV-score seks og HNV-scorerne syv, otte og ni. Dette kan potentielt indikere, at grupperingerne af HNV-kategorierne ikke nødvendigvis burde være i skridt af tre af HNV-scorer, men i stedet kunne være tilpasset til hver taksonomisk gruppe som egnede. Under databehandlingen af COI genet blev alle OTUs identificeret som svampe fjernet givet antagelsen, at dette vil forbedre adskillelsen af HNV-kategorierne. Et efterfølgende NMDS-plot af de frasorterede svampe viste, at den lave og mellem HNV-kategori overlappede med den høje kategori (Bilag 14), hvilket støtter antagelsen om, at svampe i dette tilfælde ikke bidrager til at skelne mellem naturværdier. Resultaterne indikerer derfor, at eDNA fra invertebrater er mere velegnet end svampe til at identificere forskelle i naturværdi baseret på luftprøver.

Samlet set viser NMDS- såvel som CCA-plots, at luftbåren eDNA fra planter og invertebrater kan adskilles på baggrund af, hvilken HNV-score det luftbåren eDNA er indsamlet fra. For begge

grupper blev der fundet tydelig forskel mellem den lave og høje HNV-kategori, mens den mellem kategori havde delte træk med den lave for planter. Metoden har derfor lykkedes i at bevise et proof-of-concept af, at luftbåren eDNA fra planter og invertebrater har potentiale til at indikere naturværdien. **Hypotese 2** kan altså bekræftes for disse to grupper, eftersom begge typer af ordinationsplots fandt forskel mellem enkelte eller alle HNV-kategorier. Hypotesen kan modsat afkræftes for vertebrater, da NMDS-plottet fandt overlap mellem alle tre HNV-kategorier, hvilket indikerer at der ikke er betydelig forskel mellem eDNA-profilerne af vertebrater fra de forskellige HNV-scorer. Det skal dog understreges at dette er et proof-of-concept, og analyserne derfor er lavet på baggrund af få gentagelser og HNV-scorer. Hvis der var inkluderet flere gentagelser eller lokationer med HNV-score på 10, 11, 12 og 13, så kunne der muligvis været fundet større forskel mellem eDNA-profilerne fra forskellige HNV-scorer.

Venn-diagrammer blev anvendt til at identificere arter og slægter, hvis forekomst udelukkende blev fundet i specifikke HNV-kategorier. Dette blev gjort med intentionen af at finde potentiale for udpegningen af indikatorarter og -slægter for forskellige HNV-kategorier. Her blev der identificeret flere arter og slægter for planter end for vertebrater og invertebrater (Figur 26-28), hvilket kan skyldes den højere artsrigdom og biodiversitet af planter sammenlignet med vertebrater og invertebrater. Hertil blev der kun identificeret tre arter og slægter af invertebrater, eftersom størstedelen af OTUs for COI genet havde en procent identitet på lavere end 98% og blev derfor ikke inkluderet. Derfor kunne der ikke indikeres nogen sammenhæng mellem invertebrater og hvilke HNV-kategorier, de forekom i. Litteraturstudie af arter og slægter af planter og vertebrater fandt dog belæg for sammenhængen mellem flere af de identificeret organismer og deres respektive HNV-kategorier. Eksempler herpå er som følgende:

Hassel og pil, der udelukkende forekommer i den høje HNV-kategori, er fundet til at give høj habitat kvalitet, yde vigtige økosystemtjenester og kan agere som biodiversitets hotspots (Bita-Nicolae, 2023; Volpato et al., 2024). Vestamerikansk balsampoppel, der udelukkende forekommer i den lave HNV-kategori, er ofte plantet langs veje og i læhegn på marker, hvilket er natur oftest associeret med lav naturværdi (Frederiksen et al., 2019). Den butsnudet frø har en bred udvidelse, og selvom den foretrækker at yngle i søer, kan den også parre i habitater såsom grøfter, hvilket kan forklare at den forekommer i alle HNV-kategorier (Reid et al., 2013). Den brune rotte forekommer oftere i natur påvirket af mennesker og trives bedre nær bebyggelse, hvilket kan forklare at den ikke ses i den høje HNV-kategori (Guiry & Buckley, 2018). Hare, som udelukkende forekom i den lave HNV-værdi, er også fundet til at trives bedst på landbrugsjord når sammenlignet med græsmarker (Canova et al., 2020).

Der var dog også arter og slægter, hvis forekomst i specifikke HNV-kategorier ikke kunne forklares ud fra litteraturen. I visse tilfælde stemte feltobservationer ikke overens med resultaterne fra Venn-diagrammerne. Eksempelvis blev rådyr observeret uden for prøvetagningsperioden på lokationen med en HNV-score på tre, selvom denne art ikke blev fundet via eDNA i den lave HNV-kategori. Dette understøtter igen, at mobiliteten af vertebrater gør dem mindre egnede som indikatorer for naturværdi baseret på eDNA og forklarer desuden overlappet mellem HNV-kategorier i NMDS-plottet for vertebrat 16S rRNA genet.

En anden tendens observeret under litteraturstudiet var, at de fundne arter og slægters forekomst ofte afspejlede den naturtype, der blev observeret på lokaliteten. Overordnet var arter og slægter i den høje HNV-kategori oftest knyttet til skov, sø og ferskvand, mens arter i den lave HNV-kategori typisk var associeret med lysåben natur eller landbrug. Udelukkende træer forekom i den høje HNV-kategori i Venn-diagrammet, og rådyr, som også kun blev identificeret i den høje HNV-kategori, er kendt til at lave reder og hvile i skove og skovkanter (Nykonenko, 2019). Omvendt

forekommer vestamerikansk balsampoppel og hare ofte i eller omkring landbrugsjord, mens sneglebælg og kællingetand, som forekom i den lave HNV-kategori, begge er indikatorarter for den lysåbne naturtype (Fredshavn & Ejrnæs, 2009).

Samlet indikerer resultaterne, at der er potentiale for at kunne udpege indikatorarter og -slægte for grupperinger af HNV-scorer, da litteratur støtter op om nogle arter og slægters forekomst i de specifikke HNV-kategorier. Dette bekræfter **Hypotese 3**. Det er dog muligt, at den observerede adskillelse i eDNA-profil mellem lokaliteter i højere grad skyldes forskelle i naturtype end i naturværdi.

Resultaterne fra luftprøverne indikerer samlet, at luftbåren eDNA fra planter og invertebrater har potentiale til at kunne indikere naturværdien af et område. Her har specielt planter potentiale, da denne gruppe havde en høj taksonomisk opløsning, god adskillelse af eDNA-profiler på tværs af HNV-scorer og mange arter samt slægter, hvis forekomst udelukkende blev observeret i specifikke grupperinger af HNV-scorer. Luftbåren eDNA har hertil en stor fordel i, at det let kan kobles med eftersøgning og identificere enkelte arter såsom invasive og sårbare arter over et stort areal, hvis det er af interesse for det pågældende projekt. Denne rapport er dog et proof-of-concept, og større forbedring og undersøgelse af metoden med flere gentagelser og prøver fra flere forskellige naturtyper er derfor nødvendig, før metoden kan anvendes i reelle naturprojekter.

Indsamlingen og analyseringen af luftbåren eDNA har dog sine begrænsninger, der er vigtige at overveje, før metoden implementeres i et vilkårligt projekt. Eftersom genetisk materiale i luften er udsat for varierende vindhastighed, luftfugtighed og UV-indstråling, så er resultater af en eDNA analyse meget afhængigt af vejret, og det er derfor vigtigt at opstille en gentagelig fremgangsmåde, der tager højde for vejrforholdene (Beng & Corlett, 2020; Garrett et al., 2023; Johnson et al., 2023). Som eksempel blev der ikke indsamlet eDNA i dette projekt, når der regnede eller havde regnet natten før prøveindsamling. Den høje mængde af UV-indstråling betyder også, at luftbåren eDNA nedbrydes hurtigt, og analysen heraf repræsenterer derfor ikke en større tidsperiode af indsamlingsområdet (Beng & Corlett, 2020). Højere vindhastigheder på tidspunktet af indsamlingen kan også bære luftbåren eDNA længere og derved øge indsamlingsarealet, hvilket kan lede til kontamineringer fra utilsigtet områder (Beng & Corlett, 2020). Dette kan eksempelvis ses for dette projekt, idet den gennemsnitlige vindhastighed havde en signifikant effekt på indsamlingen af luftbåren vertebrat eDNA, hvilket tyder på at have påvirket eDNA-profilen af prøven med HNV-score på fem. Samlet er luftbåren eDNA meget påvirket af vejrforhold, indsamler fra et større areal og repræsenterer kun en kort tidsperiode. Hvis eDNA skal anvendes til at analysere naturværdien, skal der derfor udvikles en standardiseret metode, der tager højde for dette.

Jordprøver

Efter filtrering havde datasættene for bakterie 16S rRNA-, arkæ 16S rRNA- og mcrA genet (methanogener) et totalt antal reads på henholdsvis 21978, 9076 og 17826, hvor det gennemsnitlige antal reads per prøve var henholdsvis 2198, 1008, 1981 (Tabel 2). Som med luftprøverne vurderes antallet af reads at være tilstrækkeligt til, at prøverne kan betragtes som repræsentative og anvendelige til analyse, eftersom de alle havde mere end 1000 reads per prøve.

Kurverne for alfa-diversitet viste, at bakterie 16S rRNA genet havde den højeste artsrigdom og biodiversitet når sammenlignet med arkæ 16S rRNA og mcrA genet (Figur 11-13). Dette er i overensstemmelse med resultater fra Yuan et al., der har vist, at der findes flere kopier af bakterie 16S rRNA gener end arkæ 16S rRNA gener i jord, der ikke er fra en rhizosfære (Yuan et al., 2020). Samme studie fandt, at Shannon-indekset for bakterier i jord var gennemsnitligt mellem 6,16 og

6,78, mens Shannon-indekset for bakterier i denne rapport var mellem 6,34 og 7,67 (Yuan et al., 2020). Yuan et al. havde ligesom denne rapport anvendt et 16S rRNA primerpar, men studiet havde under databehandling frafiltreret alle OTUs uden taksonomi, hvilket kan forklare det lavere Shannon-indeks (Yuan et al., 2020).

Det blev desuden observeret, at *mcrA* genet havde en højere artsrigdom og diversitet end arkæ 16S rRNA genet, hvilket går imod forventninger, da methanogener er et arkæ og derfor også burde indeholde arkæ 16S rRNA genet (Baptiste et al., 2005). En mulig forklaring er, at *mcrA* er et kortere gen, og det har derfor mindre sandsynlighed for at blive degraderet af eksempelvis turbulens under vortex og centrifugering under DNA-ekstraheringen (Jo et al., 2017).

Artsrigdommen og diversiteten af generne fra jordprøverne blev også korreleret med HNV-scoren under antagelsen om, at artsrigdommen og diversiteten ville stige med stigende HNV-score. Der blev udelukkende fundet én signifikant lineær korrelation mellem HNV-scoren og Shannon-diversitetsindekset for arkæ 16S rRNA genet, mens de resterende korrelationer ikke var signifikante. På baggrund af dette afkræftes **Hypotese 1** også for jordprøverne, da artsrigdom og biodiversitet kun steg med stigende HNV-score i ét tilfælde ud af seks. Ligesom for luftprøverne kunne et større antal af gentagelser have fundet flere signifikante korrelationer, og en større sekvenseringsdybde kunne ligeledes have fundet større diversitet, eftersom tilvæksten af rarefaction-kurverne for jordprøverne ikke havde udjævnet sig (Bilag 10-12).

Der blev ikke fundet nogle stærkt dominerende slægter for bakterier men i stedet en jævn fordeling i relative proportioner (Figur 17). Dette er gjort specielt tydeligt, da de ti slægte med højeste relative proportion ikke udgjorde mere end 7,6% af OTUs af hver HNV-score. Der blev ikke identificeret klare mønstre i slægtsfordelingen på tværs af HNV-scoringer, men enkelte tendenser kunne anes. Eksempelvis forekom *Sporosarcina* og *Bacillus BD* sjældnere i HNV-scoringerne otte og ni sammenlignet med de øvrige.

For arkæ 16S rRNA genet blev der fundet ingen OTUs i de top ti relative proportioner af heatmappen, der havde fået identificeret taksonomi (Figur 18) Dette, sammenholdt med den lave artsrigdom og biodiversitet, kan tyde på problemer under enten prøvebehandling, PCR-amplificering, sekventering eller taksonomisk annotation af OTUs ved brug af GreenGenes2-databasen. Der kan dog stadig ses forskelle på de relative proportioner på tværs af de forskellige HNV-score på trods af den manglende taksonomi. Eksempelvis kan der for de to øverste grupperinger i heatmappen ses et mønster, idet HNV-score på fem og under har en højere relativ proportion af disse end de resterende, hvor kun HNV-scoren på tre er en undtagelse og generelt adskiller sig fra alle de andre HNV-scoringer. Datasættet for arkæ 16S rRNA genet blev fortsat anvendt til analyse under antagelsen om, at OTUs heraf stadig repræsenterede arkæer selv uden taksonomi.

Methanogener viste i modsætning til arkæer, at alle OTUs i datasættet havde fået identificeret taksonomi ned til slægts-niveau, hvilket højst sandsynligt skyldes anvendelsen af den kureret database (Figur 19). Alle prøver var domineret af *Methanosarcina*, som er et methanogen der kan forekomme i meget forskellige miljøer. Slægten kan både findes i jord med meget tilgængelig organisk kulstof samt nærringsfattig jord med lave koncentrationer af organisk kulstof, hvilket kan forklare dens udbredelse på tværs af alle HNV-scoringer (Zhou et al., 2021). Der blev yderligere fundet for methanogener, at slægten *Methanosphaera* næsten udelukkende forekom i HNV-scoren på ét. Da lokaliteterne med HNV-score på ét udgøres af marker, som sandsynligvis er gødet med husdyrgødning, kan forekomsten af *Methanosphaera* forklares af denne landbrugspåvirkning, eftersom slægten er fundet i tarmsystemet af flere husholdningsdyr (Mi et al., 2019; Palevich et al., 2024).

Alle CCA-plots, som blev konstrueret med HNV-kategori som eneste forklarende variabel, udviste en tydelig adskillelse af de tre HNV-kategorier for alle jordprøver (Figur 23-25). Af denne årsag bliver udelukkende NMDS-plots diskuteret, da disse bedre afspejler den underliggende variation i eDNA-sammensætning mellem prøverne.

Bakterier, arkæer og methanogener udviste alle en adskillelse af den høje og lave HNV-kategori samt et overlap af varierende grad mellem den mellem og lave HNV-kategori. For bakterie 16S rRNA genet var overlappet forårsaget af prøven fra HNV-scoren på fire, hvilket er logisk, da det er den tætteste HNV-score på den lave HNV-kategori. Ligesom for COI genet kan dette indikere, at grupperingerne af HNV-kategorierne kunne have været tilpasses til hver taksonomisk gruppe som egnet i stedet for at være inddelt i skridt af tre. NMDS-plots for arkæ 16S rRNA og mcrA genet udviste begge store overlap af den mellem og lave HNV-kategori, men dette kan i begge tilfælde skyldes, at der kun ligger to gentagelser bag den mellem HNV-kategori. For mcrA genet ses der, at de to prøver fra HNV-scoren på ét trækker i modsatte retninger på den anden ordinationsakse, hvor der igen ikke er fundet nogen signifikant effekt af metadatavariabler. En efterfølgende analyse af slægtsfordelingen for disse prøver fandt, at denne forskel sandsynligvis skyldes af at én prøve var stærkt domineret af *Methanosarcina*, mens den anden havde en mere jævn fordeling af slægte (Resultater ikke vist). Hvis der var udført flere gentagelser for alle HNV-scorer, ville der muligvis observeres flere lignende forskelle mellem lokationer af samme HNV-score.

Samlet set viser NMDS- såvel som CCA-plots, at eDNA fra bakterier, arkæer og methanogener fra jordprøver kan adskilles på baggrund af hvilken HNV-score, jordprøverne er indsamlet fra. For alle grupper blev der fundet tydelig forskel mellem den lave og høje HNV-kategori. Metoden har derfor lykkedes i at bevise et proof-of-concept af, at eDNA fra disse mikroorganismer har potentiale til at indikere naturværdien. **Hypotese 2** kan altså bekræftes, eftersom begge typer af ordinations-plots fandt forskel mellem enkelte eller alle HNV-kategorier. Igen skal det understreges, at dette er et proof-of-concept, og anderledes resultater kunne opnås hvis der var inkluderet flere gentagelser eller lokationer med HNV-score på 10, 11, 12 og 13.

For at identificere arter og -slægte, som udelukkende forekom i enkelte HNV-kategorier, blev der udarbejdet Venn-diagrammer for jordprøverne. Dette blev igen gjort med intentionen af at finde potentiale for udpegningen af indikatorarter og -slægter for forskellige HNV-kategorier. Der blev fundet flere unikke arter og slægte for bakterie 16S rRNA genet end arkæ 16S rRNA- og mcrA genet, hvilket ligesom for luftprøverne kan forklares af den højere artsrigdom og biodiversitet af bakterier sammenlignet med arkæer og methanogener (Figur 29-31). Efter litteraturstudie blev det konkluderet, at der ikke blev identificeret et tilstrækkeligt antal af arkæer eller methanogener til at indikere sammenhæng mellem deres økologi og HNV-kategorien, de forekom i. Én slægt af arkæer, *Nitrosocosmicus*, er dog fundet til at trives i jord med høj ammonium koncentration, hvor *Nitrosocosmicus franklandus* har den højeste tolerance og kan derfor ofte findes i landbrugsjord (Jiang et al.). Forekomsten af *N. franklandus* i den lave HNV-kategori kan altså forklares af, at lokationerne i denne kategori udelukkende består landbrugsjord eller græsarealer nær landbrugsjord. Arten *N. franklandus* kunne derfor udgøre en potentiel indikatorart blandt arkæer for lav HNV-score og næringsbelastet jord.

Modsat indikerede økologien af arterne og slægterne identificeret for bakterie 16S rRNA genet flere sammenhænge med HNV-kategorierne eller typen af jord, arterne og slægterne forekom i. Litteratur kunne findes, der beskrev alle arterne og slægterne fundet i den høje HNV-kategori som mutualistiske symbionter, gavnlige for jordkvaliteten eller essentielle for næringscyklusser (Li et al., 2025; Liu et al., 2022; Park & Jang, 2024; Wei et al., 2016). Eksempelvis er slægten *Conexibacter* fundet til at indikere sund jord og rhizosfærer, hvor den korrelerer positivt med tilgængeligt

kalium, fosfor og organisk materiale (Li et al., 2025). Slægten er også fundet i skovjord, hvilket stemmer overens med lokationerne for den høje HNV-kategori, der alle lå i skove (Li et al., 2025). Dette kan dog igen indikerer at korrelationen mellem eDNA og HNV-kategorien er mere afhængig af naturtypen end kvaliteten af naturen. Det blev også fundet, at studier for både *Arthrobacter Humicola* og *Bradyrhizobium canariense* foreslår, at deres anvendelse i agrikultur vil øge væksten og derved udbyttet af planter (Belechheb et al., 2025; Gomez et al., 2023). Det kan dog ikke vides, at dette kan forklare forekomsten af disse arter i den lave HNV-kategori, selvom denne kategori ofte består af landbrugsjord.

Samlet tyder det overstående på, at visse arter og slægter har potentiale som indikatorer for HNV-værdier, eftersom enkelte arter og slægter udelukkende forekom i specifikke HNV-kategorier, og at denne forekomst i flere tilfælde understøttes af eksisterende litteratur. **Hypotese 3** kan derfor bekræftes for bakterier og arkæer i jordprøverne. Det bør dog undersøges nærmere, om den observerede forskel i eDNA mellem HNV-kategorier primært afspejler naturtype snarere end naturværdi.

Resultaterne fra jordprøverne indikerer, at eDNA fra bakterier, arkæer og methanogener fra jord har potentiale til at kunne indikere naturværdien af et område. Her har specielt bakterier potentiale, da der for denne gruppe blev fundet høj taksonomisk opløsning, god adskillelse af eDNA-profiler og mange arter, som udelukkende forekom i specifikke grupperinger af HNV-scoringer. Det skal dog igen understreges at denne rapport er et proof-of-concept. Før metoden anvendt i denne rapport kan anvendes i reelle naturprojekter, kræver den altså større undersøgelse samt forbedring med flere gentagelser og prøver fra flere forskellige naturtyper.

Indsamlingen af eDNA fra jord er ikke lige så påvirket af vejrforholdene som luftbåren eDNA, men det har derimod andre begrænsninger. Eftersom det ikke er udsat for varierende temperaturer og høj UV-indstråling, så er det nemmere at lave en standardiseret metode og gentagelige resultater (Beng & Corlett, 2020). Spredningsevnen af eDNA i jord er dog lav og analysen heraf repræsenterer derfor kun de umiddelbare omgivelser og forholdene i jorden, eftersom det genetiske materiale hverken bæres med vind eller vandstrøm (Beng & Corlett, 2020; Johnson et al., 2023). Anvendelsen af eDNA fra jord er derfor ikke lige så oplagt til at eftersøge specifikke arter sammenlignet med luftbåren eDNA, da indsamlingsområdet er betydeligt mindre, og der derfor er mindre chance for at detektere den målrettede art. Derudover er eDNA profilen af bakterier og arkæer i jord meget divers og består af mange forskellige arter og funktionelle grupper af mikrober, hvilket også kan ses i resultaterne af denne rapport for eksempelvis bakterier (Yuan et al.). Det kan derfor være udfordrende at anvende den taksonomiske fordeling eller forekomsten af enkelte arter til at forklare økologien eller tilstanden af jorden uden at undersøge mange af interaktionerne mellem mikroberne heri.

Perspektivering

Anvendelsen af eDNA til vurderingen af naturområder er et nyt koncept, der har mange fordele når anvendt som supplement til eller erstatning af traditionelle metoder. Det Nationale Center for Miljø og Energi (DCE) lavede i år 2012 en vurdering af muligheder og begrænsningerne af anvendelse af eDNA i NOVANA-artsovervågningen og biodiversitetsvurderinger. Her fandt de, at eDNA var mere anvendelig i nogle situationer sammenlignet med traditionelle metoder (Andersen et al., 2012). Indsamlingen af eDNA er skånsom for arter, der forstyrres af traditionelle indsamlingsmetoder. Samtidig kan én prøve af eDNA også anvendes til flere formål såsom detektering af specifikke invasive, sårbare eller fredet arter og belysning af artssammensætningen og biodiversiteten af et habitat, hvilket gør det nemt og tidsbesparende at kombinere flere analyser (Andersen et al., 2012). Derudover giver eDNA-metoderne mulighed for at identificere arter, der er svære at artsbestemme morfologisk, hvilket kan lede til mere pålidelige data for artssammensætningen, styrke udregningen af artsindeks og inkludere arter, der endnu ikke er inkluderet i overvågninger eller vurderinger af naturområder (Andersen et al., 2012).

En af de største fordele eDNA præsenterer er tidsbesparelserne i felten. Eksempelvis kræver overvågningen af vandkalve to omgange fældefangst i maj og én omgang ketsjning i september, hvilket resulterer i et samlet tidsforbrug på omtrent 16 timer per lokalitet. Til sammenligning tager indsamling af eDNA til det samme formål kun ca. halvanden time per lokalitet (Andersen et al., 2012). Vurderingen fra DCE konkluderer, at eDNA kan anvendes til at supplere og til dels erstatte de traditionelle fangst- og overvågningsmetoder, hvis tætheden af målarter er lave eller målartern ikke er observeret på lokationen i længere tid (Andersen et al., 2012). Det skal dog bemærkes, at DCE's vurdering er fra 2012, og at eDNA-teknologien siden da har gennemgået betydelige fremskridt (Beng & Corlett, 2020; Prieto et al., 2024). Vurderingen fra DCE estimerede for eksempel, at en biodiversitetsovervågningen dengang vil koste mellem 15000 og 17500 DKK per prøve (Andersen et al., 2012). I dag findes langt billigere løsninger. En undersøgelse af Buchner et al. fra 2024, at biodiversiteten af insekter i 1815 prøver kunne analyseres for mindre end 50 € (428,64 DKK) per prøve ved brug af genetisk sekventering (Buchner et al., 2025). Metabarcoding-analyser af eDNA ved brug af nanopore flowcell kan også købes kommercielt ved eksempelvis den amerikanske virksomhed Genidaqs for 299 \$ (1902,24 DKK) per prøve, hvilket inkluderer behandlingen og analysen af prøven samt en standardiseret rapport (<https://genidaqs.com/commercial-rate-list>, besøgt d. 26/7/25).

Disse teknologiske fremskridt gør, at anvendelsen af eDNA som supplement til eller erstatning af traditionelle metoder i naturprojekter kan give anledning til nye og bedre resultater, tidsbesparelser og mindre omkostninger, når metoden anvendes i de korrekte situationer. Anvendelsen af eDNA har dog som førnævnt unikke begrænsninger og udfordringer, der afhænger af hvilket medie det indsamles fra. Anvendelsen heraf skal derfor tage højde for disse begrænsninger og udfordringer og kan ikke implementeres i et vilkårligt naturprojekt.

Resultaterne fra denne rapport indikerer, at luftbåren eDNA fra planter og invertebrater samt jord-eDNA fra bakterier, arkæer og methanogener kan adskilles baseret på naturværdien af lokationen, prøven er taget fra. Yderligere blev der identificeret arter og slægter, som kun forekom i specifikke HNV-kategorier, og hvis økologi kunne forklare denne selektive forekomst, hvilket indikerer et potentiale for at kunne finde indikatorarter for specifikke HNV-scorer. Fundne af denne rapport tyder samlet på, at indsamlingen og analysen af eDNA kan anvendes til at indikere naturværdien af områder, hvilket kan anvendes til at udpege områder af interesse med høj naturværdi til beskyttelse af naturen eller lav naturværdi til genopretning og forbedring af naturen. Anvendelsen

af eDNA til disse formål kræver dog yderligere undersøgning og derigennem udviklingen af specifikke metoder for indsamling og databehandling.

Det skal dog understreges, at denne rapport var et proof-of-concept. Undersøgelsens omfang var af den årsag begrænset, hvilket giver anlæg til flere forbedringer af metoden, hvis eDNA skal anvendes til dette eller lignende formål i fremtidige projekter. Resultaterne er lavet på baggrund af 11 gentagelser fra ni forskellige lokationer, så det er muligt at forskellene observeret mellem lokationerne ikke ville forekomme, hvis flere gentagelser eller lokationer blev inkluderet. Dertil er der kun blevet sammenlignet mod ét indeks for naturværdi. I projektområdet Bredeng findes der kun natur med en HNV-score mellem ét og ni, men indekset kan score op til 13. Inkluderingen af disse manglende scorere og flere indekser for naturværdi såsom naturtilstandsindekset fra tilstandsvurderingssystemet kunne give bedre grundlag for, at forskellen af eDNA er forårsaget af forskellen i naturværdi. Eksempelvis blev der for både luft- og jordprøverne fundet, at forekomsten af nogle arter og slægte i specifikke HNV-kategorier kunne forklares af naturtypen af lokationerne i stedet for kvaliteten af naturen. Dette kunne indikere, at hvis eDNA skal anvendes til at vurdere naturværdi, så kan kun områder af samme naturtype sammenlignes mod hinanden. Samme fremgangsmåde kendes også fra det bredt anvendte tilstandsvurderingssystemet, hvor struktur og artsindekset er specificeret til hver naturtype (Fredshavn & Skov, 2005).

Udover at inkludere flere gentagelser og naturtyper kan metoden i denne rapport også optimeres på andre aspekter. Indsamlingen af luftprøver var begrænset af energikilden, og hele filtret blev ikke anvendt til DNA-ekstraktion, hvilket samlet reducerer mængden af indsamlet og ekstraheret luftbåren eDNA. Lynggaard et al. fra Københavns Universitet har lavet en lignende indsamling af luftbåren eDNA. De opsatte kasser med lav og høj luftstrømning på træer, der ubemandet kunne filtrere og indsamle henholdsvis 13200 og 42000 L luft til eDNA-analyse hen over 12 timer (Lynggaard et al., 2024). Her opnåede studiet et antal reads per prøve mellem 12004 og 310696, mens metoden i denne rapport kun opnåede et gennemsnitligt antal reads per prøve mellem 342 og 1401 for luftprøverne. Hvis lignende fremgangsmåde var anvendt i denne rapport, kunne både datakvaliteten og artsregistreringen være øget. Yderligere ville metoden øge indsamlingstiden betydeligt og reducere hvor invasiv metoden er for eksempelvis vertebrater. En anderledes profil for arkæer kunne også opnås, hvis jord var indsamlet ved andre dybder end de 20-40 cm anvendt i denne rapport. Yuan et al. har fundet, at profilen for arkæer varierer mellem 0-80 cm, mens profilen for bakterier ikke er betydeligt associeret med dybden (Yuan et al., 2020). Indsamlingen af jord fra en anden dybde har derfor potentialet til at finde nye resultater for arkæer uden at påvirke resultaterne af bakterier betydeligt, og det ville derfor være muligt at finde større forskel mellem eDNA-profiler fra arkæer fra forskellige HNV-scoringer uden at ændre resultaterne fra bakterier.

Valget af primerpar kan også have en stor effekt på hvilke organismer, der findes og identificeres (Prieto et al., 2024). Mange OTUs kunne ikke identificeres, hvor specielt OTUs fra COI og arkæ 16S rRNA genet manglede taksonomi. Dette begrænsede analysen af den taksonomiske fordeling af disse gener betydeligt. Mens det ikke kan vides præcis hvilken fejlkilde, der kunne have forårsaget den manglende identificering, så er det sandsynligt at valget af primer, behandlingen under amplicon PCR eller valget af database havde en effekt. For at metoden i fremtiden kunne lykkes i at identificere flere invertebrater og arkæer, så kunne der forsøges at anvende en anden primer, der bedre målretter disse grupper. Hertil har Prieto et al. fundet, at identificering af den samme taksonomiske gruppe ved anvendelsen af flere primerpar øger proportionen af identificeret organismer i en population (Prieto et al., 2024). Studiet foreslår eksempelvis, at en kombination af rbcL- og ITS2 primerpar øger antallet af identificeret planter. Anvendelsen af andre eller flere

primerpar kunne have øget antallet af slægter og arter identificeret i denne rapport, hvilket kunne have påvirket forskellen observeret mellem lokationers HNV-score og indsamlet eDNA.

Hvis dette ikke resulterer i en bedre opløsning, så kunne der også forsøges med færre cykler under amplicon PCR. Eksempelvis blev der anvendt 40 cykler under amplicon PCR af COI genet, hvor et lignende studie af Buchner et al. kun anvendte 20-25 cykler under PCR amplificeringen af samme gen (Buchner et al., 2025). Dette studie anvendte dog også en anden database kaldet BOLDigger og lykkedes i at identificere 10803 arter i Tyskland, hvilket tilsvarende en tredjedel af landets arter af insekter (Buchner et al., 2025). Hvis BOLDigger var anvendt i denne rapport for invertebrater i stedet for Midori2-databasen, så kunne der potentielt være opnået en højere taksonomisk opløsning af invertebrater. Ligeledes kunne der forsøges at anvende andre databaser for arkæ 16S rRNA.

Konklusion

Denne rapport har som proof-of-concept undersøgt potentialet for at anvende miljø-DNA (eDNA) til vurdering af naturkvaliteten i naturområder som supplement til eller erstatning for eksisterende feltbaserede metoder. Undersøgelsen er baseret på analyser af eDNA-profiler for planter, vertebrater og invertebrater fra luftprøver samt bakterier, arkæer og methanogener fra jordprøver, som er indsamlet fra ni lokaliteter med varierende HNV-score i ét naturområde.

Resultaterne af eDNA fra både luft- og jordprøver fandt ingen lineær sammenhæng mellem artsrigdommen eller biodiversiteten af eDNA og HNV-scoren, og der blev ligeledes fundet ingen tydelige mønstre i fordelingen af slægter på tværs af HNV-scorer. På trods af de få antal gentagelser blev der dog fundet forskel mellem eDNA-profilerne fra forskellige grupperinger af HNV-scorer (HNV-kategorier) ved anvendelsen af CCA- og NMDS-plots. Generne for planter, invertebrater, bakterier, arkæer og methanogener adskilte den høje og lave HNV-kategori, hvor den mellem HNV-kategori enten også adskilte sig eller overlappede med enten den høje eller lave kategori. Kun vertebrat 16S rRNA genet viste ingen betydelig eller systematisk forskel mellem eDNA-profilerne og HNV-scorer. Derudover blev der identificeret arter og slægter inden for alle seks taksonomiske grupper, som udelukkende forekom i specifikke HNV-kategorier. Ud fra dette blev der på baggrund af et litteratur studie fundet potentiale for at identificere indikatorarter og -slægter for forskellige grupperinger af HNV-scorer.

Samlet set kan denne rapport som proof-of-concept bekræfte, at eDNA fra både luft og jord har potentiale til at indikere naturværdien områder samt identificere arter og slægter fundet i og omkring området. Metoden har dog meget plads til forbedring, og der kræves yderlig undersøgelse med flere gentagelser og flere inkluderet naturtyper for at styrke pålideligheden af resultaterne i denne rapport. Fundne i denne rapport indikerer dog, at eDNA i fremtiden kan anvendes i naturprojekter til at vurdere og kategorisere naturværdi.

Bilag

PCR-forhold

Bilag 1: Forholdene for PCR-reaktionen af rbcL gener.

Skridt	Temperatur (°C)	Tid (Sek.)	Cykler
Enzym-aktivering	98	30	1
Denaturering	98	10	40
Annealing	55	30	40
Extension	70	30	40
Final extension	70	180	1

Bilag 2: Forholdene for PCR-reaktionen af vertebrat 16S rRNA gener.

Skridt	Temperatur (°C)	Tid (Sek.)	Cykler
Enzym-aktivering	95	180	1
Denaturering	95	30	40
Annealing	55	30	40
Extension	72	45	40
Final extension	72	180	1

Bilag 3: Forholdene for PCR-reaktionen af COI gener.

Skridt	Temperatur (°C)	Tid (Sek.)	Cykler
Enzym-aktivering	95	180	1
Denaturering	95	30	40
Annealing	40	60	40
Extension	72	60	40
Final extension	72	180	1

Bilag 4: Forholdene for PCR-reaktionen af bakterie 16S rRNA gener.

Skridt	Temperatur (°C)	Tid (Sek.)	Cykler
Enzym-aktivering	95	180	1
Denaturering	95	30	30
Annealing	55	30	30
Extension	72	90	30
Final extension	72	180	1

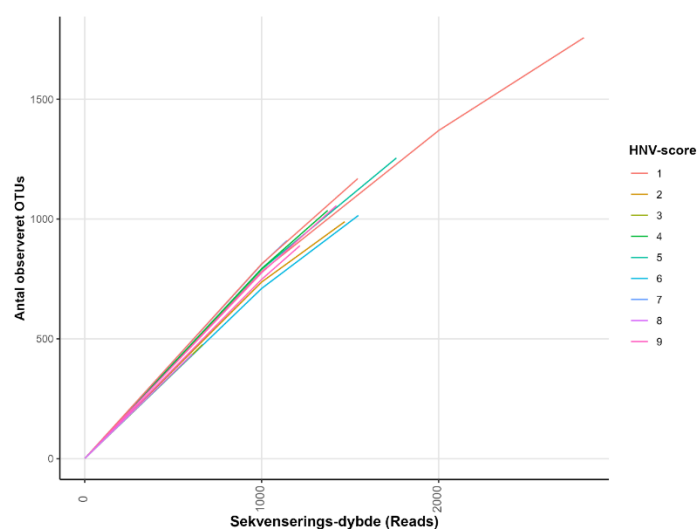
Bilag 5: Forholdene for PCR-reaktionen af arkæ 16S rRNA gener.

Skridt	Temperatur (°C)	Tid (Sek.)	Cykler
Enzym-aktivering	95	180	1
Denaturering	95	30	30
Annealing	55	30	30
Extension	72	70	30
Final extension	72	180	1

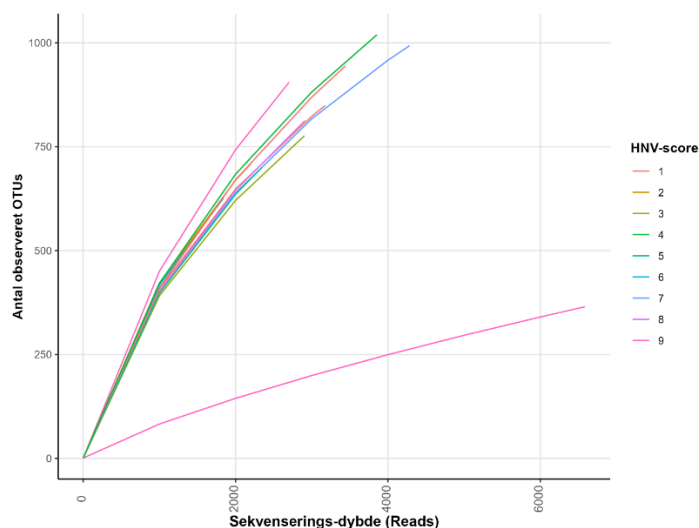
Bilag 6: Forholdene for PCR-reaktionen af *mcrA* gener.

Skridt	Temperatur (°C)	Tid (Sek.)	Cykler
Enzym-aktivering	95	180	1
Denaturering	95	30	35
Annealing	50	30	35
Extension	72	45	35
Final extension	72	180	1

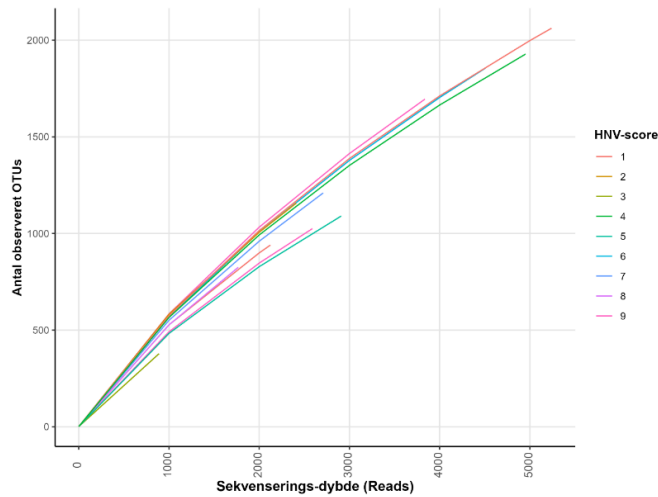
Rarefaction-Kurver



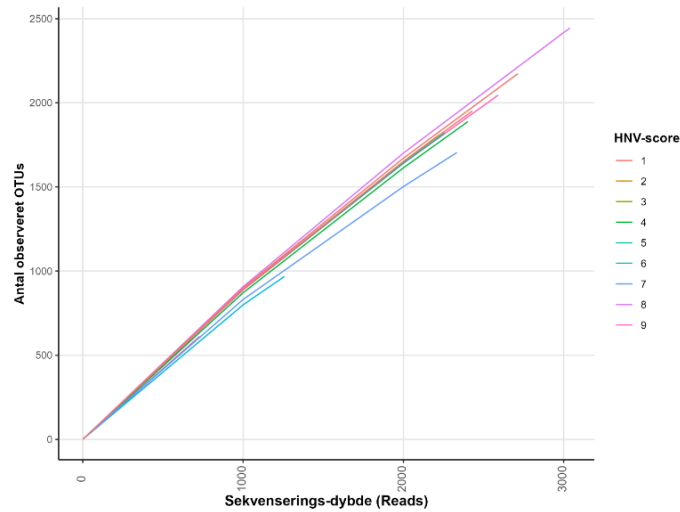
Bilag 7: Rarefaction-kurver for prøverne fra *rbcl* genet, hvor x-aksen indikerer sekventerings-dybden i reads og y-aksen indikerer antal observeret OTUs. Prøverne er farvet baseret på HNV-score.



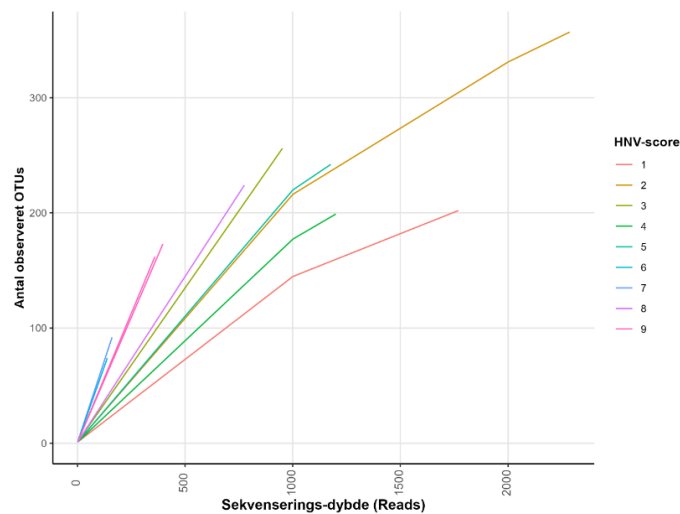
Bilag 8: Rarefaction-kurver for prøverne fra vertebrat 16S rRNA genet, hvor x-aksen indikerer sekventerings-dybden i reads og y-aksen indikerer antal observeret OTUs. Prøverne er farvet baseret på HNV-score.



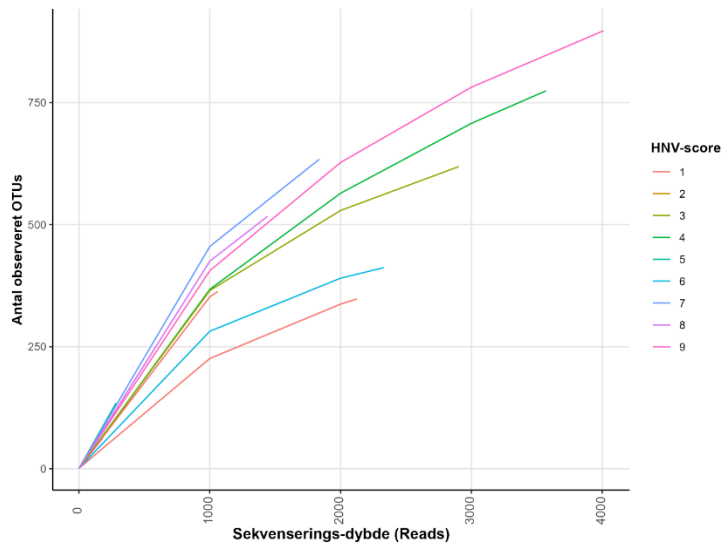
Bilag 9: Rarefaction-kurver for prøverne fra COI genet, hvor x-aksen indikerer sekvenserings-dybden i reads og y-aksen indikerer antal observeret OTUs. Prøverne er farvet baseret på HNV-score.



Bilag 10: Rarefaction-kurver for prøverne fra bakterie 16S rRNA genet, hvor x-aksen indikerer sekvenserings-dybden i reads og y-aksen indikerer antal observeret OTUs. Prøverne er farvet baseret på HNV-score.

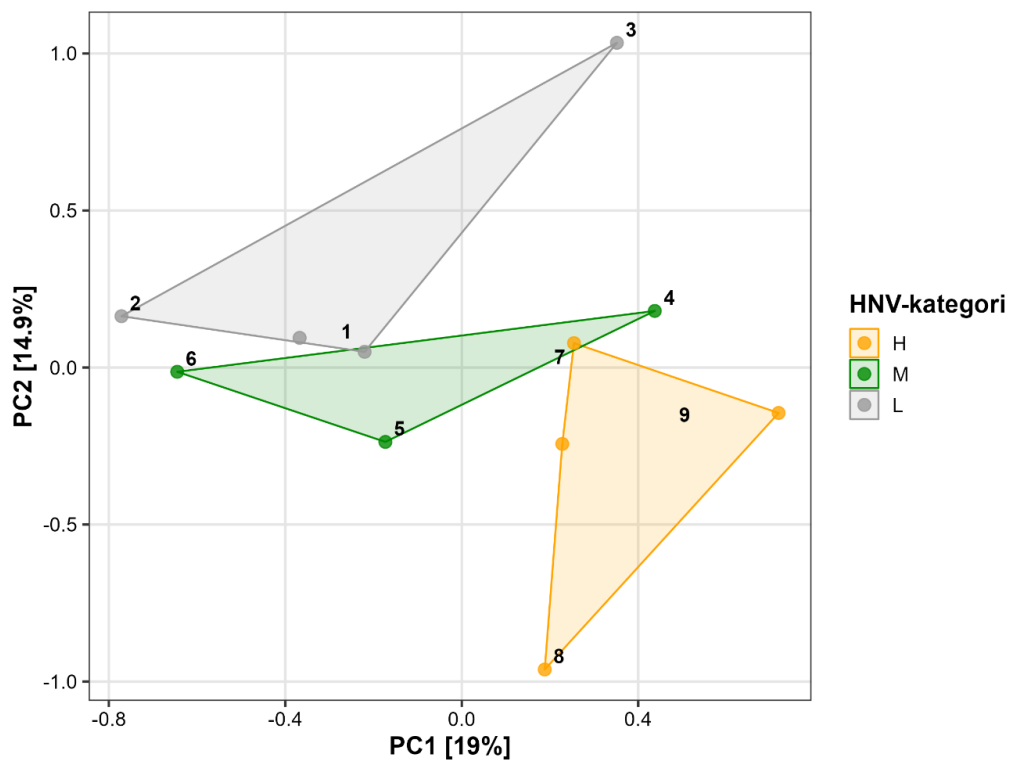


Bilag 11: Rarefaction-kurver for prøverne fra arkæ 16S rRNA genet, hvor x-aksen indikerer sekvenserings-dybden i reads og y-aksen indikerer antal observeret OTUs. Prøverne er farvet baseret på HNV-score.

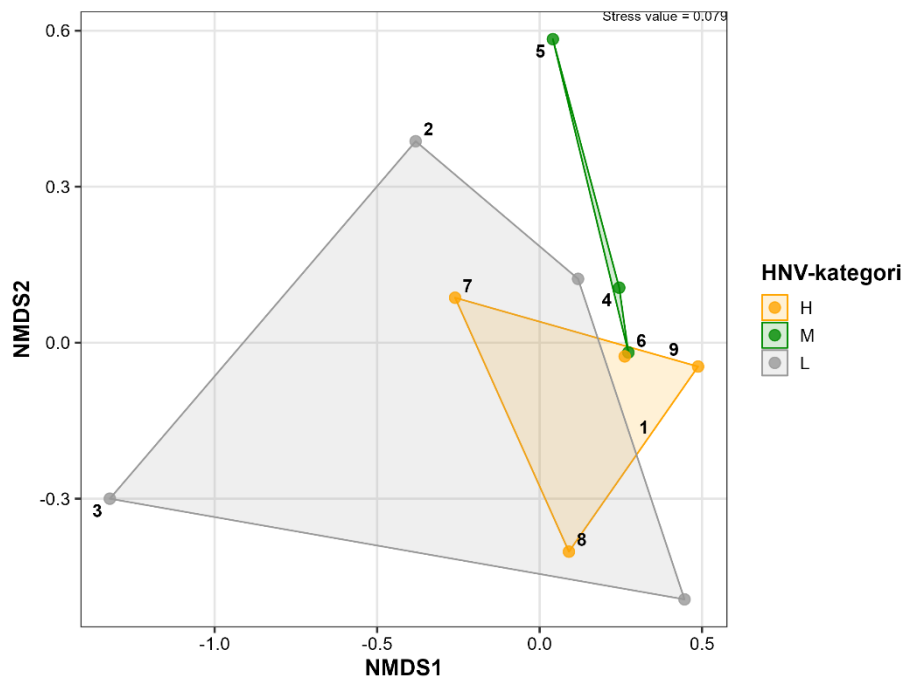


Bilag 12: Rarefaction-kurver for prøverne fra *mcrA* genen, hvor x-aksen indikerer sekvenserings-dybden i reads og y-aksen indikerer antal observeret OTUs. Prøverne er farvet baseret på HNV-score.

Ordinationsplots



Bilag 13: Hellinger-transformeret PCR-plot af prøverne for *rbcL* genen, hvor x-aksen angiver den første ordinations-akse og y-aksen angiver den anden ordinations-akse. Tal er angivet til hvert punkt for deres tilsvarende HNV-score, og polygoner grupperer disse punkter i deres tilsvarende HNV-kategori.



Bilag 14: NMDS-plot baseret på Bray-Curtis afstand for svampe detekteret af COI genen, hvor x-aksen angiver den første ordinations-akse og y-aksen angiver den anden ordinations-akse. Tal er angivet til hvert punkt for deres tilsvarende HNV-score, og polygoner grupperer disse punkter i deres tilsvarende HNV-kategori. Stress-værdien er angivet i øverste højre hjørne.

Kilder

- Andersen, L. W., Søgaard, B., Johansson, L. S., & Wiberg-Larsen, P. (2012). *Anvendelse af eDNA-metoder i NOVANA-artsovervågningen*. <http://dce.au.dk>
- Aziz, S. A., Clements, G. R., Peng, L. Y., Campos-Arceiz, A., McConkey, K. R., Forget, P. M., & Gan, H. M. (2017). Elucidating the diet of the Island flying fox (*Pteropus hypomelanus*) in Peninsular Malaysia through Illumina next-generation sequencing. *PeerJ*. <https://doi.org/10.7717/peerj.3176>
- Bahram, M., Anslan, S., Hildebrand, F., Bork, P., & Tedersoo, L. (2019). Newly designed 16S rRNA metabarcoding primers amplify diverse and novel archaeal taxa from the environment. *Environmental Microbiology Reports*, 11(4), 487–494. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12684>
- Baptiste, É., Brochier, C., & Boucher, Y. (2005). Higher-level classification of the Archaea: Evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea*, 1(5), 353–363. <https://doi.org/10.1155/2005/859728>
- Bar-On, Y. M., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(25), 6506–6511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115>
- Belechheb, T., Yemalahi, A., Bouhnik, O., Hassani, M. Z., El Galiou, O., Laglaoui, A., Bakkali, M., El Idrissi, M. M., & Arakrak, A. (2025). Plant Growth of the Wild Forage Legume *Genista monspessulana* is Improved by *Bradyrhizobium* sp. sv. *Genistearum* in the Acidic Soils of Northern Morocco. *Current Microbiology*, 82(6). <https://doi.org/10.1007/s00284-025-04249-3>
- Bell, K. (2021, July). *rbcL reference library July 2021*. Figshare. <https://doi.org/https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.5504193.v1>
- Beng, K. C., & Corlett, R. T. (2020). Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation*, 29(7), 2089–2121. <https://doi.org/10.1007/s10531-020-01980-0>
- Bita-Nicolae, C. (2023). Distribution of the Riparian *Salix* Communities in and around Romanian Carpathians. *Diversity*, 15(397). <https://doi.org/10.3390/d15030397>
- Buchner, D., Sinclair, J. S., Ayasse, M., Beermann, A. J., Buse, J., Dziock, F., Enss, J., Frenzel, M., Hörrén, T., Li, Y., Monaghan, M. T., Morkel, C., Müller, J., Pauls, S. U., Richter, R., Scharnweber, T., Sorg, M., Stoll, S., Twietmeyer, S., ... Leese, F. (2025). Upscaling biodiversity monitoring: Metabarcoding estimates 31,846 insect species from Malaise traps across Germany. *Molecular Ecology Resources*, 25(1). <https://doi.org/10.1111/1755-0998.14023>
- Canova, L., Gazzola, A., Pollini, L., & Balestrieri, A. (2020). Surveillance and habitat diversity affect European brown hare (*Lepus europaeus*) density in protected breeding areas. *European Journal of Wildlife Research*, 66(66). <https://doi.org/10.1007/s10344-020-01405-x>
- Donnelly, A., Yu, R., Rehberg, C., & Schwartz, M. D. (2024). Variation in the timing and duration of autumn leaf phenology among temperate deciduous trees, native shrubs and non-native

- shrubs. *International Journal of Biometeorology*, 68, 1663–1673.
<https://doi.org/10.1007/s00484-024-02693-7>
- Ejrnæs, R., Nygaard, B., Kjær, C., Baattrup-Pedersen, A., Kirstine Brunbjerg, A., Clausen, K., Fløjgaard, C., S Hansen, J. L., D Hansen, M. D., Eske Holm, T., Just Johnsen, T., & Sander, L. (2021). *Danmarks biodiversitet 2020. Tilstand og udvikling*.
- Ejrnæs, R., Skov, F., Bladt, J., Fredshavn, J., & Nygaard, B. (2012). *UDVIKLING AF EN HIGH NATURE VALUE (HNV) INDIKATOR*.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Frederiksen, S., Rasmussen, F. N., & Seberg, O. (2019). *Dansk Flora* (L. N. Hammen, Ed.; 3rd ed.). Gyldendal.
- Fredshavn, J. R., & Ejrnæs, R. (2009). *NATURTILSTAND I HABITATOMRÅDERNE Habitatdirektivets lysåbne naturtyper. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. 76 s. – Faglig rapport fra DMU nr. 735*.
- Fredshavn, J., & Skov, F. (2005). *Vurdering af naturtilstand. Danmarks Miljøundersøgelser. 94 s. – Faglig rapport fra DMU nr. 548*.
- García-Machado, E., Normandeau, E., Côté, G., & Bernatchez, L. (2023). How eDNA data filtration, sequence coverage, and primer selection influence assessment of fish communities in northern temperate lakes. *Environmental DNA*, 5(6), 1216–1233.
<https://doi.org/10.1002/edn3.444>
- Garrett, N. R., Watkins, J., Simmons, N. B., Fenton, B., Maeda-Obregon, A., Sanchez, D. E., Froehlich, E. M., Walker, F. M., Littlefair, J. E., & Clare, E. L. (2023). Airborne eDNA documents a diverse and ecologically complex tropical bat and other mammal community. *Environmental DNA*, 5(2), 350–362. <https://doi.org/10.1002/edn3.385>
- Gomez, J. S., Shaikhet, M., Loganathan, A. K., Darnowski, M. G., Boddy, C. N., McMullin, D. R., & Avis, T. J. (2023). Characterization of Arthropeptide B, an Antifungal Cyclic Tetrapeptide from *Arthrobacter humicola*. *Journal of Chemical Ecology*, 49, 528–536.
<https://doi.org/10.1007/s10886-023-01438-x>
- Guiry, E., & Buckley, M. (2018). Urban rats have less variable, higher protein diets. *Proc. R. Soc. B.*, 285. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1441>
- Guthrie, A. M., Cooper, C. E., Bateman, P. W., van der Heyde, M., Allentoft, M. E., & Nevill, P. (2024). A quantitative analysis of vertebrate environmental DNA degradation in soil in response to time, UV light, and temperature. *Environmental DNA*, 6(4).
<https://doi.org/10.1002/edn3.581>
- Jo, T., Murakami, H., Masuda, R., Sakata, M. K., Yamamoto, S., & Minamoto, T. (2017). Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), e25–e33.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12685>
- Johnson, M. D., Barnes, M. A., Garrett, N. R., & Clare, E. L. (2023). Answers blowing in the wind: Detection of birds, mammals, and amphibians with airborne environmental DNA in a

- natural environment over a yearlong survey. *Environmental DNA*, 5(2), 375–387.
<https://doi.org/10.1002/edn3.388>
- Kjær, C., Adrados, L. C., Boel, M., Briggs, L., Christensen, P. K., Damm, N., Frisenvænge, J., Fog, K., Hansen, R. R., Hesselsøe, M., Mortensen, R. M., Ravn, P., Stosiek, S., Strandberg, M., Therkildsen, O. R., & Wilberg-Larsen, P. (2023). *Opdatering af: Håndbog om dyrearter på habitatdirektivets Bilag IV. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 271 s. - Videnskabelig rapport nr. 520.* <https://dce.au.dk/udgivelser/vr/501-599>
- Lei, T., Gu, J., Zhao, M., Chen, Y., Song, C., & Qi, X. (2024). Seasonal Dynamics of Non-Biting Midges (Diptera: Chironomidae) and Relevant Environmental Factors. *Insects*, 15(12), 921.
<https://doi.org/10.3390/insects15120921>
- Li, G., Li, X., Jin, T., Jiang, M., Shi, P., & Wei, G. (2025). Spatial Heterogeneity in Soil Microbial Communities Impacts Their Suitability as Bioindicators for Evaluating Productivity in Agricultural Practices. *Microorganisms*, 13(5), 1160. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13051160>
- Liu, L., Jiang, H., Zhang, X., & Peng, D. (2022). Biogeographic pattern and relevant environmental factors for rhizobial communities in the rhizosphere and root nodules of kudzu (*Pueraria lobata*). *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 49136–49146.
<https://doi.org/10.1007/s11356-022-19335-3>
- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J., & Riley, P. W. (2002). The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, 148, 3521–3530.
- Lynggaard, C., Frøslev, T. G., Johnson, M. S., Olsen, M. T., & Bohmann, K. (2024). Airborne environmental DNA captures terrestrial vertebrate diversity in nature. *Molecular Ecology Resources*, 24(1). <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13840>
- Makarek, V., & Legendre, P. (2002). Nonlinear redundancy analysis and canonical correspondence analysis based on polynomial regression. *Ecology*, 83(4), 1146–1161.
[https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[1146:NRAACC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[1146:NRAACC]2.0.CO;2)
- Mi, J., Peng, H., Wu, Y., Wang, Y., & Liao, X. (2019). Diversity and community of methanogens in the large intestine of finishing pigs. *BMC Microbiology*, 19(83).
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1459-x>
- Miljø- og Ligestillingsministeriet. (2019). *Bekendtgørelse af lov om naturbeskyttelse.* <https://www.retsinformation.dk/eli/Lta/2019/240>.
- Naturstyrelsen. (2014). *Natura 2000 basisanalyse 2016-2021, Revideret udgave, Hedeområder ved Store Råbjerg, Natura 2000-område nr. 85, Habitatområde H74, Fuglebeskyttelsesområde F48.*
- Nykonenko, A. (2019). Impact of the plant cover on patterns of European roe deer (*Capreolus capreolus*) bed-sites distribution. *Theriologia Ukrainica*, 17, 80–87.
<https://doi.org/10.15407/pts2019.17.080>
- Obilor, E. I., & Amadi, E. C. (2018). Test for Significance of Pearson's Correlation Coefficient (r). *International Journal of Innovative Mathematics, Statistics & Energy Policies*, 6(1), 11–23.

- Palevich, N., Jeyanathan, J., Reilly, K., Palevich, F. P., Maclean, P. H., Li, D., Altermann, E., Kelly, W. J., Leahy, S. C., Attwood, G. T., Ronimus, R. S., Henderson, G., & Janssen, P. H. (2024). Complete genome sequence of *Methanosphaera* sp. ISO3-F5, a rumen methylophilic methanogen. *Microbiology Resource Announcements*, 13(4).
<https://doi.org/10.1128/mra.00043-24>
- Park, S., & Jang, J. (2024). Excessive Extracellular Ammonium Production by a Free-Living Nitrogen-Fixing Soil *Clostridium* sp. Strain. *Microorganisms*, 12, 2634.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12122634>
- Prieto, A. E., Hardion, L., Debortoli, N., & Beisel, J.-N. (2024). Finding the perfect pairs: A match-making of plant markers and primers for multi-marker eDNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 24(4), e13937. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13937>
- Reid, N., Dingerkus, S. K., Stone, R. E., Pietravalle, S., Kelly, R., Buckley, J., Beebee, T. J. C., Marnell, F., & Wilkinson, J. W. (2013). Population enumeration and assessing conservation status in a widespread amphibian: A case study of *Rana temporaria* in Ireland. *Animal Conservation*, 16(5), 519–527. <https://doi.org/10.1111/acv.12022>
- Roger, F., Ghanavi, H. R., Danielsson, N., Wahlberg, N., Löndahl, J., Pettersson, L. B., Andersson, G. K. S., Boke Olén, N., & Clough, Y. (2022). Airborne environmental DNA metabarcoding for the monitoring of terrestrial insects—A proof of concept from the field. *Environmental DNA*, 4(4), 790–807. <https://doi.org/10.1002/edn3.290>
- Tavares-Dias, M., & Oliveira, M. S. B. (2023). Global distribution patterns of *Caligus* Müller, 1785 (Copepoda: Caligidae) associated to teleost fishes, with physiological and histopathological data and description of treatment strategies. *An Acad Bras Cienc*, 95(1), e20220281. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202320220281>
- Tordoni, E., Ametrano, C. G., Banchi, E., Ongaro, S., Pallavicini, A., Bacaro, G., & Muggia, L. (2021). Integrated eDNA metabarcoding and morphological analyses assess spatio-temporal patterns of airborne fungal spores. *Ecological Indicators*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107032>
- Unković, N., Dimkić, I., Stanković, S., Jelikić, A., Stanojević, D., Popović, S., Stupar, M., Vukojević, J., & Grbić, M. L. (2018). Seasonal diversity of biodeteriogenic, pathogenic, and toxic constituents of airborne mycobiota in a sacral environment. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 69(4), 317–327. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3194>
- Vences, M., Thomas, M., Van Der Meijden, A., Chiari, Y., & Vieites, D. R. (2005). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2(5). <https://doi.org/10.1186/1742-9994-2-5>
- Volpato, A., Buckley, C., & Moran, J. (2024). Assessing and mapping habitat quantity and quality in High Nature Value (HNV) agricultural landscapes. *Journal for Nature Conservation*, 78. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2024.126568>
- Ward, D. V., Gevers, D., Giannoukos, G., Earl, A. M., Methé, B. A., Sodergren, E., Feldgarden, M., Ciulla, D. M., Tabbaa, D., Arze, C., Appelbaum, E., Aird, L., Anderson, S., Ayvaz, T., Belter, E., Bihan, M., Bloom, T., Crabtree, J., Courtney, L., ... Birren, B. W. (2012). Evaluation of 16S rDNA-Based Community Profiling for Human Microbiome Research. *PLoS ONE*, 7(6), e39315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039315>

- Wei, X. M., He, R., Chen, M., Su, Y., & Ma, R. C. (2016). Conversion of methane-derived carbon and microbial community in enrichment cultures in response to O₂ availability. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*, 7517–7528. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-6017-y>
- Yuan, C. L., Zhang, L. M., Wang, J. T., Teng, W. K., Hu, H. W., Shen, J. P., & He, J. Z. (2020). Limited effects of depth (0–80 cm) on communities of archaea, bacteria and fungi in paddy soil profiles. *European Journal of Soil Science*, *71*, 955–966. <https://doi.org/10.1111/ejss.12921>
- Zhou, J., Holmes, D. E., Tang, H.-Y., & Lovley, D. R. (2021). Correlation of Key Physiological Properties of *Methanosarcina* Isolates with Environment of Origin. *Applied and Environmental Microbiology*, *87*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00731-21>
- Zhu, C., & Yu, J. (2009). Nonmetric Multidimensional Scaling Corrects for Population Structure in Association Mapping With Different Sample Types. *Genetics*, *182*(3), 875–888. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.098863>