

Kortlægning af udbredelsen af krebs og krebsepest i danske ferske vande

Søren Berg, Magnus Wulff Jacobsen, Stig Pedersen og Brian Klitgaard Hansen

DTU Aqua-rapport nr. 401-2022



Kortlægning af udbredelsen af krebs og krebsepest i danske ferske vande

Søren Berg, Magnus Wulff Jacobsen, Stig Pedersen og Brian Klitgaard Hansen

DTU Aqua-rapport nr. 401-2022

Kolofon

Titel: Kortlægning af udbredelsen af krebs og krebsepest i danske ferske vande

Forfattere: Søren Berg, Magnus Wulff Jacobsen, Stig Pedersen og Brian Klitgaard Hansen

DTU Aqua-rapport nr.: 401-2022

År: Maj 2022

Reference: Berg, S., Jacobsen, M.W., Pedersen, S. & Hansen, B.K. (2022). Kortlægning af udbredelsen af krebs og krebsepest i danske ferske vande. DTU Aqua-rapport nr. 401-2022. Institut for Akvatiske Ressourcer, Danmarks Tekniske Universitet. 39 pp. + bilag

Forsidefoto: Den naturligt hjemmehørende flodkrebs. Foto: Finn Sivebæk

Udgivet af: Institut for Akvatiske Ressourcer, Vejlsovej 39, 8600 Silkeborg

Download: www.aqua.dtu.dk/publikationer

ISSN: 1395-8216

ISBN: 978-87-7481-329-3

DTU Aqua-rapporter er afrapportering fra forskningsprojekter, oversigtsrapporter over faglige emner, redogørelser til myndigheder o.l. Med mindre det fremgår af kolofonen, er rapporterne ikke fagfællebedømt (peer reviewed), hvilket betyder, at indholdet ikke er gennemgået af forskere uden for projektgruppen.

Forord

Denne rapport beskriver den første systematiske kortlægning af udbredelsen af ferskvandskrebs og den parasitiske sygdom krebsepest i Danmark. Alle tidligere forsøg på kortlægning af udbredelsen af krebs, har primært været baseret på indsamling af oplysninger om mere eller mindre tilfældige fund. Det er således en markant forbedring af datagrundlaget for forvaltning af disse arter, der er tale om.

Baggrunden for projektet er Miljøstyrelsens offentlige EU-udbud af opgaven: "Kortlægning af krebs og krebsepest i danske ferske vande", udbudsbekendtgørelse nr. 2020/S 020-044375. Miljøstyrelsen ønskede opgaven udført som led i forvaltning af fremmede og invasive arter i henhold til EU-forordningen om invasive arter (EU nr. 1143/2014 af 22. oktober 2014) og bekendtgørelse om invasive arter (BEK nr. 1285 af 12/11/2018). I forvaltningen af de invasive krebsarter og krebsepest indgår også viden om udbredelsen af den hjemmehørende europæiske flodkrebs i Danmark.

DTU Aqua bød på opgaven og blev, med indgåelse af kontrakt 1. maj 2020, valgt til at udføre den. Projektet forløb i perioden fra kontrakten blev underskrevet til 1. december 2021.

Følgende medarbejdere ved DTU Aqua har deltaget i projektet: Postdoc Brian Klitgaard Hansen, forsker Magnus Wulff Jacobsen, akademisk medarbejder Stig Søndergaard Pedersen, specialestuderende Enrique Garcia-Argudo Garcia, laborant Britta Pedersen og seniorrådgiver Søren Berg (projektleder). Professor Einar Eg Nielsen og seniorforsker Dorte Bekkevold, begge DTU Aqua, har ydet faglig sparring. Ligeledes har vi rådført os fagligt med Davis Strand og Trude Vrålstad, Veterinærinstituttet i Oslo. Hermed en tak til dem alle.

Indsamling af prøver i felten er udført af Knud Erik Vindum, Peter Gruth og Søren Salomon Pedersen. Laboratoriearbejdet er udført på DTU Aquas genetiske laboratorium i Silkeborg. Kontaktperson hos Miljøstyrelsen gennem projektperioden har være biolog Julian Dons Henriksen, Arter- & Naturbeskyttelse.

Henvendelse vedrørende denne rapport kan ske til:

DTU Aqua
Sektion for Ferskvandsfiskeri og -økologi
Vejlssøvej 39
8600 Silkeborg
Telefon: 35 88 31 00
E-mail: ffi@aqua.dtu.dk

Silkeborg, maj 2022

Søren Berg
Seniorrådgiver

Indhold

Sammenfatning	5
English summary	7
1. Indledning	9
2. Metoder og materialer	11
2.1 Projektets start	11
2.2 Planlægning af feltarbejde	11
2.3 Udvælgelse af prøvetagningsstationer i vandløb 2020	11
2.4 Genbesøg af Skjern Å 2021	13
2.5 Udvælgelse af prøvetagningsstationer på øer 2021	13
2.6 Udvælgelse af små søer til prøvetagning	14
2.7 Karlstrup Kalkgrav	14
2.8 Samlet prøvetagning	15
2.9 Indsamling af eDNA i felten	15
2.10 Laboratorieanalyser	16
2.11 Laboratoriearbejde	17
2.12 DNA-oprensning	17
2.13 Analysearbejde	18
2.14 Analyseopsætning	18
2.15 Detektions validering	18
3. Resultater	20
3.1 Feltarbejdets forløb	20
3.2 Analyseresultater	23
4. Diskussion	29
4.1 Hvor stammer DNA i en prøve i et vandløb præcis fra?	29
4.2 Potentielle fejlkilder ved eDNA monitoring	29
4.3 Flodkrebs	32
4.4 Signalkrebs	32
4.5 Galizisk sumpkrebs	33
4.6 Krebspest	33
4.7 Konklusion	34
Referencer	35
Bilag	39

Sammenfatning

Denne rapport beskriver resultaterne af en landsdækkende kortlægning af udbredelsen af krebs og krebsepest i Danmarks ferske vande. Projektet er udført i perioden 1. maj 2020 til 1. december 2021.

Den primære undersøgelsesmetode, der er anvendt, er indsamling af vandprøver, som er blevet filtrerede og konserverede på stedet. Filtratet er efterfølgende anvendt til analyse for forekomst af DNA – såkaldt miljø-DNA eller eDNA – fra krebs og krebsepest.

Der er indsamlet vandprøver fra vandløb og de dertil knyttede søer i hele landet inkl. otte større øer, hvor der findes væsentlige vandløb: Mors, Als, Ærø, Langeland, Lolland, Falster, Møn og Bornholm. Gennem analyse af disse indsamlede prøver, er udbredelsen af krebs og krebsepest på landsplan beskrevet. Herudover er der udført en mere detaljeret indsamling af vandprøver fra både vandløb og store samt små søer på fem udvalgte øer: Samsø, Als, Ærø, Langeland og Møn, for dels at beskrive omfanget af forekomst af krebs i Danmarks mange småsøer og dels at vurdere om en eller flere af de undersøgte øer egner sig som såkaldt safesite eller "reservat" for flodkrebs (*Astacus astacus*).

Ud af Danmarks ca. 900 selvstændige vandløb, blev det valgt at undersøge alle de vandløb, der har et hovedløb på mindst 10 km længde, for dem der er længere end 20 km med én prøve pr. 10 km. For kortere vandløb blev 50 % af dem, der har en længde mellem 5 og 10 km undersøgt samt 20 % af vandløbene med længde mellem 2 og 5 km. Vandløb < 2 km blev ikke undersøgt.

Den anvendte teststrategi for de indsamlede prøver er følgende: alle de indsamlede prøver er blevet testet for forekomst af tre arter af ferskvandskrebs: flodkrebs, signalkrebs (*Pacifastacus leniusculus*) og galizisk sumpkrebs (*Astacus leptodactylus*). Alle prøver, der blev fundet positive for krebs, er efterfølgende blevet testet for forekomsten af krebsepest (*Aphanomyces astaci*), idet krebsepest er en obligat parasit, der ikke kan forventes at forekomme i vandområder uden en bestand af krebs, der kan være vært for parasitten. Endelig er en række udvalgte prøver fra vandløb blevet testet for forekomst af marmorkrebs (*Procambarus virginalis*) og Louisiana flodkrebs (*Procambarus clarkii*).

I alt blev 838 stationer besøgt, heraf 635 beliggende i vandløb og 203 beliggende i søer. Det resulterede i indsamling af 768 prøver, hvor mellem 0,5 og 5 l vand blev filtreret. På en del stationer var mængden af partikler i vandet så stor, at filteret stoppede til inden målet på 5 l var nået. På 70 stationer var det slet ikke muligt at indsamle vandprøve, enten grundet udtørring eller fordi intensiv algevækst umuliggjorde filtrering fuldstændigt. I nogle tilfælde kunne der vælges et alternativ til udtørrede søer, mens det ikke var tilfældet for vandløb, idet de udtørrede vandløb primært var beliggende på Møn og Bornholm, hvor samtlige vandløb blev undersøgt.

Analyse af de indsamlede vandprøver resulterede i sikker detektion af flodkrebs på 57 stationer beliggende i 35 vandsystemer, heraf 2 beliggende i søer, begge på Møn. Signalkrebs blev fundet på 106 stationer beliggende i 49 vandsystemer, heraf 3 beliggende i søer på Als. Galizisk sumpkrebs blev kun fundet på 6 stationer i 5 vandsystemer, 4 beliggende på Sjælland og én på Lolland. Krebsepest blev konstateret på 54 stationer beliggende i 21 vandsystemer. Der blev

ikke konstateret forekomst af hverken marmorkrebs eller Louisiana flodkrebs i de 192 prøver, der blev analyseret for disse to arter.

Generelt har det været muligt at påvise forekomst af krebs på lokaliteter, hvor der i forvejen var kendt forekomst af en af de tre fundne arter. Det kan derfor konkluderes, at eDNA er en velegnet metode til kortlægning af udbredelse af krebs og krebsepest i ferske vande. Kortlægningen har vist, at signalkrebs findes udbredt over hele landet og i dag må betegnes som den mest udbredte art af ferskvandskrebs i Danmark. Flodkrebs findes også i alle landsdele, men en del bestande er under pres fra signalkrebs og/eller krebsepest. For den galiziske sumpkrebs vedkommende, er udbredelsen primært afgrænset til Sjælland. Krebsepest findes udbredt over hele landet, primært i forbindelse med forekomst af signalkrebs.

English summary

This report describes the results of a nationwide mapping of the distribution of freshwater crayfish and crayfish plague in the fresh waters of Denmark. The project was carried out from May 1st 2020 to December 1st 2021.

The general monitoring method used was collecting and filtering water samples at site. The filtrate was subsequently used for analysis of presence of DNA – so-called eDNA – from crayfish and crayfish plague.

Water samples were collected in streams and interconnected lakes throughout Denmark including the following larger islands that contains significant streams: Mors, Als, Ærø, Langeland, Lolland, Falster, Møn og Bornholm. By analysing these samples the distribution of crayfish and crayfish plague on a nationwide scale was described. In addition, more detailed sampling was conducted on five selected islands: Samsø, Als, Ærø, Langeland og Møn, partly to described crayfish distribution in the many ponds in Denmark and partly to analyse whether one or more of these islands might act as safe-site or sanctuary for the indigenous noble crayfish (*Astacus astacus*).

Among the ca. 900 catchments in Denmark, it was decided to sample all streams with a main course above 10 km length. For those 20 km or longer one sample was taken for each additional 10 km. In streams with a main stem length between 5 and 10 km, 50 % were sampled and streams with length between 2 and 5 km 20 % were sampled. Streams shorter than 2 km were not sampled.

The collected samples were analysed as follows: all samples were tested for the presence of noble crayfish, signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) and narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*). In addition, all samples that were tested positive for one or more of these species were tested for the presence of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*). This procedure was implemented as crayfish plague cannot live without a crayfish host. Finally a selection of samples were analysed for the presence of the marbled crayfish (*Procambarus virginialis*) and the red swamp crayfish or Louisiana crawfish (*Procambarus clarkii*).

In total, 838 sampling sites were visited, 635 situated in streams and 203 in lakes. This resulted in the collection of 768 samples, where between 0.5 and 5 l of water was filtered. In some sites the water contained so many particles that the filter clogged before the target of 5 l had been reached. In 70 sites it was not possible to sample at all, either due to excessive algal growth or completely dried up streams or lakes. Alternative sampling lakes could in some cases be chosen, this was not possible for streams, as most dried up streams were situated on either Møn or Bornholm where all streams were part of the sampling program.

Analysis of the samples resulted in positive detection of noble crayfish in 57 sites, situated in 35 catchments, of these two were lakes, both located on Møn. Signal crayfish was detected in 106 sites situated in 49 catchments, of these three were found in lakes on Als. Narrow-clawed cray-

fish was only detected in six sites in five catchments, four on Zeeland and one on Lolland. Crayfish plague was detected in 54 sites in 21 catchments. Marbled crayfish and red swamp crayfish were not detected in the 192 samples analysed for these species.

In general, it was possible to detect crayfish by eDNA analysis in localities where presence of one of the three species of crayfish was known prior to this monitoring. Thus, it is concluded that eDNA monitoring is a suitable method for monitoring crayfish and crayfish plague distribution in freshwater. The monitoring has revealed that the invasive signal crayfish is present in all parts of Denmark and must today be considered the most common crayfish in the country. Noble crayfish is also found in most parts of Denmark. However, several populations are threatened by either signal crayfish or crayfish plague. The presence of narrow-clawed crayfish is generally limited to Zeeland. Crayfish plague is also found throughout the country, most often associated with the presence of signal crayfish.

1. Indledning

I Danmark findes der mindst tre arter af ferskvandskrebs; den hjemmehørende flodkrebs (*Astacus astacus*) og de to indslæbte arter galizisk sumpkrebs (*Astacus leptodactylus*) og signalkrebs (*Pacifastacus leniusculus*) (Larsen, 1990; Kouba et al., 2014; Statens Naturhistoriske Museum & Astacon, 2017, Berg, 2021). Foruden de tre ovennævnte, er der i 2019 gjort fund af et enkelt eksemplar af marmorkrebs (*Procambarus virginalis*), men det er usikkert hvorfra eksemplaret, der blev indleveret til AQUA Akvarium og Dyrepark i Silkeborg i februar 2019, stammede. Endelig er der nogle få ubekræftede rygter om forekomst af andre arter, eksempelvis kamberkrebs (*Orconectes limosus*) i en sø på Midtjylland (www.fiskepleje.dk).

Flodkrebsen var tidligere, ifølge både mundtlige og skriftlige overleveringer, almindeligt udbredt i det meste af landet, men ud over beretninger om fiskeri og fangster, findes der meget lidt konkret viden om den naturlige udbredelse (Larsen, 1990). Det er mere sikkert, at flodkrebs i begyndelsen af 1900-tallet gik stærkt tilbage og mange bestande forsvandt (Larsen, 1990). En væsentlig årsag til tilbagegangen tidligere, var ganske givet forringet miljøtilstand i vandløb og søer. Hertil skal sandsynligvis lægges et eller flere udbrud af den parasitiske sygdom krebsepest (*Aphanomyces astaci*), som er dødelig for flodkrebs, men disse udbrud er dårligt dokumenterede (Larsen, 1990). I dag vurderes stigende udbredelse af invasive arter af krebs, primært signalkrebs, som den største trussel mod flodkrebsen i Danmark. Det skyldes dels at signalkrebs kan være rask smittebærer af krebsepest (Aldermann og Polglase, 1988) og dels, at når flodkrebs og signalkrebs lever sammen, bliver flodkrebsen over tid udkonkurreret og forsvinder (Lowery og Holdich, 1988; Söderbäck, 1995; Westman et al., 2002; Olsson et al., 2009). Flodkrebsen i Danmark blev i 1997 vurderet som sårbar (Berg & Styrihave, 1998), men arten er ikke rødlistevurderet.

Invasive krebs, herunder signalkrebs, findes vidt udbredt i Europa (Gheradi et al. 2011; Kouba et al. 2014; Chucholl 2016). Det er primært de arter, der er indslæbt til Europa fra Nordamerika med økonomiske formål for øje gennem fiskeri og opdræt, der er problematiske (Jussila et al. 2021). Foruden den trussel de invasive arter udgør overfor hjemmehørende arter af ferskvandskrebs, kan de invasive arter påvirke de modtagende økosystemer på andre måder, herunder påvirke både flora og fauna negativt og således bredt gøre skade på mange elementer i økosystemerne (se fx Chucholl, 2016; Berg et al., 2020). De forhold er årsag til at EU-listen over problematiske invasive dyr og planter i unionen (3. udgave fra 2019) indeholder ikke mindre end 6 krebsdyr, der lever i ferskvand (heraf 5 ferskvandskrebs) ud af i alt 66 arter (Miljøstyrelsen 2021).

Der er aldrig tidligere udført målrettet monitorering af udbredelsen af krebs i ferskvand i Danmark. Arternes udbredelse er hidtil kun kendt fra mere eller mindre tilfældige fund, eksempelvis gjort i forbindelse med anden monitorering, herunder DTU Aquas elektrofiskeri i forbindelse med revision af Planer for Fiskepleje i vandløb og NOVANA overvågningsprogrammet, eller som fangst i fiskeredskaber, tilfældige observationer mm. Der er gjort enkelte forsøg på at sammenstille den type observationer. I 2017 foranledigede Miljøstyrelsen en sådan gennemført (Statens Naturhistoriske Museum & Astacon, 2017). Ligeledes har DTU Aqua fra 2009 og frem indsamlet information om observationer af signalkrebs i Danmark (Berg, 2021). Den form for usystematisk mo-

nitering, er langt fra optimal og de kort over udbredelse, der er udarbejdet, må forventes at indeholde betydelige mangler. Der var derfor et tydeligt behov for at få gennemført en systematisk monitoring af udbredelsen af krebs i Danmark, som grundlag for den fremtidige forvaltning, dels i forhold til beskyttelse af flodkrebs og dels som grundlag for håndtering af de fremmede og invasive arter.

Monitoring af krebs kan foregå på flere måder. En ofte anvendt metode er fiskeri med ruse-redskaber udviklet specielt til fangst af krebs (Skov et al. 2009, Bergqvist et al. 2016; Berg et al. 2020). Disse særlige ruser eller tejner findes vidt udbredt i handlen og fiskeriteknikken er velbeskrevet. Metoden er imidlertid meget arbejdsstung, idet hver station skal besøges mindst to gange, en gang for at sætte redskabet og en gang for at røgte det, med mindst en nats mellemrum. Erfaringen er også, at en nats fiskeri med en krebsruse ikke nødvendigvis resulterer i fangst, dermed kan sikker påvisning af krebs på en lokalitet kræve fiskeri med flere ruser eller over flere dage.

En ny metode til monitoring af udbredelse af planter og dyr er detektering af såkaldt miljø-DNA (herefter betegnet eDNA). Næsten alle levende organismer afgiver DNA til omgivelserne. Dette DNA kommer typisk fra døde hud- eller tarmceller. De afstødte cellers DNA har en vis levetid inden det nedbrydes af bakterier, lys eller lignende. Indsamles der fx en vandprøve fra en sø eller å, vil det derfor indeholde DNA fra de dyr og planter, der har opholdt sig i vandet for nylig. Filtrerer man en sådan vandprøve og analyserer den for indholdet af artsspecifik DNA, kan man dermed påvise om en given art har være til stede i det vand, der indsamles på prøvetagningslokaliteten.

Denne rapport beskriver den første landsdækkende og systematiske monitoring af udbredelsen af krebs i Danmark nogensinde. Den vil således øge kendskabet til udbredelsen af de enkelte arter markant og dermed være et værdifuldt redskab for den fremtidige forvaltning. Endvidere indeholder rapporten en opdateret oversigt over metoder til bekæmpelse af invasive ferskvandskrebs (vedlagt som Bilag 8).

2. Metoder og materialer

2.1 Projektets start

Projektet blev igangsat den 1. maj 2020 med underskrift af kontrakt mellem Miljøstyrelsen (MST) og DTU Aqua. Grundet Covid-19 situationen blev opstarten på nogle punkter anderledes end planlagt, bl.a. blev indkøb og leverance af det nødvendige feltudstyr forsinket. Det var derfor, og på grund af gældende restriktioner, ikke muligt at samle feltpersonalet til den nødvendige oplæring før midt i juni 2020. Den forsinkelse er siden indhentet og feltarbejdet blev gennemført som planlagt med beskedne afvigelser.

2.2 Planlægning af feltarbejde

Efter drøftelser med MST blev der valgt følgende overordnede strategi for monitoringen:

- 2020: monitorering i vandløb i hele landet.
- 2021: monitorering i søer på øer, hvor der i 2020 ikke var konstateret fremmede arter.

Monitoreringen i 2020 skulle således give et landsdækkende billede af udbredelsen af krebs og krebspest, mens undersøgelserne i 2021, på baggrund af resultaterne fra 2020, skulle udføres med henblik på, at udpege områder i Danmark, der er velegnede som såkaldte *safesites* for flodkrebs.

2.3 Udvælgelse af prøvetagningsstationer i vandløb 2020

Danmark har i alt ca. 900 selvstændige vandsystemer med eget udløb i et marint område. Ud af disse blev længden på hovedløbet opmålt i 772 vandløb i programmet ArcGIS. De resterende ca. 130 vandløb er alle ganske korte - typisk < 0,5 km. Hovedløbets længde er generelt en god indikator for et vandsystems samlede størrelse.

Blandt de 772 opmålte vandløb, blev der til feltsæsonen 2020 udvalgt 350 vandløb til prøvetagning efter følgende kriterier:

- Vandløb over 10 km længde: alle medtages i prøvetagningen
- Vandløb 5-10 km længde: hvert andet vandløb medtages
- Vandløb 2-5 km længde: hvert femte vandløb medtages
- Vandløb 0-2 km længde: ingen vandløb medtages
- Bornholm: undtaget fra ovenstående er Bornholm, hvor alle øens 42 vandløb (0,5 – 22,6 km lange) blev medtaget. Dette for at få så godt et grundlag som muligt til at vurdere muligheden for, at udpege Bornholm som safesite for flodkrebs.

I kategorierne 2-5 km og 5-10 km blev de vandløb, der skulle medtages udtrukket tilfældigt blandt alle vandløb i kategorien inden for de tre følgende landsdele: Sjælland m. øer, Fyn m. øer, Jylland. Da der ved den tilfældige udvælgelse kun blev udvalgt ét vandløb på hver af øerne Møn, Langeland og Ærø, blev der manuelt udvalgt to vandløb mere på hver ø for, at sikre bedre dækning af disse øer.

Afhængig af vandløbets længde, blev der udvalgt en eller flere stationer efter følgende kriterier:

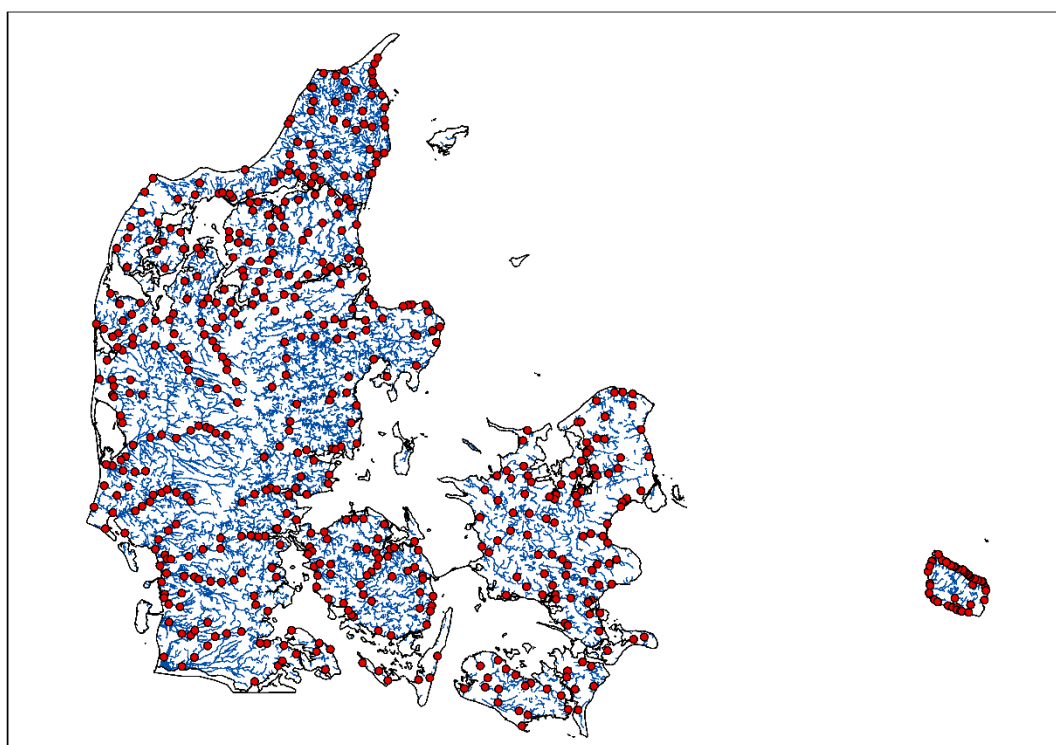
- Vandløb 2 – 19.9 km: 1 station
- Vandløb 20 – 120 km: 1 station for hver 10 km (fx 3 stationer i et 35 km langt vandløb). Maksimalt antal stationer i et vandløb var 12 i Gudenåen, der eksklusive søer har et hovedløb, der er ca. 120 km langt.

Således blev der i alt udvalgt 568 stationer i de 350 vandløb fordelt på alle landsdele som vist i Tabel 1. Antallet af stationer pr. landsdel er dermed bestemt dels af antallet af vandløb i den pågældende landsdel og dels af hvor langt det enkelte vandløb er. I Figur 1 ses stationernes fordeling over hele landet.

Tabel 1. Vandløb og antal stationer udvalgt til indsamling af eDNA prøver i feltsæsonen 2020 fordelt på fire landsdele.

LANDSDEL	ANTAL VANDLØB	ANTAL STATIONER
Bornholm	41	45
Sjælland med øer *	82	116
Fyn med øer **	35	57
Jylland (Inkl. Mors)	192	350
Sum	350	568

* Lolland, Falster og Møn. ** Langeland og Ærø.



Figur 1. Placering af 568 stationer til udtagning af eDNA prøver i 350 danske vandløb 2020.

Lokalt er det tilstræbt at placere stationerne ved vejbroer i det omfang det var muligt. Dette er valgt dels for at reducere tidsforbrug til transport fra nærmeste vej til vandløb mest muligt og dels for at forstyrre borgerne mindst muligt. Således vurderes det at over 95 % af stationerne er placeret på den måde.

Hver station blev geolokaliseret via websiden www.sdfekort.dk. Koordinaterne for hver station blev anvendt til navigation frem til stationen.

2.4 Genbesøg af Skjern Å 2021

Analyseresultaterne fra prøvetagningen i vandløb 2701 Skjern Å i 2020 viste ingen fund af DNA fra krebs. Idet det fra andre typer data (Berg, 2021) vides, at der er forekomst af flodkrebs og signalkrebs i forskellige dele af vandsystemet, var de resultater overraskende. Især manglen på fund af signalkrebs nedstrøms udløbet af sidegrenen Rind Å undrede, da det er kendt at der er en meget tæt bestand af signalkrebs på en lang strækning i denne gren af systemet. Derfor blev Skjern Å genbesøgt i 2021 og nye prøver udtaget, herunder direkte fra Rind Å, Karstoft Å, Omme Å, Vorgod Å og Ganer Å. Det gav i alt 13 positioner til prøvetagning.

2.5 Udvælgelse af prøvetagningsstationer på øer 2021

På et møde med Miljøstyrelsen den 9. juni 2021 blev det besluttet at feltarbejdet i sommeren 2021 skulle koncentreres om mere detaljeret at undersøge udbredelsen af krebs på fem øer: Als, Ærø, Langeland, Møn og Samsø efter følgende kriterier:

- alle vandløb med én prøve, dog undtagen dem, der blev undersøgt med succes (dvs. at der faktisk kunne udtages en vandprøve) i 2020. Vandløb, der var udtørrede i 2020, skulle genbesøges, det var primært gældende på Møn.
- alle større søer (> ca. 5 ha) med to prøver pr. sø.
- ca. 5 % af det estimerede antal småsøer (< 5 ha) på hver ø med én prøve pr. sø.

Tabel 2 giver en oversigt over fordelingen vandløb, søer og prøver på de fire øer. Figur 2 viser som eksempel placeringen af de undersøgte småsøer på Ærø.

Tabel 2. Oversigt over areal, antal vandløb og antal søer på fem øer samt antal prøver i hver habitatkategori.

Ø navn	Areal (km ²)	Vandløb			Søer > 5 ha		Søer < 5 ha		Sum prøver 2021
		Antal	Prøver 2020#	Prøver 2021 ^α	Antal	Prøver 2021	An-tal*	Prøver 2021**	
Als	321	26	4 (4)	22	8	16	1027	53	91
Ærø	88	9	3 (2)	7	1	2	457	23	32
Langeland	284	11	3 (3)	8	8	16	1022	53	77
Møn	218	15	3 (0)	15	3	6	741	37	58
Samsø	114	5	0	5	0	0	490	25	30
Sum prøver 2021				57		40		191	288

Stationer besøgt (prøver udtaget) i 2020. Afvigelse mellem de to tal på Ærø og Møn skyldes udtørrede vandløb.

^α Inkl. genbesøg i vandløb, der var udtørrede i 2020.

* estimat baseret på optælling af samtlige små søer, der er medtaget på 1:25.000 SDFE kort i 10 tilfældige 1 km² kvadrater på hver ø og forholdsmæssig skalering til øens areal.

** ca. 5 % af det estimerede antal små søer på hver ø.

2.6 Udvalgelse af små søer til prøvetagning

De små søer, der skulle undersøges, blev udvalgt ud fra følgende kriterier:

1. Søen skal have åben vandflade. Søer, der er helt dækket af vandplanter fravælges.
2. Søer beliggende nær offentlig vej prioriteres. Dette begrundet i både logistiske forhold (tidsforbrug) og fordi erfaringen viser, at søer med gode adgangsforhold oftere tilføres fisk (og krebs) ved udsætning end søer, der er vanskeligt tilgængelige (Copp et al. 2005).
3. Der udvælges både søer i det åbne land og i bymæssig bebyggelse.
4. Der må gerne være offentlig adgang til søen.
5. Prøvetagerne kan på stedet vælge en nærliggende "erstatnings-sø", hvis den på forhånd udpegede sø ved besøg viser sig at være uegnet til prøvetagning, fx jfr. punkt 1 ovenfor, grundet udtørring eller af lignende årsager.
6. Prøvetagerne kontakter den lokale lodsejer og spørger om lov til at tage prøven. Hvis de mødes af et nej, vælges en erstatnings-sø jfr. punkt 5.



Figur 2. Beliggenheden af de 23 små søer, der blev udvalgt til prøvetagning på Ærø i 2021.

Ligesom i 2020, blev søerne vurderet og udvalgt ud fra 4 cm kort og luftfotos på hjemmesiden www.sdfkort.dk og herefter geolokaliseret. Positionen blev brugt til navigation frem til søen. Vandløbsstationer på den fem øer blev udvalgt på samme måde som i 2020.

2.7 Karlstrup Kalkgrav

Miljøstyrelsen modtog i august 2021 en borgerhenvendelse om et muligt fund af en fremmed krebseart i Karlstrup Kalkgrav. Miljøstyrelsen anmodede efterfølgende DTU Aqua om at undersøge dette nærmere. Søen anvendes af Solrød Sportsfiskerklub Regnbuen til put and take efter regnbueørred. Foreningen bekræfter at der lever krebs i søen, som foreningens medlemmer fisker efter i mindre omfang. Der er ifølge det oplyste udelukkende tale om flodkrebs.

2.8 Samlet prøvetagning

Samlet blev der besøgt 838 stationer og udtaget/filtreret 767 vandprøver i løbet af projektet. Figur 3 viser samtlige stationer, der er besøgt i løbet af projektet, inklusive de stationer, hvor det ikke var muligt at udtage en prøve.



Figur 3. Beliggenheden af samtlige stationer, der blev besøgt i løbet af projektet. I lange vandløb ses Den høje tæthed af stationer på øerne Samsø, Als, Ærø, Langeland og Møn skyldes udtagning af prøver fra søer.

2.9 Indsamling af eDNA i felten

Begge sæsoner startede med et planlægnings- og testmøde i Silkeborg med prøvetagerne, hvor de blev orienteret om udstyret og indsamlingsstrategi. Der var særlig fokus på rengøring af udstyret for at sikre imod DNA-kontaminering imellem prøvetagningslokaliteter, samt desinfektion med Virkon® S for at undgå spredning af krebsepest og andre vandbårne sygdomme som eksempelvis fiskesygdommen IHN. Det viste sig særdeles relevant i 2021, hvor der skete et udbrud af IHN i Damnark.

Selve feltudstyrspakken bestod af et stort antal genstande. Ved indkøb af udstyr sørgede vi for at processerne var så nemme at udføre som muligt for feltpersonalet og vi forsøgte at forudsige eventuelle problemstillinger, der kunne opstå i felten. Vi købte ind således at feltpersonalet havde reserver af alt udstyr i det tilfælde, at ting skulle blive væk eller gå i stykker. Der blev undervejs igennem feltsæsonen suppleret med handsker mm. og genopfyldning af kemikalier til rensning af udstyr.

Indsamlingen af prøver og anvendt udstyr, fulgte overordnet metoden anvendt i Strand et al. (2019) og Fossøy et al. (2018) og er specificeret i Bilag 1 og 2. Det centrale i feltarbejdet var at

indsamle og filtrere vandprøver på stedet. Dette blev foretaget ved anvendelse af en såkaldt Vampire sampler, en håndholdt peristaltisk pumpe, som muliggjorde hurtig filtrering i felten, uden direkte kontakt mellem pumpe og vandprøve. Under projektet benyttede vi 2 µm glasfiber filtre (Millipore, 47 mm, Kat. nr. AP2504700), for at sikre et så stort prøvetagningsvolumen som muligt. Undersøgelser foretaget af Fossøy et al. (2018) viser at denne metode øger den samlede mængde af indfanget eDNA ift. f.eks. 0.22 µm filtre, som er anvendt i andre studier af krebs (f.eks. Agersnap et al. 2017), da de finere filtre ofte hurtigt tilstoppes i vandsystemer med mange partikler. Herved øgedes sandsynligheden for at indfange DNA fra sjældne arter i den enkelte prøve. For 2020 blev vandprøverne normalt indsamlet ved vejbroer, mens prøverne for 2021 hovedsageligt blev indsamlet fra land. Efter filtrering blev filtrene opbevaret i 5 mL eppendorfrør med conserveringsbuffer (ATL buffer, Qiagen, Hilden, Germany) og opbevaret i en termokasse indtil DNA-oprensning i Silkeborg.

2.10 Laboratorieanalyser

- *Validering af detektionssystemer*

I alt blev der brugt syv forskellige detektionssystemer (Bilag 5). På trods af at alle detektionssystemerne brugt under dette projekt allerede er designet til at være artsspecifikke (NIVA rapport nr. 7447-2019, Agersnap et al. 2017; Vrålstad et al. 2009) foretog vi en yderligere validering i starten af projektet. Valideringen bestod af at teste alle detektionssystemer mod oprenset DNA fra forskellige arter af krebs. De inkluderede arter var de samme som dem vi analyserede for under selve projektet: flodkrebs, signalkrebs, Louisiana flodkrebs, galizisk sumpkrebs og marmorkrebs. Til at krydsvalidere detektionssystemet for krebsepest blev det yderligere testet op imod syntetiseret DNA baseret på *Aphanomyces laevis* (Genbank, reference nummer AY283648.1), som er den eneste søsterart til *A. astaci* kendt fra Danmark. Det syntetiske DNA blev bestilt fra IDT (Integrated DNA Technologies, USA). Analyserne viste at alle detektionssystemerne virkede efter hensigten, dvs. at de kun viste udslag ved den art, som de er designet til. Falsk positive resultater pga. såkaldt krydsamplifikation (hvor et detektionssystem virker på flere arter) kan derfor antages at være usandsynlig.

- *Optimering af assay sensitivitet og evaluering af kvantitative egenskaber*

De forskellige detektionssystemers kvantitative egenskaber blev analyseret vha. fortyndingsserier med kendt koncentration af DNA ($1-1 \times 10^5$ kopier per prøve). Sådanne fortyndingsserier muliggør validering af detektionssystemernes reproducerbarhed i forhold til at kvantificere antallet af arts-specifikke DNA-molekyler i prøven. Generelt udregnes korrelationskoefficienten (R^2) og effektiviteten (et tal for fordoblingstiden af DNA) og holdes op mod en standard for hvad der normalt forventes. Vi brugte retningslinjerne fra Bustin et al. (2009) som foreslår at et godt detektionssystem bør have $R^2 > 0.99$ og en effektivitet mellem 90%-110%. De fleste af de indkøbte detektionssystemer stemte overens med disse retningslinjer på nær systemerne for galizisk sumpkrebs ("Ponlep_CO1") og signalkrebs ("Paclen_CO1", signalkrebs detektionssystem #1, Bilag 5), der derfor blev forsøgt optimeret. Dette blev gjort ved at teste forskellige koncentrationer af primere og probe i reaktioner med samme DNA koncentration. I alt testede vi primer-koncentrationer på hhv. på 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 nM og probe-koncentrationer på 200, 400, 600 samt 800 nM. Den kombination, der viste den laveste ct-værdi ("cycle threshold", tidspunkt for hvornår DNA er opformeret signifikant ift. baggrunden), blev brugt under det efterfølgende analysearbejde. De brugte koncentrationer af primere og prober kan findes i Bilag 5.

Efter optimering stemte detektionssystemet for galizisk sumpkrebs (Ponlep_CO1) overens med de brugte retningslinjer. Detektionssystemet for signalkrebs udviste dog lavere effektivitet og blev derfor udeladt under det første analysearbejde. I stedet blev analyserne af signalkrebs baseret på detektionssystemet "paclen_CO1" (signalkrebs detektionssystem #2, Bilag 5) udviklet af Agersnap et al. (2017).

2.11 Laboriearbejde

Al DNA-oprensning og analyseopsætning blev udført i et særskilt DNA-frit laboratorie for at minimere risikoen for DNA kontamination. Dette blev gjort for at sikre mindst mulig risiko for kontamination med udefrakommende DNA, hvilket ellers kunne lede til falsk-positive resultater. Det benyttede laboratorie er lokaliseret i en særskilt bygning væk fra andre laboratorier og bliver yderligere belyst med UV-lys hver nat for at destruere evt. DNA. Yderligere skal laboranter arbejde ift. specifikke arbejdsgange og have særlige værnemidler på for at reducere risikoen for DNA-kontaminering.



Figur 4. Laboriearbejde og opsætning af eDNA analyser for påvisning af flodkrebs.

2.12 DNA-oprensning

På anbefaling af vores norske rådgivere anvendte vi en ny protokol til at oprense DNA fra de indsamlede prøver. Dette krævede tilpasning af vores laboratorier og vores arbejdsgange, men fungerede godt (Figur 4). Til oprensningerne brugte vi rør og kolonner fra NucleoSpin Plant II Midi kittet (REF 740771.20), men brugte reagenser fra Qiagens DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), bortset fra proteinase K som blev indkøbt fra VWR (cat.# E195-5ML). For hver oprensning blev der altid oprenset en oprensningsskontrol (en oprensning uden prøve). Disse blev, ligesom prøverne, analyseret med de brugte detektionssystemer og tillader detektion af evt. DNA-kontaminering under laboriearbejdet. DNA-koncentrationen blev målt i alle oprensede prøver på en såkaldt Qubit via deres høj-sensitive kit (Qubit dsDNA high sensitivity kit, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Vores ekstraktions protokol er vedlagt som Bilag 4.

2.13 Analysearbejde

Alt analysearbejde blev udført via såkaldt kvantitativ PCR (forkortet qPCR) ved brug af de beskrevne artsspecifikke detektionssystemer. Under disse analyser opformeres kun artsspecifikt DNA. Dette gøres ved hjælp af to korte syntetisk fremstillede DNA stykker (primere) og et DNA stykke mærket med et fluorescensmolekyle (probe). Primerne og proben er designet således, at de kun kan genkende og opformere DNA fra netop den art, der ønskes undersøgt for. Analysen sker ved at blande DNA fra prøven med bl.a. primerne, probe og et enzym (polymerase), som katalyserer en reaktionen, der kopierer DNA. Ved at regulere temperaturen op og ned et antal gange vil DNA-stykket beliggende mellem de to specifikke primere blive fordoblet efter hver temperaturcyklus. Hver gang der sker en opformering af DNA, frigives der fluorescens fra proben som efterfølgende måles på en særlig PCR-maskine til analyse af kvantitativ PCR. Når DNA fra en af de pågældende arter findes i en prøve, vil et positiv signal vise sig ved en eksponentiel stigning i fluorescens efterfulgt af et plateau. Antallet af DNA molekyler tilstede i prøven vil afgøre hvor mange temperaturcykler prøven skal igennem før DNAet i prøven er opformet nok til at det kan blive detekteret. Mængden af DNA-molekyler i en prøve, kan endvidere estimeres ved sammenligning med en såkaldt fortyndingsrække med kendt DNA koncentration.

2.14 Analyseopsætning

Alle prøver blev analyseret i triplikater (tre reaktioner analyseret for hver prøve) i 20 µL reaktioner indeholdende 8 µL TaqMan Environmental Mastermix 2.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), individuelle optimerede koncentrationer af primere og prober (Bilag 5), nukleosefrit vand og 1 µL prøveekstrakt.

Alle prøver blev analyseret på den samme qPCR maskine (StepOnePlus Real-time PCR instrument, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Temperaturprogrammet var ens for alle detektionssystemer og inkluderede 5 min ved 50°C, 10 min ved 95°C og derefter 50 cykler af hhv. 30 sek. ved 95°C og 1 min ved 60°C. Analyserne inkluderende foruden DNA fra de indsamlede prøver yderligere 3 negative kontroller og en fortyndingsrække med $1 \cdot 10^5$ kopier af syntetisk fremstillet DNA (gblocks, Integrated DNA Technologies) til assay validering, samt positiv kontrol.

Flodkrebs blev altid analyseret først. Disse analyser inkluderede yderligere en såkaldt IPC kontrol ("internal positiv kontrol") (TaqMan™ Exogenous Internal Positive Control, ThermoFisher Scientific, Kat nr. 4308321). Dette er et primer- og probe-system til validering af mulig inhibering af PCR-reaktionen. Inhibering af en PCR-analyse stammer fra forskellige kemiske forbindelser i vandprøven, som nogle gange findes i den endelige prøve efter eDNA isolering. For at undersøge tilstedeværelsen af mulige PCR-inhibitorer blev ct-værdien for IPC'en for de indsamlede prøver sammenlignet med reaktioner uden prøveekstrakt. På denne måde kan man validere om inhiberende stoffer er tilstede i prøven. De første analyser blev foretaget med 5 µL prøveekstrakt. Her så vi hyppig inhibering hvorfor vi ændrede volumen af det tilsatte prøveekstrakt til 1 µL. Prøver der stadigvæk udviste inhibering blev yderligere fortyndet 1:10 og genanalyseret. Efter analyse af flodkrebs og IPC blev der analyseret for de resterende arter ved brug af de andre systemer.

2.15 Detektions validering

Som udgangspunktet blev alle positive reaktioner behandlet som påvisning for tilstedeværelsen af DNA fra den givne art i prøven. Undtagelser blev gjort ved ct-værdier ≥ 41 (cycle threshold),

tidspunkt for hvornår DNA er opformeret signifikant (if. baggrunden). Denne grænseværdi er brugt i andre krebsestudier for at reducere risikoen for potentielle falsk-positive (f.eks. Agersnap et al. 2017). I tilfælde af at evt. inhibering påvirkede resultaterne blev alle indsamlede prøver med ct-værdier over denne grænseværdi fortyndet 1:10 og genanalyseret. Positive prøver blev behandlet som værende rigtige positive og kategoriseret som "påvist", mens de resterende prøver blev kategoriseret som ikke-konklusive, hvor yderligere prøvetagning eller direkte observationer er nødvendige for at validere resultatet. Årsagen til så høje ct-værdier er svær at vurdere, men er mulig ved lave DNA koncentrationer, opformering af andet DNA, samt pga. mulige stoffer i de indsamlede prøver der kan inhiberer reaktionen.

Signalkrebs blev behandlet på samme måde for alle prøverne indsamlet i 2021. Her havde 7 ud af 9 positive prøver en ct-værdi ≥ 41 , og blev derfor fortyndet og genanalyseret. Resultatet af disse analyser viste ct-værdien faldt efter fortynding i 5 ud af de 7 prøver. Dette resultat skyldes sandsynligvis inhibering og indikerer en mulig overfølsomhed for det brugte detektionssystem (signalkrebs detektionssystem #2, Bilag 5) overfor eventuelle hæmmende stoffer i DNA-prøven sammenlignet med de andre detektionssystemer. Resultatet var ikke forventet, da der allerede var testet for inhibering via en såkaldt IPC. Det var dog yderligere understøttet af observationen af mange meget høje ct-værdier for signalkrebs fra prøver indsamlet i 2020. For at undersøge mulige løsninger foretog vi derfor yderligere analyse med det andet detektionssystem til detektering af signalkrebs 'paclen_CO1' (signalkrebs detektionssystem #1, Bilag 5) udviklet af NIVA (NIVA rapport nr. 7447-2019). Analyse med dette system bekræftede generelt tilstedeværelsen af signalkrebs i tidligere positive prøver analyseret fra 2020, men viste ikke samme potentielle overfølsomhed som for detektionssystem #2, hvilket blev støttet af observationen af generelt lavere ct-værdier og højere kopiestimater for de samme ufortyndede prøver. For at sikre os imod falsk-negative resultater pga. mulig inhibering af detektionssystem #2, genanalyserede vi alle negative prøver for signalkrebs med detektionssystem #1 (se resultat afsnit). Alle prøver med efterfølgende positive påvisning af DNA fra signalkrebs blev yderligere fortyndet 1:10 og genanalyseret med det oprindelige detektionssystem #2. På denne måde kunne alle prøver krydsvalideres, og analyseres for mulig inhibering og kopiantal. Alle prøver med påvist positiv detektion af signalkrebs for begge detektionssystemer, eller en ct-værdi < 41 for detektionssystem #2, blev betegnet som sikker og kategoriseret som konstateret.

3. Resultater

3.1 Feltarbejdets forløb

- *Oplæring af feltpersonale*

Vores feltteam, der bestod af tre personer, blev samlet i Silkeborg den 17. juni 2020 til oplæring i prøvetagning umiddelbart efter at prøvetagningsudstyret var blevet leveret til DTU Aqua. Oplæringen havde foruden selve prøvetagningen særligt fokus på dels at undgå kontaminering mellem prøver og dels at desinficere feltudstyr og beklædning med henblik på at undgå spredning af vandbårne sygdomme, eksempelvis krebsepest.

Der var forud for oplæringsdagen blevet udarbejdet en detaljeret manual til prøvetagningen. Manualen blev efterfølgende finjusteret på baggrund af feltpersonalets tilbagemeldinger fra felten. Trods justeringerne er standardiseringen bibeholdt på tværs af prøveindsamlingen. Manualerne for 2020 og 2021 er vedlagt denne rapport som Bilag 1 og 2.

- *Forløb af den praktisk prøvetagning*

Den praktiske prøvetagning er generelt forløbet som planlagt. Det tekniske udstyr har fungeret efter hensigten og feltpersonalet meldte om en god arbejdsrytme, på trods af de mange trin, der er nødvendige for at undgå kontaminering og fjerne risikoen for smittespredning.

I de (forholdsvis få) tilfælde, hvor personalet har truffet på borgere under prøvetagningen, er de kun blevet mødt med positiv interesse for projektet.

På et antal stationer var det ikke muligt at gennemføre prøvetagning. Den primære årsag har i vandløb været udtørring. Dette var især et problem på Bornholm og Møn, hvor der kun blev taget prøver i henholdsvis 33 ud af 45 stationer (2020) og 6 ud af 15 stationer (2021). Sekundært var der på enkelte stationer så dårlig vandkvalitet grundet intens algevækst, at filtrering af vandet ikke var muligt. Det var primært tilfældet på Lolland og Falster. Tabel 3 viser en oversigt over antal stationer besøgt og om der er udtaget prøve.

Tabel 3. Antal stationer og indsamlede eDNA prøver i feltsæsonen 2020 fordelt på 4 landsdele. *: Lolland, Falster og Møn. **: Langeland og Ærø. *: Prøver ikke udtaget grundet udtørring eller intens algevækst.**

LANDSDEL	ANTAL STATIONER 2020			
	Planlagt	Besøgt	Prøve udtaget	Prøve ej Udtaget***
Bornholm	45	45	33	12
Sjælland med øer *	116	116	100	16
Fyn med øer **	57	57	57	0
Jylland	350	349	345	4
Sum	568	567	535	32

Tabel 4. Oversigt over antallet af planlagte og gennemførte prøvetagninger i 2021, dels på fem øer samt i enkelte andre vandsystemer.

Ø-navn	Vandløb		Søer > 5 ha *		Søer < 5 ha		Sum gennemført
	Planlagt	Gennemført	Planlagt	Gennemført	Planlagt	Gennemført	
Als	22	18	16	16	53	39	73
Ærø	7	6	2	2	23	20	28
Langeland	8	6	16	12	53	30	48
Møn	15	6	6	6	37	26	38
Samsø	5	4	0	0	25	23	27
Skjern Å og Dommerby Å	14	14	-	-	-	-	14
Karlstrup Kalkgrav	-	-	3	3	-	-	4
Sum prøver 2021	71	54	43	43	191	138	235

I en række af de på forhånd udvalgte søer var det ligeledes ikke muligt at udtage prøver, enten grundet udtørring eller intensiv alge- /plantevækst. Det var ikke i alle tilfælde muligt at finde alternative erstatnings-søer. Det endelige antal prøvetagninger i 2021 er vist i Tabel 4.

Det gennemsnitlige filtrerede vandvolumen var større i 2020 end i 2021, med 4,34 liter (N=535) mod 3,28 liter (N=232).

- *Registrering af stationer*

På hver station er der taget en præcis position med en håndholdt GPS navigator for den faktisk prøvetagning, der i nogle tilfælde afviger lidt fra den planlagte, baseret på de fysiske forhold på stationen. Der er endvidere taget et billede af stationen med et indbygget kamera i navigatoren. Dette billede bliver automatisk geolokaliseret, se eksempel i Figur 5. Der er desuden udfyldt et feltskema med oplysninger om vandløb, dato, position mm. Feltskema vedlagt som Bilag 3.

- *Sikring mod forveksling af prøver mellem stationer*

For at sikre mod forbytning af prøver mellem stationer, blev der indført to kontrolmekanismer. Dels skrives positionen på en pose, hvori prøven lægges og dels skrives et fortrykt unikt ID nummer på pose og glas til prøvefilter på feltskemaet (Bilag 3). Hermed er der dobbelt sikkerhed for at prøverne efter laboratorieanalyse ikke registreres på en forkert position.



Figur 5. Foto af prøvestation i vandløbet 0942 Hattebæk, der udmunder i Helnæs Bugt nord for Falsled på Fyn.

- *Karlstrup Kalkgrav*

For at be- eller afkræfte det i afsnit 2 nævnte borger-fund i kalkgraven, bliver der udtaget tre eDNA prøver i oktober 2021 (Tabel 4). Da søen på prøvetagningstidspunktet var underlagt offentlig tilsyn grundet mistanke om smitte med IHN virus, krævede det en dispensation fra Fødevarestyrelsen før prøvetagning kunne foretages. Den gav styrelsen den 27. september 2021

med det vilkår, at der efter prøvetagning blev fortaget ekstra grundig desinfektion af prøvetagningsudstyr, hvilket blev udført, bl.a. ved desinfektion med Virkon S, samt efterfølgende længe-revarende udtørring af udstyret.

- *Resultater af genanalyser og efterfølgende genscreening af flodkrebs*

I alt udviste 15 af de 69 stationer med detektion for flodkrebs ct-værdier ≥ 41 . Efter genanalyse af disse prøver fortyndet 1:10, kunne tilstedeværelsen af eDNA fra flodkrebs påvises i 3 af prøverne, mens de resterende 12 prøver var negative. De negative resultater skyldes sandsynligvis at disse prøver indeholder meget lave DNA-koncentrationer fra flodkrebs, hvorfor signalet forsvinder efter fortynding. Det er dog også en lille mulighed for at resultaterne skyldes falsk-positive (f.eks. via opformering af andet DNA), hvorfor de blev kategoriseret som ikke konklussive. For analysen af galizisk sumpkrebs blev kun én af syv positive prøver kategoriseret som ikke konklussiv, da den havde en ct-værdi ≥ 41 og ligeledes var negativ efter genanalysering af den fortyndede prøve.

I alt havde 42 af de 69 prøver fra 2020 med positive detektering af signalkrebs en ct-værdi ≥ 41 . Genanalyse med det andet detektionssystem for signalkrebs (paclen_CO1, signalkrebs detektionssystem #1) påviste DNA fra signalkrebs i de fleste af disse prøver (35 ud af 42). Dette bekræftede tilstedeværelsen at DNA fra signalkrebs i disse prøver, som derfor blev kategoriseret som "påvist".

Resultaterne af gen-analyserne for signalkrebs fandt yderligere 48 lokaliteter med positiv detektion. Efter genanalyse af fortyndinger af disse prøver, kunne 35 kategoriseres som "påvist", da signalkrebs blev påvist med begge systemer. Ud af disse 35 prøver var 24 fra vandsystemer, hvorfra der på andre stationer allerede var påvist eDNA fra signalkrebs, mens 11 var nye vandsystemer. Af de 13 ikke-konklussive prøver var fem fundet inden for vandsystemer hvor signalkrebs var påvist (Tabel 5). Dette støtter at mange af prøverne i denne kategori sandsynligvis er rigtige positive. Et lignende resultatet blev fundet for flodkrebs, hvor syv ud af 12 stationer kategoriseret som ikke-konklussive blev fundet inden for systemer med påvist tilstedeværelsen af DNA fra flodkrebs (Bilag 6 og 7) på andre stationer.

Tabel 5. Antallet af nye lokaliteter med påvist forekomst af signalkrebs efter genscreening af lokaliteterne. Tal i parentes udgør andelen af ikke-konklussive stationer.

Kategori	Antal stationer	Positiv procent [*]
Vandsystemer med tidligere bekræftet forekomst	24 (5)	3,12 (0,65)
Vandsystemer uden tidligere bekræftet forekomst	11 (8)	1,43 (1,04)

* Ud af de 770 stationer, der ikke tidligere blev påvist positive for eDNA fra signalkrebs

3.2 Analyseresultater

I alt blev der observeret 126 positive prøver for signalkrebs, 69 for flodkrebs, 7 for galizisk sumpkrebs og 57 for krebsepest. De fleste af disse var kategoriseret som "påvist" for alle arter – hhv. 106, 57, 6 og 54. Marmorkrebs og Louisiana flodkrebs blev ikke detekteret i nogen af de analyserede prøver (Bilag 10). Antallet og positiv procenten var mærkbart højere for feltsæsonen i 2020 sammenlignet med 2021. For flodkrebs observerede vi 66 positive prøver for flodkrebs i 2020 mod kun 3 i 2021. Det samme billede tegnede sig for signalkrebs med hhv. 114

mod 12 positive prøver for 2020 og 2021 (Tabel 6). Krebsepest blev fundet i flere systemer med de fleste med en påvist forekomst af signalkrebs. Alle analyser af oprensings og negative kontroller var negative. En detaljeret oversigt over resultaterne af de genetiske analyserne kan se i Bilag 9.

Tabel 6. Udførte analyser fordelt på arter for indsamlede eDNA prøver fra felt sæsonen 2020 og 2021. Antal og procentsats er vist for både stationer kategoriseret som "påvist" og "ikke-konklusive" (i parentes).

Art	Antal prøver 2020			Antal prøver 2021 #		
	Analyserede prøver	Positive		Analyserede prøver	Positive	
		Antal	%		Antal	%
Flodkrebs	535	55 (11)	10,28 (2,06)	215	2 (1)	0,93 (0,05)
Signalkrebs	535	96 (18)	17,94 (3,34)	215	10 (2)	4,65 (0,93)
Galizisk sumpkrebs	535	6 (1)	1,12 (0,02)	215	0	
Marmor krebs	192	0	0	0	0	0
Louisiana flodkrebs	192	0	0	0	0	0
Krebsepest	170	48 (3)	30,00	15	6	40,00

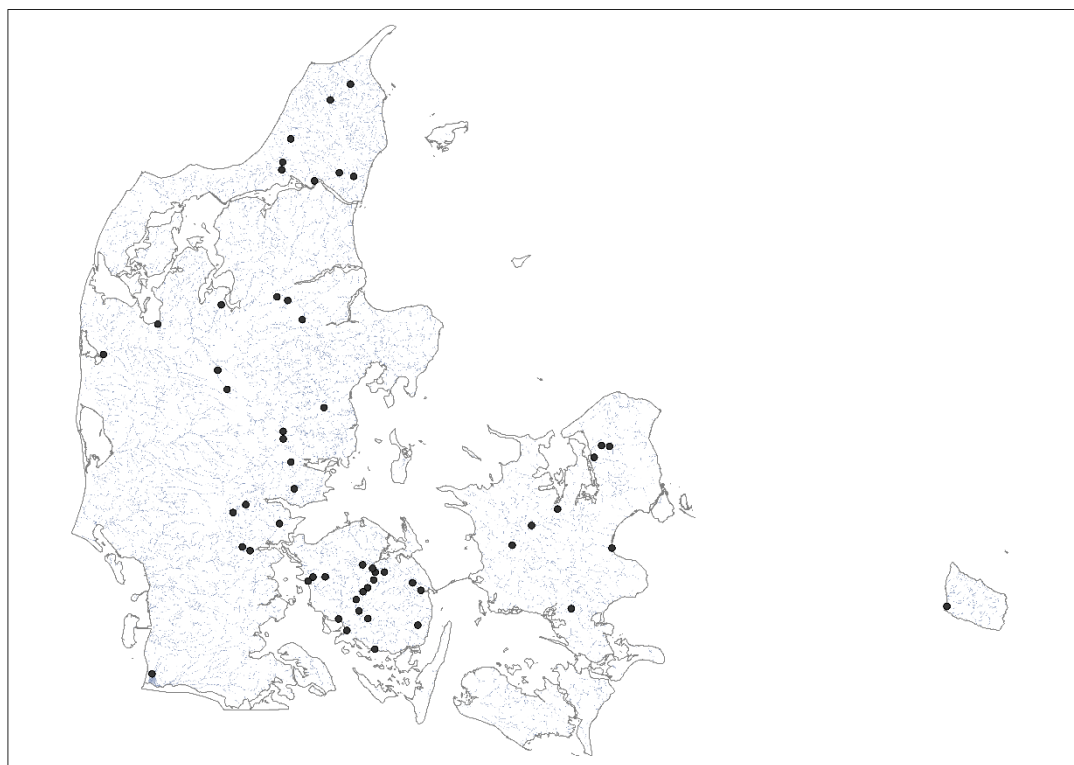
inkluderer prøver fra Skjern å 2021 og Karlstrup Kalkgrav

En yderligere analyse af vandssystemer (vandløb og søer) med hhv. påvist (minimum en lokalitet i systemet i kategorien "påvist") eller ikke konklusiv (kun lokaliteter i kategorien "ikke konklusiv") tilstedeværelse af eDNA blev ligeledes foretaget. Denne analyse viste at blev påvist eDNA fra signalkrebs i 49 ud af de 388 analyserede vandløb og 3 ud af de 163 analyserede søer (hhv. 12,63% og 1,84%) mens yderligere 10 vandløb og 1 sø (hhv. 2,58% og 0,61%) blev kategoriseret som ikke-konklusive. For flodkrebs var tallene lavere med hhv. 33 (8,51%) vandssystemer og 2 søer (1,22%) i kategorien "påvist" og 6 vandløb (1,55%) i kategorien ikke-konklusive. Galizisk sumpkrebs blev kun påvist i 6 vandssystemer (1,55%) med et vandssystem (0,26%) i kategorien ikke-konklusive (Tabel 7). Der blev analyseret for krebsepest i 88 vandssystemer og 5 søer med detektion af eDNA fra krebs. Ud af disse blev krebsepest påvist i 21 af de analyserede vandssystemer (23,86 %) og kategoriseret som ikke-konklusiv i 3 vandssystemer (3,41%). Krebsepest blev ikke påvist i nogle af de analyserede søer med detektion af krebs. Ud af de i alt 21 vandssystemer med påvist tilstedeværelse af eDNA fra krebsepest var signalkrebs påvist i 17 af dem. De resterende var analyseret positive for flodkrebs. Figur 6-9 viser den geografiske placering af de positive analyser for hver af arterne flodkrebs, signalkrebs og galizisk sumpkrebs samt for krebsepest. I mange vandløb er der mere end en positiv prøve. Figur 10 og Figur 11 viser den geografiske placering af fund af flodkrebs på Møn og signalkrebs på Als.

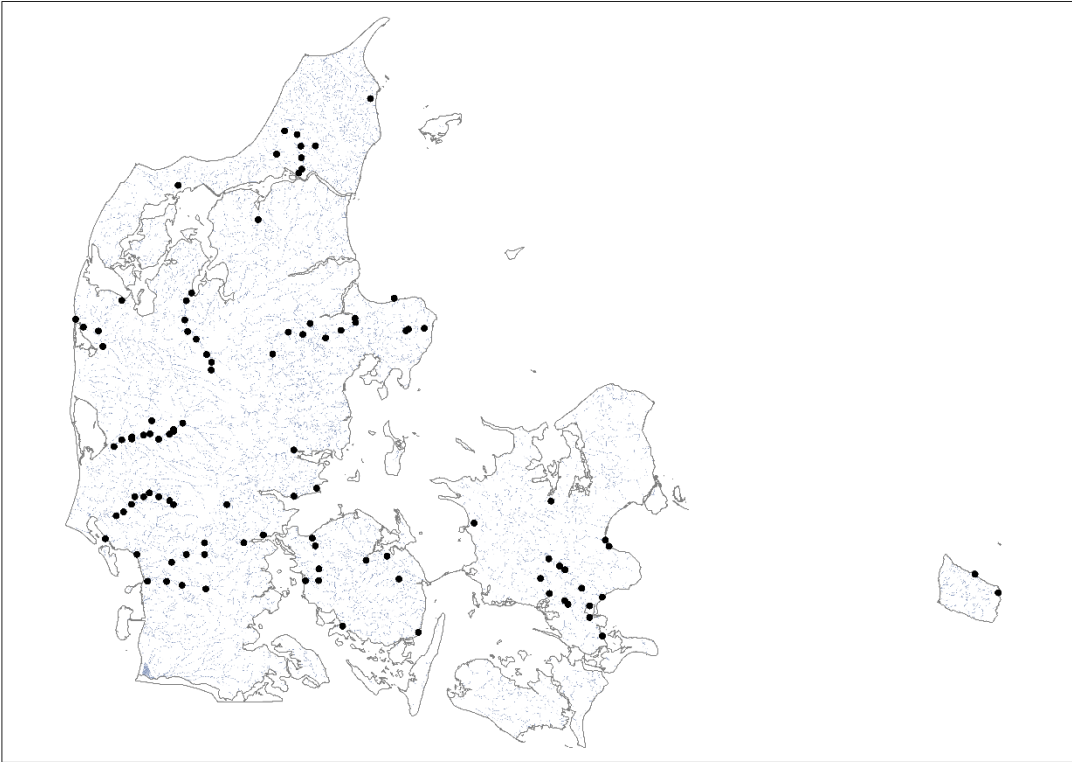
Tabel 7. Oversigt over vandsystemer og søer med positive eDNA prøver fordelt på arter for 2020 og 2021. Tallene inkluderer både påvist og ikke konklusive analyser (i parentes).

Art	Antal prøver 2020			Antal prøver 2021#			
	Analyserede vand-systemer	Positive		Analyserede vandsystemer		Positive søer	
		Antal	%	Vandløb	Søer	Antal	%
Flodkrebs	350	33 (6)	9,43 (1,71)	38	163	2	1,2
Signalkrebs	350	49 (10)	14,00 (2,86)	38	163	3 (1)	1,83 (0,61)
Galizisk sumpkrebs	350	5 (1)	1,43 (0,29)	38	163	0	0
Krebsepest	88	21 (3)	23,86 (3,41)	0	5	0	0

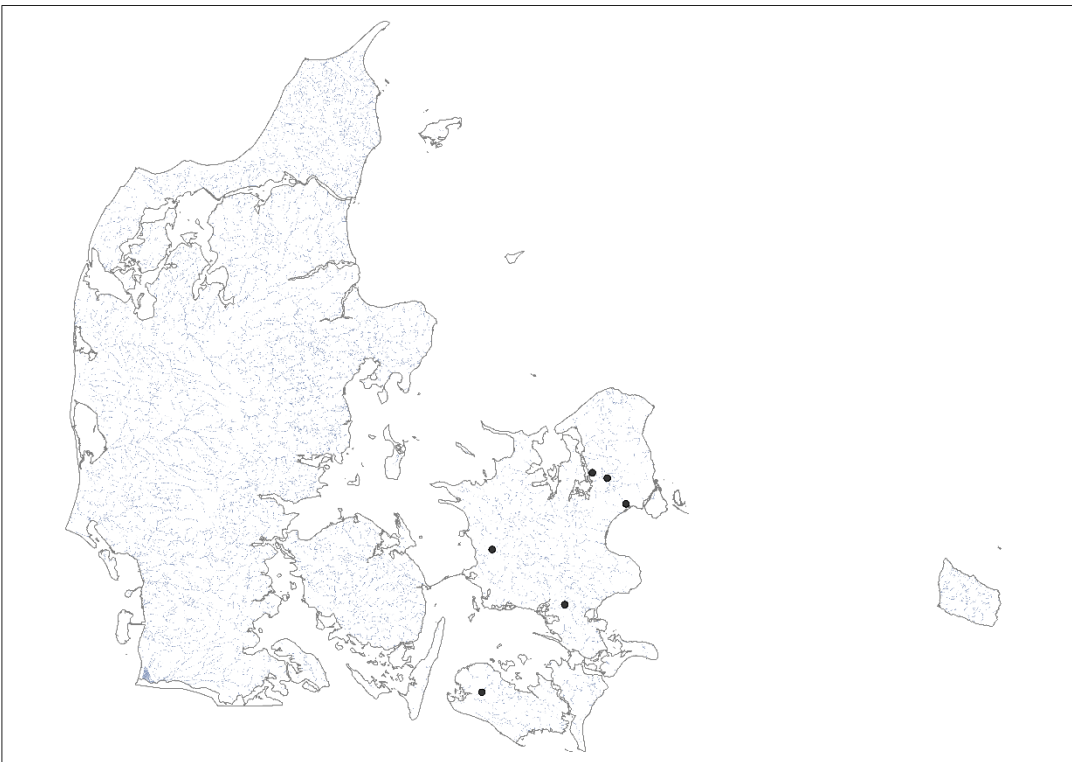
Inkluderer ikke tal resultaterne fra prøverne indsamlet i Skjern å 2021



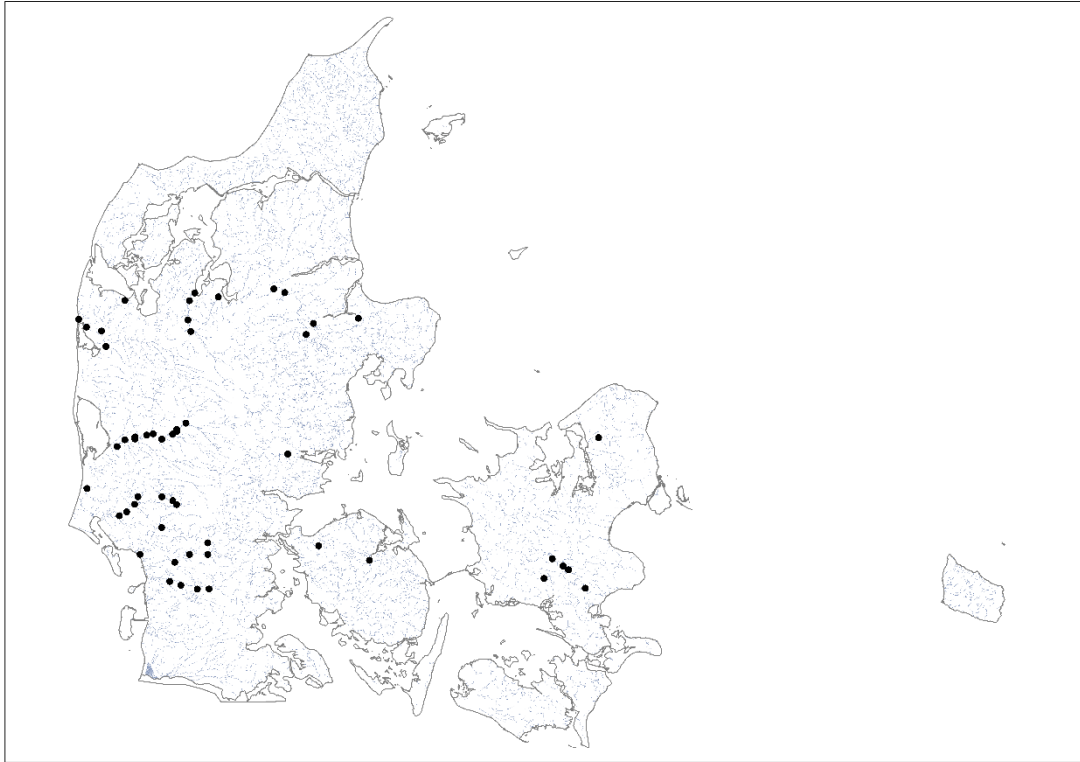
Figur 6. Forekomst af flodkrebs i vandløb undersøgt ved analyse af eDNA.



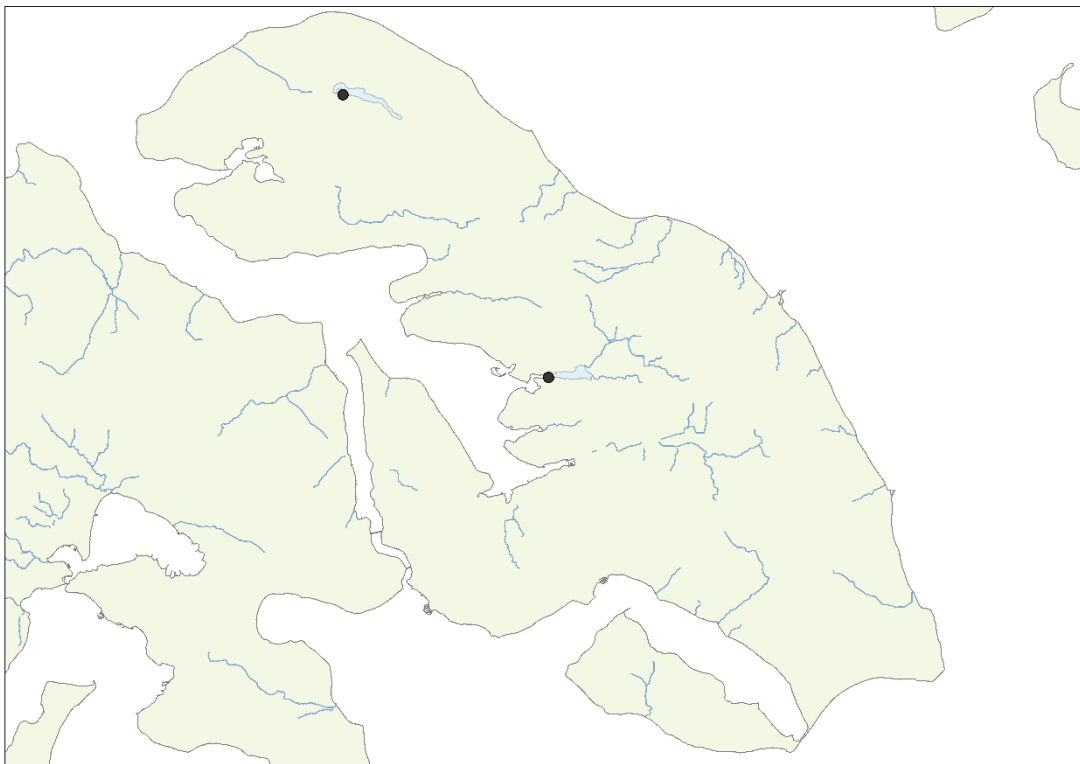
Figur 7. Forekomst af signalkrebs i vandløb undersøgt ved analyse af eDNA.



Figur 8. Forekomst af galizisk sumpkreb i vandløb undersøgt ved analyse af eDNA.



Figur 9. Forekomst af krebsepest i vandløb undersøgt ved analyse af eDNA.



Figur 10. Forekomst af signalkrebs i søer på Als undersøgt ved analyse af eDNA.



Figur 11. Forekomst af flodkrebs i søer på Møn undersøgt ved analyse af eDNA.

4. Diskussion

Overordnet har den gennemførte kortlægning af udbredelsen af ferskvandskrebs i Danmark vist, at der i vore ferske vande som forventet findes bestande af den hjemmehørende flodkrebs samt af de to fremmede og invasive arter signalkrebs og galizisk sumpkrebs. Kortlægningen har ikke påvist forekomst af andre arter, herunder marmorkrebs og louisiana flodkrebs. En konkret mistanke, der opstod i projektperioden, om forekomst af en art yderligere på en udpeget lokalitet (Karlstrup Kalkgrav) kunne ikke bekræftes.

4.1 Hvor stammer DNA i en prøve i et vandløb præcis fra?

Når man indsamler vandprøver i vandløb, har vandet forinden befundet sig opstrøms for indsamlingslokaliteten. Det vil sige at det DNA man filtrerer fra vandet også stammer fra et ukendt sted opstrøms for lokaliteten. Den præcise transportafstand for eDNA i vandløb er svær at bedømme. Den er afhængig af mange faktorer, hvor især strømhastigheden er af betydning for hvor lang afstand eDNA kan transporteres (Jane et al. 2015; Shogren et al. 2017; Wilcox et al. 2016). Yderligere er faktorer som UV-lys, bundsubstrat og det lokale mikrobielle samfund ligeledes vigtige for optags- og nedbrydningshastigheden, og dermed hvor lang afstand DNAet kan tilbagelægge før det nedbrydes (Hansen et al. 2019; Shogren et al. 2017). Den totale afstand kan derfor sandsynligvis variere meget, hvilket også afspejles i litteraturen, der demonstrerer transportafstande fra få hundrede meter til flere kilometer (Shogren et al. 2017; Jane et al. 2015; Wilcox et al. 2017; Deiner & Altermatt 2014). Det kan derfor være vanskeligt at stedbestemme en forekomst af fx krebs i et vandløb præcist ud fra eDNA alene.

Det ses også at søer kan virke som barrierer for eDNA transport i å-systemer. Dette er sandsynligvis pga. den lavere strømhastighed/vandets opholdstid i søen, som sammen med en ofte større vandvolumen kan lede til signifikant DNA nedbrydning og fortynding (Turner et al. 2015). Søer, der gennemstrømmes af vandløb, kan derfor være en barriere for detektion ved prøvetagning nedstrøms søen.

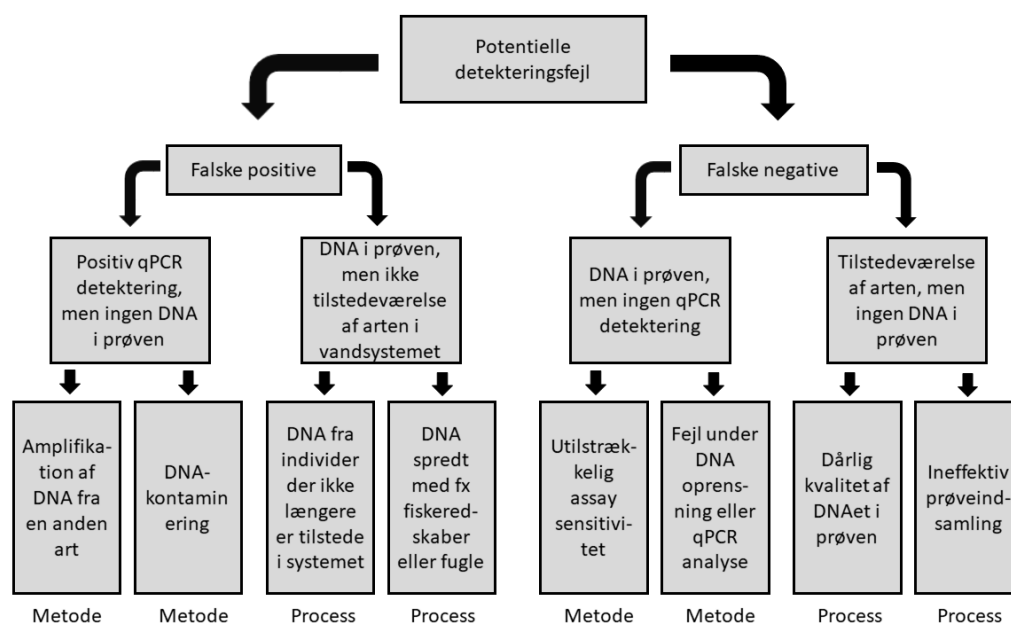
Det er i dette projekt søgt at modvirke disse problematikker ved at: i) tage vandprøver for hver 10 km i lange vandløb og ii) tage prøver opstrøms søer i vandløb, der gennemstrømmer disse.

4.2 Potentielle fejlkilder ved eDNA monitoring

Der er for alle monitoringsteknikker, herunder også eDNA, mulige fejlkilder som kan give anledning til misvisende resultater. Der er ved eDNA grundlæggende to overordnede typer af fejlkilder som er nødvendige at kende til; 1) falske positive prøver, hvor arten er detekteret, men hvor arten ikke er fysisk tilstede og 2) falske negative prøver, hvor arten er fysisk tilstede, men ikke fundet vha. af eDNA (Figur 12). For begge typer kan fejlkilderne endvidere blive opdelt i hhv. proces-relaterede fejlkilder eller metodiske fejlkilder.

Proces-relaterede fejlkilder opstår under monitoringsprocessen og er uafhængig af metodens effektivitet. Dette kan f.eks. relatere til nedbrydningshastigheden for eDNA i miljøet, eksterne kilder til eDNA i miljøet, kvaliteten af eDNA der bliver indsamlet og koncentrationen af eDNA fra den specifikke organisme i miljøet (Darling & Mahon 2011; Helger et al. 2014) (Figur 12). Proces-relaterede fejlkilder er meget svære at identificere. Et konkret eksempel fra Merkes et al. (2014) konkluderede at fæces fra fugle kunne afgive DNA til vandet fra tidligere byttedyr (som

ikke lever i det pågældende vand) og derved potentielt give anledning til falsk positiv detektion. Det formodes dog at risikoen for denne og lignende fejlkilder er lille i dette projekt.



Figur 12. Oversigt over potentielle fejlkilder ved eDNA monitoring (modificeret fra Helger et al. 2014).

Metodiske fejlkilder refererer til fejl i den metode, som bliver anvendt til at opsamle og analysere prøverne (Figur 12). Dette kan eksempelvis være uspecifikke molekylære værktøjer til eDNA analyse, kontaminering af prøver, utilstrækkelig sensitivitet eller andre metodefejl, såsom uhenigtsmæssig opbevaring af prøver.

Der er under dette projekt iværksat mange forholdsregler for at minimere og identificere eventuelle metodiske fejlkilder. For at sikre os mod mulige falsk-positive har vi kun benyttet os af gennemtestede arts-specifikke detektionssystemer (NIVA rapport nr. 7447-2019, Agersnap et al. 2017; Vrålstad et al. 2009). Således er alle brugte detektionssystemer blevet testet imod DNA fra tæt beslægtede arter. Falsk positive resultater pga. såkaldt krydsamplifikation (hvor et detektionssystem virker på flere arter) kan derfor antages at være usandsynligt, selvom det teoretisk er muligt at det kan forekomme med arter, der ikke er inkluderet i disse analyser. I sådanne tilfælde forventes PCR-reaktionen dog at udvise en lavere effektivitet, hvilket normalt leder til positive signaler med høje såkaldte ct-værdier ("cycle threshold", tidspunkt for hvornår DNA er opformeret signifikant ift. baggrunden). Af denne årsag valgte vi at operere med en ct-grænseværdi på <41, for hvornår et resultat kan kategoriseres som værende sikkert, såkaldt "påvist". Denne grænseværdi er også brugt i andre krebstudier (Agersnap et al. 2017). Positive prøver med ct-værdier ≥ 41 blev derimod kategoriseret som ikke-konklusive, hvor yderligere prøvetagning eller direkte observationer er nødvendige for at validere resultatet. Denne måde at kategorisere på må betragtes som værende konservativ. Dette er understøttet af at flere af de ikke-konklusive observationer er fundet inden for systemer med kendt forekomst af målarten.

En anden mulig fejlkilde til falsk-positive er kontaminering af udefrakommende DNA (Goldberg et al. 2008). For at sikre os imod kontaminering under feltarbejdet blev udstyret vasket grundigt med klorin efter hver prøvetagningsgang. Da klorin nedbryder DNA sikrer denne procedure imod overførsel af DNA mellem lokaliteterne (Strand et al. 2019). For at sikre os imod kontaminering under laboratoriearbejdet blev oprensninger og analyseopsætning udført i et særskilt DNA-frit laboratorie. For hver oprensningsgang blev der oprenset en oprensningskontrol, hvilket er en oprensning uden prøve, der bagefter analyseres med de brugte detektionssystemer for at sikre imod DNA-kontaminering i reagenserne. Yderligere blev der ved hver analyse opsat såkaldte negative kontroller (reaktioner uden prøve) for at teste for evt. kontamination under analyseopsætningen. Ingen oprensningskontroller eller negative kontroller kom ud som positive under hele projektet, hvorfor risikoen for falsk-positive pga. DNA-kontaminering i laboratoriet må anset som ubetydelig.

Der blev også taget hensyn til muligheden for evt. falsk-negative. I denne sammenhæng fokuserede vi især på risikoen for inhibering af qPCR analyserne, da dette i værste fald kan lede til en reduktion af PCR-effektiviteten, og lede til falsk-negative resultater. Inhibering af en PCR-analyse stammer fra forskellige kemiske forbindelser i vandprøven, som nogle gange findes i den endelige prøve efter eDNA isolering. De fleste kendte inhibitorer er organiske forbindelser såsom som salte, humusstoffer og urea (Schrader et al. 2012). Tidligere studier af signalkrebs har observeret inhibering (Agersnap et al. 2017; Strand et al. 2019). I disse studier blev dette observeret ved analyse af ufortyndede og fortyndede prøver. I dette projekt analyserede vi inhibering via en såkaldt IPC ("internal positiv control"). Dette er et primer- og probe-system til validering af mulig inhibering af PCR-reaktionen ved at sammenligne ct-værdien for reaktioner med og uden prøve, og er en ofte brugt metode i eDNA studier som en kontrol (Goldberg et al. 2008). På trods af denne foranstaltning så vi udbredt inhibering af det valgte detektionssystem til analyse af signalkrebs ("Paclen_COI", signalkrebs detektionssystem #2, Bilag 5). Dette var uventet og sandsynligvis et resultat af særlig overfølsomhed af det brugte detektionssystem. Lignede resultater er omtalt i litteraturen (Se f.eks. Huggett et al. 2009; Sidstedt mfl. 2020), men er umiddelbart sjældent omtalt i forbindelse med klassisk eDNA undersøgelse (se dog Richard et al. 2019). En af grundene til dette er muligvis at de fleste eDNA studier er baseret på et enkelt detektionssystem per art, hvorfor en sammenligning mellem detektionssystemer normalt ikke er mulig. I forbindelse med analyserne i projektet observerede vi, at detektionssystemet udviklet af NIVA ("Paclen_CO1", signalkrebs detektionssystem #1, Bilag 5) var mere følsomt end det først brugte detektionssystem. Dette detektionssystem blev derfor brugt til at krydsvalidere alle stationer fundet positive for signalkrebs i 2020 og endvidere til at genanalysere alle negative prøver fra 2020 og 2021. Alle positive blev herefter fortyndet og genanalyseret med det først brugte detektionssystem. Denne form for krydsvalidering medførte observation af yderligere 48 stationer med detektion af signalkrebs. Størstedelen af disse fandtes inden for systemer med kendt forekomst af signalkrebs, hvilket understøtter brugen af denne metode. Det er muligt at sådan gen-analysen for signalkrebs kan have bidraget til en relativ større andel af positive observationer for denne art ift. de andre analyserede arter. Dette skyldes, at man ved genanalyse undersøger yderligere prøve, hvorved sandsynligheden for at detektere eDNA i lave koncentrationer forøges. Da størstedelen af disse nye observationer fandtes inden for systemer, hvor eDNA allerede var påvist, må effekten heraf dog regnes for værende beskednen for det samlede resultat af undersøgelsen.

4.3 Flodkrebs

Flodkrebsen findes ifølge den udførte kortlægningen mest udbredt i vandløb i Nord- og Østjylland, på Fyn samt på Sjælland. Den mangler stort set i Sydvestjylland. Desuden blev der fundet flodkrebs på Bornholm samt det østlige Møn. Flodkrebs kan derfor betegnes som almindeligt udbredt i Danmark, hvilket også er konkluderet af Statens Naturhistoriske Museum & Astacon (2017). Den nuværende udbredelse er formentlig meget mindre end for ca. 120 år siden (Larsen, 1990). Larsen (1990) tilskriver udbrud af krebsepest i begyndelsen af 1900-tallet som en væsentlig årsag til tilbagegang for flodkrebsen, men den tiltagende forurening og regulering af vore vandløb op gennem forrige århundrede, må også antages at have medvirket til tilbagegangen.

De foreliggende resultater viser, at der er forekomster af flodkrebs i en række vandløb, hvor der også lever signalkrebs. Som det bl.a. er vist i Alling Å (Berg et al. 2020), vil sameksistens af de to arter over tid betyde, at flodkrebsen udkonkurreres. Det må derfor forventes, at der vil ske en yderligere tilbagegang i de nuværende bestande. Et eksempel er Odense Å, hvor der er fundet betydelig forekomst af flodkrebs, men samtidig en gryende bestand af signalkrebs.

Foruden den direkte konkurrence mellem de to arter, kan nye udbrud af krebsepest blandt de nuværende bestande af flodkrebs betyde, at disse uddør meget hurtigt. De foreliggende data peger dermed på, at flodkrebs må betegnes som en truet art i Danmark. Vores nuværende viden tillader dog næppe en egentlig rødlistevurdering, idet der mangler kvantitative data over tid. Resultaterne fra dette projekt er meget anvendelige som første datapunkt i en fremtidig tidsserie med fokus på antallet af bestande samt udbredelsesområde.

4.4 Signalkrebs

Signalkrebs er i dag udbredt i hele landet, kortlægningen har fundet stor udbredelse i de fleste landsdele. I Jylland findes der bestande af signalkrebs i de fleste større vandsystemer, herunder Kongeåen, Sneum Å, Varde Å, Skjern Å, Karup Å, Gudenåen, Grenåen, Vejle Å, Kolding Å (Berg 2021). På Fyn omfatter udbredelsen bl.a. Stavids Å, Odense Å og Vindinge Å. Fra et andet projekt vides der desuden at være signalkrebs i mange af søerne i Tarup-Davinde området, der gennemløbes af Vindingen Å (Koed 2017). På Sjælland er udbredelsen størst på Midt- og Sydsjælland. Der er bl.a. signalkrebs i Suså, som indtil for 10-15 år siden husede en stor bestand af flodkrebs, der ikke blev genfundet ved denne undersøgelse, på trods af, at der blev udtaget 8 prøver fra det 83 km lange åsystem. På det nordøstlige Sælland er signalkrebsen sjældnere end på resten af øen. Desuden er der fundet bestande af signalkrebs på Als og Bornholm.

Der er stort overlap mellem resultaterne af denne kortlægning og den tidligere registrering af tilfældige fund af signalkrebs i perioden 1990-2020, som DTU Aqua har indsamlet (Berg, 2021). Således er der registreret signalkrebs ud fra DNA-analyse i 27 ud af 35 vandsystemer med fysiske observationer (4 vandsystemer med fysiske fund, hvorfra der ikke er indsamlet vandprøver er udeladt). Af de 8 ikke detekterede fysiske fund, er 4 karakteriseret ved, at der er tale om observationer gjort i små tilløb opstrøms søer. Der er dermed kun i 4 ud af 35 tilfælde tale om manglende detektion med DNA analyse, der ikke umiddelbart kan forklares. Af dem er der i de to tale om fysisk fund af ét enkelt eksemplar (Døndal Bæk på Bornholm og Kragelund Møllebæk på Fyn). I et tredje, Tude Å på Sjælland, hvor signalkrebs har levet siden omkring 1990, blev der i 2016-17 forgæves fisket efter signalkrebs i længere tid i forbindelse med et andet projekt

(Koed, 2017). Resultaterne af denne kortlægning må således betegnes som yderst tilfredsstillende sammenholdt med den eksisterende viden (Berg, 2021). En detektionsrate på 27 ud af 35 mulige (= 77,14 %), som er et meget konservativt tal for denne undersøgelse, er sammenlignet med andre tilsvarende undersøgelser, særdeles tilfredsstillende (Tréguier et al., 2014).

Samtidig har denne kortlægning konstateret bestande af signalkrebs i 35 vandsystemer, hvor forekomst hidtil har været ukendt. Kortlægningen har dermed øget kendskabet til udbredelsen af signalkrebs i Danmark betydeligt. I ovenstående sammenligning er de ikke-konklusive analyser, der udgør 5 af de 35 nye fund, medregnet som positive fund.

4.5 Galizisk sumpkrebs

Kortlægningen har vist at galizisk sumpkrebs primært har sit udbredelsesområde på Sjælland. Det resultatet stemmer dermed overens med tidligere kortlægninger (Statens Naturhistoriske Museum & Astacon, 2017), mens et dokumenteret fund af arten i en sø beliggende i Jylland (Miljøstyrelsen 2020), ikke blev bekræftet. Der er tidligere i den internationale videnskabelige litteratur berettet om to andre forekomster i det sydlige Jylland (Kouba et al. 2014). Disse er ikke verificerede ved denne undersøgelse, men det skyldes måske, at de ikke er korrekte. Det har ikke været muligt at spore hvorfra oplysningerne stammer.

Det vides fra andre undersøgelser, at der er bestande af galizisk sumpkrebs i flere søer på Sjælland bl.a. i Hovedstadsområdet og Nordsjælland, herunder i Furesøen (formentlig den første vildtlevende bestand i Danmark), i Damhussøen og Emdrup Sø samt i Frederiksborg Slotsø. Disse er ikke konstateret ved denne undersøgelse, primært fordi de involverede vandsystemer ikke var blandt de, der blev udtrukket til undersøgelse. Kendt forekomst i søer i Suså-systemet, er heller ikke detekteret i denne undersøgelse. Det kan evt. skyldes at de bestande er gået til i et udbrud af krebsepest i 00'erne (Peter Gruth, pers. medd.), der som bekendt også er dødelig for denne art. I overensstemmelse hermed er der i denne undersøgelse konstateret udbredt forekomst af krebsepest i Suså.

4.6 Krebsepest

Der er fundet krebsepest i vandløb i hele landet. Ikke overraskende er de fleste fund af krebsepest gjort i vandløb, der indeholder en bestand af signalkrebs, som, i lighed med andre arter af krebs fra Nordamerika, kan være rask bærer af krebsepest (Kozubikova-Balcarova & Horca, 2015). Der er også tale om en bekræftelse på fund af krebsepest i en tidligere undersøgelse af krebsepest blandt bestande af signalkrebs i Danmark (Koed 2017).

Blandt de registrerede fund, er det bemærkelsesværdigt, at der nu er konstateret krebsepest i Alling Å. Den bestand af signalkrebs blev i 2008 testet fri for krebsepest (Skov et al., 2009). Idet der næppe er tilført nye signalkrebs til åens i forvejen enorme bestand af signalkrebs (Berg et al., 2020), må det konkluderes at smitten med stor sandsynlighed er blevet tilført åen via kontaminerede fiskeredskaber el. lign. Ligeledes kan den udbredte smitte med krebsepest i Suså forklare, hvorfor åens tidligere gode bestand af flodkrebs nu synes at være forsvundet.

Det er bekymrende at der også er fundet krebsepest i Skals Å vandsystem, idet åen var et af de sidste steder i landet, hvor der var en god bestand af flodkrebs. Fundet af krebsepest stemmer overens med information til DTU Aqua fra lokale borgere, der kunne berette om en pludselig

nedgang i fangsterne af flodkrebs i sommeren 2019 (Berg, S, pers medd.). En NOVANA undersøgelse fandt i oktober 2018 en lille bestand af signalkrebs i afløbet fra Tjele Langsø (Berg, 2021). Smitten med krebspest kan derfor være kommet derfra, men kontaminerede fiskeredskeer mm kan også være kilden. Da der også findes både mange signalkrebs og krebspest i Gudenåen, der sammen med Suså og Skals Å traditionelt har været regnet for at huse de tre største bestande af flodkrebs i Danmark, er risikoen for at bestanden i Gudenåen også går til, overhængende. Flodkrebs findes primært opstrøms Klostermølle ved Mossø, hvor der endnu ikke er fundet signalkrebs, men det er formentlig kun et spørgsmål om tid før signalkrebs fra de nedstrøms beliggende strækninger spreder sig opstrøms forbi Klostermølle. Ikke mindst nu, hvor der er fri passage forbi Klostermølle via den genskabte Døde Å. Ligeledes er den sidste store opstemning i øvre Gudenå ved Vestbirk Vandkraftanlæg nu under nedlæggelse (Naturstyrelsen 2021).

4.7 Konklusion

Ud fra den gennemførte kortlægning kan det konkluderes at:

- Detektion af ferskvandskrebs og krebspest ved hjælp af eDNA analyse, er en velegnet metode til kortlægning af udbredelse af disse organismer. Det er på linje med de konklusioner, der drages i den internationale, videnskabelige litteratur. Pålidelige resultater er afhængige af specialiseret udstyr og ekspertise i både indsamlings- og analysefasen.
- Den gennemførte kortlægning har øget vores viden om arternes udbredelse markant. Signalkrebs havde den hidtil bedst beskrevne udbredelse med sikre observationer fra 39 vandsystemer, det tal er nu øget med mindst 30 og muligvis 35 nye vandsystemer.
- Signalkrebs er den mest udbredt art af ferskvandskrebs i Danmark i dag. Udbredelsen omfatter en række af Danmarks største vandsystemer. I de fleste vandsystemer, er arten så vidt vides kun deludbredt. Men udbredelsen vil øges over tid.
- Flodkrebsen er den næstmest udbredte art. Der er imidlertid stor risiko for, at udbredelsen vil blive reduceret i de kommende år, idet der dels er vandsystemer, hvor der lever både flodkrebs og signalkrebs og dels er vandsystemer med flodkrebs, hvor der også er fundet krebspest.
- Galizisk sumpkrebs er kun konstateret få steder på Sjælland og Lolland, men vides at forekomme flere steder på Sjælland, primært i Hovedstadsområdet/Nordsjælland. Udbrud af krebspest kan betyde at denne art forsvinder.
- Krebspest er fundet i alle landsdele, som forventet primært i forbindelse med forekomster af signalkrebs, men også i vandsystemer med forekomst af flodkrebs. Baseret på fund af krebspest i vandløb, der for få år siden var fri for denne sygdom, synes udbredelsen af krebspest at være stigende.
- Et litteraturstudie viser, at der i dag kun findes meget indgribende metoder til effektiv bekæmpelse af invasive ferskvandskrebs, i form af metoderne kemisk bekæmpelse eller permanent udtørring/opfyldning.
- Der er ikke påvist forekomst af hverken marmorkrebs eller louisiana flodkrebs i Danmark.

Referencer

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

Aldermann, D.J. & Polglase, J.L., 1988. 7. Pathogens parasites and commensals. In: Holdich, D.M & Lowery, R.S. (EDs). *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. Croom Helm, London.

Berg, S. & Styrishave, B., 1998. 7.20, Øvrige arter, krebsdyr. I: Stoltze, M. & S. Pihl (red), *Gul-liste 1997 over planter og dyr i Danmark*. Miljø- og Energiministeriet, Danmarks Miljøundersøgelser og Skov- og Naturstyrelsen.

Berg, S., S.Sa. Pedersen, S.Sø. Pedersen, K.E. Vindum & H.D. Ravn, 2020. Signalkrebs i Alling Å; Udvikling 2008 – 2018. DTU Aqua Rapport 366-2020, 43 pp.

Berg, S., 2021. Liste over bekræftede forekomster af signalkrebs (*Pasifastacus leniusculus*) i danske vandsystemer, indsamlet 2008-2021. Internt arbejdsrapport, DTU Aqua.

Bergqvist, B., Bohman, P. & Edsman, L., 2016. Provfiske efter kræfter i sjöar och vattendrag. Version 2:1. Naturvårdsværket.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R. Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandersompele, J., & Wittwer, C. T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55**(4): 611–622.

Copp, G.H, Wesley, K.J., & Vilizzi, L., 2005. Pathways of ornamental and aquarium fish introductions into urban ponds of Epping Forest (London, England): the human vector. *J. Appl. Ichthyol.* **21**: 263–274.

Darlin, J.A. & Mahon A.R., 2011. From molecules to management: Adopting DNA-basen methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research* **111**: 978-988

Fossøy, F., Thaulow, J., Anglès d'Auriac, M., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., Mo, T.A., Sandlund, O.T. & Hesthagen T. 2018. Bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy for overvåkning og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk. NINA Rapport

Goldberg, C.S., Turner, C.R., Deiner, K., Klymus, K.E., Thomsen, P.F., Murphy, M.A., Spear, S.F., McKee, A., Oyster-McCance, S.J., Cornman, R.S., Laramie, M.B., Mahon, A.R., Lance, R.F., Pilliod, D.S., Strickler, K.M., Waits, L.P., Fremier, A.K., Takahara, T., Herder, J.E. and Taberlet, P. 2016, Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods Ecol Evol* **7**: 1299-1307.

- Hansen, B. K., Bekkevold, D., Clausen, L. W., & Nielsen, E. E. 2018. The sceptical optimist: challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fishes, *Fish and Fisheries*, **19**, 751-768.
- Helger J., Valentini, A., Bellemain, E., Dejean, T., van Delft, J., Thomsen, P.F. & Taberlet, P., 2014. Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. Stichting RAVON, Nijmegen. Report 2013-104.
- Huggett JF, Novak T, Garson JA, Green C, Morris-Jones SD, Miller RF, Zumla A. 2008. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Res Notes* **28** :70.
- Jane, S.F., Wilcox, T.M., McKelvey, K.S., Young, M.K., Schwartz, M.K., Lowe, W.H., Letcher, B.H. & Whiteley, A.R. 2015, Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources*, **15**, 216-227. doi:10.1111/1755-0998.12285
- Jussila, J., Edsman, L., Maguire, I., Diéguez-Urbeondo, J. & Theissinger, K., 2021. Money Kills Native Ecosystems: European Crayfish as an Example. *Front. Ecol. Evol.* 9: 648495. doi: 10.3389/fevo.2021.648495.
- Knudsen, S.W. Agersnap, S, Møller, P.R, Andersen, J.H., 2019. Development of species-specific eDNA-based test systems for monitoring of Development of freshwater crayfish. RAPPORT L.NR. 7447-2019. Niva.
- Koed, A., 2017. Forekomst af krebsepest hos danske bestande af signalkrebs. Notat til Styrelsen for Vand- og Naturforvaltning fra DTU Aqua.
- Kouba, A., Petrusek, A. & Kozák, P., 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **413**, 05. doi: 10.1051/kmae/2014007.
- Kozubikova-Balcarova, E. & Horca, I., 2015. Diseases, parasites and commensals of crayfish. I: Kozak, P. et al. (red.): Crayfish biology and culture. University of South Bohemia, Ceske Budejovice. P 261 – 292.
- Larsen, K., 1990. Den ny krebsebog. Forlaget Pinus, Skjern.
- Lowery, R.S. & Holdich, D.M, 1988. *Pacifastacus leniusculus* in North America and Europe, with details of the distribution of introduced and native crayfish species in Europe. In: Holdich, D.M & Lowery, R.S. (EDs). *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. Croom Helm, London.
- Merkes, C.M., McCalla, S.G., Jensen, N.R., Gaikowski, M.P. & Amberg, J.J., 2014. Persistence of DNA in carcasses, slime and avian feces may affect interpretation of environmental DNA data. *PLoS ONE* **9**: 11.

- Miljøstyrelsen, 2020. Invasiv galizisk sumpkrebs er fundet i Jylland. <https://mst.dk/service/nyheder/nyhedsarkiv/2020/jan/invasiv-galizisk-sumpkrebs-er-fundet-i-jylland/>. Dato tilgået: 13.12.2021.
- Miljøstyrelsen, 2021. Invasive arter i EU. <https://mst.dk/natur-vand/natur/national-naturbeskyttelse/invasive-arter/de-invasive-arter/invasive-arter-i-eu/>. Dato tilgået: 07.12.2021.
- Naturstyrelsen, 2021. Gudenåen skal genskabes og Vestbirk Vandkraftværk lukker. <https://naturstyrelsen.dk/lokale-enheder/lokale-nyheder/2021/marts/shl-gudenaen-skal-genskabes-og-vestbirk-vandkraftvaerk-lukker/>. Dato tilgået: 24.02.2022.
- Olsson, K., Stenroth, P., Nyström, P. & Granéli, W., 2009. Invasions and niche width: does niche width of an introduced crayfish differ from a native crayfish? *Freshwater Biology* 54: 1731-1740.
- Richard F. Lance and Xin Guan. Variation in inhibitor effects on qPCR assays and implications for eDNA surveys. 2019 *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **77**(1): 23-33.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. 2012. *J Appl Microbiol* 113(5): 1014-26.
- Shogren, A.J., Tank, J.L., Andruszkiewicz, E., Olds, B., Mahon, A. R., Jerde, C. L., Bolster, D. 2017. Controls on eDNA movement in streams: Transport, Retention, and Resuspension. *Scientific Reports*, **7**, 5065.
- Sidstedt, M., Rådström, P. & Hedman, J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. 2020. *Anal Bioanal Chem* **412**: 2009–2023
- Statens Naturhistoriske Museum & Astacon, 2017. Udbredelse af krebsarter i Danmark og identifikation af beskyttelsesområder for den hjemmehørende flodkrebs samt beskrivelser af metoder til bekæmpelse og overvågning af invasive krebs. Notat til Miljøstyrelsen.
- Söderbäck, B., 1995. Replacement of the native crayfish *Astacus astacus* by the introduced species *Pacifastacus leniusculus* in a Swedish lake: possible causes and mechanisms. Institute of Limnology, Uppsala University.
- Strand, DA, Johnsen, SI, Rusch, JC, et al. Monitoring a Norwegian freshwater crayfish tragedy: eDNA snapshots of invasion, infection and extinction. 2019. *J Appl Ecol* 56: 1661– 1673.
- Strand, D.A., Jussila, J., Johnsen, S.I., Viljamaa-Dirks, S., Edsman, L., Wiik-Nielsen, J., Viljugrein, H., Engdahl, F. and Vrålstad, T. (2014), Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *J Appl Ecol* 51: 544-553.
- Tréguier, A., Paillisson, J.-M., Dejean, T., Valentini, A., Schlaepfer, M. A., & Roussel, J.-M. (2014). Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *Journal of Applied Ecology*, 51(4), 871–879. <https://doi:10.1111/1365-2664.12262>

Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., & Lodge D. M. 2014. *Methods in Ecology and Evolution*, **5**, 676–684: doi: 10.1111/2041-210X.1220

Westman, K., Savolainen, R. & Julkunen, M., 2002. Replacement of the native crayfish *Astacus astacus* by the introduced species *Pacifastacus leniusculus* in a small, enclosed Finnish Lake: a 30-year study. *Ecography* 25: 53-73.

Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Sepulveda, A. J., Shepard, B. B., Jane, S. F., Whiteley, A. R., Lowe, W. H. & Schwartz, M. K. 2016. Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation*, **194**, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.12.023>.

Bilag

Liste over bilag til rapporten:

1. Feltprotokol for indsamling af vandprøver til eDNA analyse 2020
2. Feltprotokol for indsamling af vandprøver til eDNA analyse 2021
3. Feltskema til indsamling af e-DNA prøver 2020 og 2021
4. Protokol til eDNA oprensning i lab
5. Oversigt over de anvendte detektionssystemer
6. Oversigt over alle vandsystemer med positiv detektion af krebs og krebsepest 2020
7. Oversigt over alle vandsystemer med positiv detektion af krebs og krebsepest 2021
8. Gennemgang af kendte bekæmpelsesmetoder for invasive krebs og deres effekt
9. Oversigt over samtlige qPCR testresultater
10. Oversigt over stationer, hvor der er foretaget test for forekomst af marmorkrebs og louisiana flodkrebs

Bilag 1: Feltprotokol for indsamling af vandprøver til eDNA analyse

(Version 19.06.2020)

Før protokollen startes er det en forudsætning at samplings udstyret er rengjort. Såfremt det ikke er rengjort gennemføres punkt 14-15 før protokollen startes.

Indsamling af vand

Obs. Brug altid handsker, skift dem ofte og genbrug **aldrig** handsker mellem feltstationer.

Når du ankommer til indsamlingslokaliteten gør du følgende:

1. Skyl den rengjorte indsamlingsspand med vand fra lokaliteten mindst 2 gange.
2. Fyld spanden igen og skyl filterholder, slange, pincetter grundigt med vand fra indsamlingslokaliteten. De mindre ting kan nedsænkes i spanden. Sørg for at alt er skyllet grundigt før det tages i brug.
3. Filterholder samles uden filter. Filterholder, slange og pumpe sættes sammen. Herefter gennemskylles slange og filterholder uden filter med vand. Brug minimum 10 gange det volumen som slange og filterholder kan indeholde (< 500mL).
4. Vandprøven indsamles med indsamlingsspanden. Indsamlingen sker fra midten af vandsøjlen så vidt muligt uden kontakt til bund og mindst 1 meter fra brinken. I små vandløb er dette dog ikke muligt, vandprøven indsamles ca. midt i vandløbet i overfladen.
5. Hvis du går ud i åen skal vandprøven altid udtages så personen der udtager prøven står nedstrøms, mens prøven udtages opstrøms. Berøring af bunden med spanden undgås i det omfang det er muligt. Skulle det ske at bundsedimentet bliver opslæmmet efter berøring, tages indsamlingsspanden op og tømmes og der foretages ny vandprøveudtagning.

Udtages prøven fra en bro, må spanden ikke ramme broens side på vej op, så der kommer materiale fra broen i spanden.

6. Filterholderen skilles ad og et filter indsættes med en rengjort pincet. Filterholderen samles.
7. Slangen sættes på "inlet" siden af filterholderen. Den anden ende af slangen nedsænkes i opsamlings spanden (se illustration nedenfor). "Outlet" siden på filterholderen sættes på slagen som er fastgjort på målebægeret.
8. Slangen sættes på pumpen og pumpen igangsættes indtil mindst 5 L er filtreret. Præcist volumen udfyldes i feltskemaet. Såfremt filteret blokeres og filtreringen tager meget lang tid (>30 minutter), indstilles filtreringen, og det filtrerede volumen noteres.
9. Filterholderen tømmes for vand ved at lade pumpen køre med indsug af luft, hvorved filterholder og filter bliver så tørt som mulig. Dette skal tage mindre end et minut.
10. Filterholderen skilles og med en pincet udtages filteret og nedsænkes i en 5 ml tube indeholdende konserverings væske.

11. Tuben med filteret puttes tilbage i den zip-lock pose den kom i og lukkes.
12. Zip-lock posen mærkes med waypoint nummeret og feltskemaet udfyldes.
13. Tuben puttes i køletaske.

Rengøring efter prøveudtagning

14. Filterholder, slanger, pincet og indsamlingsspand nedsænkes i en 5% klorinbaseret opløsning i minimum 10 minutter (Kanotønde nummer 1). Udstyret kan evt. ligge i tønden under transport til næste lokalitet. Lad det ikke ligge overnatten.
Klorinen vil afblege og ødelægge jeres tøj ved den mindste berøring. Det er derfor vigtigt at I er opmærksomme når I lægger udstyret ned og tager det op.
15. Ved ankomst til næste lokalitet vaskes filterholder, slange, pincetter og indsamlingsspand i en 5% natrium thiosulfat opløsning for at neutralisere klorinen (Kanotønde nummer 2).
16. Waders desinficeres med VirkonS mellem hver station (kan udelades hvis de ikke har været i brug).

Efter end feltdag

- Oplad batterier til pumpe (evt. også til GPS'en)
- Sørg for at udstyret ikke ligger i klorinen over natten.

Rengøring

Rengøringen er til for 1) at fjerne rester af eDNA fra forrige indsamlingslokalitet så kontaminering mellem indsamlingslokaliteter kan udelukkes og for 2) at desinficere udstyret for undgå spredning af krebsepest og andre vandbårne sygdomme. Det er derfor vigtigt at der bruges den nødvendige tid til desinfektion og rengøring.

Ordforklaring

Filterholder



Tube



Pumpe



Filter



Opstilling til filtrering



Isætning af filter (husk handsker og læg ikke filter på jorden)

Den nemmeste måde at samle dette på er ved at samle det som vist nedenfor. Da det blev testet efterfølgende lækkede det heller ikke fra siden, som vi så under demonstrationen.

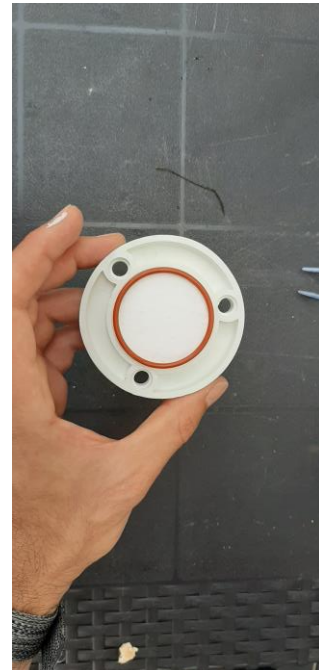
1. Alt skilt ad



2. Filter lægges på



3. O-ring lægges på filter og filterholder samles.



Udstyrsliste

Filtrering af vandprøver	stk.
Pincetter	>20
Handsker (100 stk. pr. kasse)	2
Indsamlings spand	2
Målebæger inkl. snor	1
Snor + karabin (7 m)	1
Extra snor (23 m)	1
Slange til filtrering	2
Filterholdere	2
Flamingokasse til opbevaring af prøver	1
Pumpe/boremaskine	1
Batterier	3
Opladere	2
Rengøring af udstyr	
Hullet spand	1
Kanotønde 1 (klorin/bleach – 7 liter)	1
Kanotønde 2 (natrium thiosulfat – 10 l)	1
Opbevaring af krebs	
Plast dunke (0,5L)	3
Etanol 96% (0.5L)	1
Vaders desinfektion	
Balje (blå)	1
Virkon S (pulver – 600 g)	1
Børste	1
Tragt (Rød)	1
Dunk (20L)	1
Andet	
Blyanter	>4
Mappe til feltskemaer	1
Feltskemaer	fuldt sæt
Stol	1
Pose med løse filtre til øvelse	1
Sorte affaldssække	>6
GPS	1
Vaders	1
Regnjakke	1

Bilag 2: Feltprotokol for indsamling af vandprøver til eDNA analyse

(Version 14.06.2021)

Før protokollen startes er det en forudsætning at samplings udstyret er rengjort. Såfremt det ikke er rengjort gennemføres punkt 16-17 før protokollen startes.

Indsamling af vand

Obs. Brug altid handsker, skift dem ofte og genbrug **aldrig** handsker mellem feltstationer.

Når du ankommer til indsamlingslokaliteten gør du følgende:

1. Tag billede med GPS'en af sampling stedet og tag et waypoint direkte på sampling stedet. Husk også at notere koordinaterne i feltskemaet.
2. Skyl det rengjorte målebæger med vand fra lokaliteten mindst 2 gange.
3. Fyld målebægeret igen og skyl filterholder, slange, pincetter grundigt med vand fra indsamlingslokaliteten. De mindre ting kan nedsænkes i målebægeret. Sørg for at alt er skyllet grundigt før det tages i brug.
4. Filterholder samles uden filter. Filterholder, slange og pumpe sættes sammen. Herefter gennemskyldes slange og filterholder uden filter med vand. Brug minimum 10 gange det volumen som slange og filterholder kan indeholde ($\approx 500\text{mL}$).
5. Vandprøven indsamles med målebægeret. Indsamlingen sker fra midten af vandsøjlen så vidt muligt uden kontakt til bund og mindst 1 meter fra brinken. I små vandløb er dette dog ikke muligt, vandprøven indsamles ca. midt i vandløbet i overfladen.
6. Hvis du går ud i åen skal vandprøven altid udtages så personen der udtager prøven står nedstrøms, mens prøven udtages opstrøms. Berøring af bunden med målebægeret undgås i det omfang det er muligt. Skulle det ske at bundsedimentet bliver opslæmmet efter berøring, tages målebægeret op og tømmes og der foretages ny vandprøveudtagning.

Udtages prøven fra en bro, må målebægeret ikke ramme broens side på vej op, så der kommer materiale fra broen i målebægeret.

Udtages prøven i en sø, skal der ligesom i vandløb indsamles vand midt i vandsøjlen, mindst 1 m fra bredden/rørsumpen og så vidt muligt i et område, der er fri for vegetation. Hvis der vades ud, skal det vand der indsamles, være helt fri for ophvirvlet sediment.

7. Filterholderen skilles ad og et filter indsættes med en rengjort pincet. Filterholderen samles.
8. Slangen sættes på "inlet" siden af filterholderen. Den anden ende af slangen nedsænkes i målebægeret (se illustration nedenfor).
9. Slangen sættes på pumpen. Hust at noter volumen på målebægeret før filtrationen påbegyndes, så man kan beregne hvor meget vand der bliver filtreret.

10. Pumpen igangsættes indtil filteret er tilstoppet eller 5 L er filtreret. Præcist volumen udfyldes i feltskemaet. Målebægeret kan maksimalt indeholde 3L vand, derfor vil der, såfremt filteret ikke stopper til, skulle hentes vand flere gange.
11. Filterholderen tømmes for vand ved at lade pumpen køre med indsug af luft, hvorved filterholder og filter bliver så tørt som mulig. Dette skal tage mindre end et minut.
12. Filterholderen skilles og med en pincet udtages filteret og nedsænkes i en 5 ml tube indeholdende konserverings væske. Den nemmeste måde at få filteret til at passe i tuben er ved at folde det 2 gange på samme led. OBS. håndtering af filteret sker kun ved brug af pincetter!
13. Tuben med filteret puttes tilbage i den zip-lock pose den kom i og lukkes.
14. Zip-lock posen mærkes med waypoint nummeret og feltskemaet udfyldes.
15. Posen med tuben puttes i køletaske.

Rengøring efter prøveudtagning

16. Med slangen placeret i pumpen, suges der klorin fra kanotønde 1 op i slangen indtil klorinen har gennemskyllet slangen. Herefter placeres filterholder, slange, pincet og målebæger i den klorinbaserede opløsning i minimum 10 minutter (Kantønde nummer 1). Udstyret kan evt. ligge i tøndens under transport til næste lokalitet. Lad det ikke ligge over natten – skyl det med ferskvand ved hjemkomst.
17. Ved ankomst til næste lokalitet vaskes filterholder, slange, pincetter og målebæger i en 5% natrium thiosulfat opløsning for at neutralisere klorinen (Kantønde nummer 2).
18. Waders desinficeres med VirkonS mellem hver station (kan udelades hvis de ikke har været i brug).

Efter end feltdag

- Oplad batterier til pumpe (evt. også til GPS'en)
- Sørg for at udstyret ikke ligger i klorinen over natten.

Rengøring

Rengøringen er til for 1) at fjerne rester af eDNA fra forrige indsamlingslokalitet så kontaminering mellem indsamlingslokaliteter kan udelukkes og for 2) at desinficere udstyret for undgå spredning af krebsepest og andre vandbårne sygdomme. Det er derfor vigtigt at der bruges den nødvendige tid til desinfektion og rengøring.

Ordforklaring

Filterholder



Tube



Pumpe



Filter



Opstilling til filtrering vandløb og nemt tilgængelige lokaliteter



Isætning af filter (husk handsker og læg ikke filter på jorden)

Den nemmeste måde at samle dette på er ved at samle det som vist nedenfor. Da det blev testet efterfølgende lækkede det heller ikke fra siden, som vi så under demonstrationen.

1. Alt skilt ad



2. Filter lægges på



3. O-ring lægges på filter og filterholder samles.



Udstyrsliste

Filtrering af vandprøver	stk.
Pincetter	>20
Tube og filter i zip-lock pose	>200
Handsker (100 stk. pr. kasse)	2
Målebæger	1
Karabin	1
Snor (30 m)	1
Slange til filtrering (25 m)	1
Lange slanger til vandhentning	1
Flod	2
Elastikker	>10
Filterholdere	2
Flamingokasse til opbevaring af prøver	2
Pumpe/boremaskine	1
Batterier	2
Opladere	2
Skalpel	1
Rengøring af udstyr	
Hullet spand	1
Kanotønde 1 (klorin/bleach – ~7 liter)	1
Kanotønde 2 (natrium thiosulfat – ~20 l)	1
Opbevaring af krebs	
Plast dunke (0,5L)	3
Etanol 96% (0.5L)	1
Vaders desinfektion	
Balje (blå)	2
Virkon S (pulver – 600 g)	1
Børste	1
Tragt (Rød)	1
Dunk (20L)	1
Andet	
Blyanter	>4
Mappe til feltskemaer	1
Feltskemaer	30
Stol	1
Pose med løse filtre til øvelse	1
Sorte affaldssække	>6
GPS	1

Bilag 3: Feltskema til indsamling af e-DNA prøver 2020 og 2021

Way-Point nummer:	Bredde (UTM): N	Længde (UTM): Ø
Prøve ID:	Dato: / - 2020	Filtreret vandvolumen: Liter
Vandsystem nr.:		
Vandløb / gren:		
Observationer vedr. krebs:		
Øvrige bemærkninger:		

Way-Point nummer:	Bredde (UTM): N	Længde (UTM): Ø
Prøve ID:	Dato: / - 2021	Filtreret vandvolumen: Liter
Vandsystem nr.:		
Vandløb / gren / sø:		
Observationer vedr. krebs:		
Øvrige bemærkninger:		

Bilag 4: Protokol til eDNA oprensning i lab

Udarbejdet af Brian Klitgård Hansen

Day 1

Thaw proteinase K if in the freezer.

Turn the oven to 56 ° C.

1. Carefully wipe the outer surfaces of all the collection tubes and filter capsules with 5% bleach (e.g. 6-14% diluted as a 10%) using clean tissue paper. Dry and wipe with H₂O followed by wiping with 70% Ethanol using clean tissue paper.
2. To each sample, add 340 µL proteinase K per sample and vortex for 15 seconds.
3. Incubate, while rotating, at 56°C for 24 hours (overnight).

Day 2

Preheat AE-buffer in the oven at 70° C.

4. Vortex for 15 s.
5. Transfer ALL liquid and the filter to a NucleoSpin filter midi.
6. Spin in centrifuge for 1 minute at the highest speed (4500*g).
7. Discard the filter part.
8. Add 3400 µL of AL buffer and 3400 µL of ice-cold molecular grade 99% ethanol. Note: AL and ethanol can be premixed.
9. Vortex vigorously.
10. Make a quick spin to avoid liquid in the cap.
11. Transfer the mixture into a Nucleospin Plant II midi column.
12. Spin in centrifuge for 2 minutes at the highest speed (4500*g).
13. Discard flowthrough.
14. Repeat steps 11-13 until all the sample is filtered through the spin column.
15. Add 1 mL Buffer AW1, and centrifuge for 2 min at highest speed. (No need to discard flowthrough, we have lots of room in the tube).
16. Add 3 mL Buffer AW2, and centrifuge for 10 min at the highest speed to dry the membrane. Discard flow-through and collection tube.
17. Transfer spin column to a 15 mL collection tube.
18. Add 200 µL buffer AE, heated to 70° C, to the membrane.
19. Incubate at RT for 10 min.
20. Centrifuge 2 minutes at the highest speed (4500*g).
21. Re-elute DNA from DNA tube. (Apply eluate back on spin column).
22. Incubate at RT for 10 min.
23. Centrifuge 2 minutes at the highest speed (4500*g)
24. Discard the spin column.
25. Transfer DNA to pre-marked DNA LoBind tube.
26. Centrifuge 2 minutes at 8000*g.
27. Aliquots the sample into smaller portions.
28. Make a measurement for DNA-konc. with Qubit dsDNA BR Assay Kit.
29. Store at -20°C.

Bilag 5: Oversigt over de anvendte detektionssystemer

Oversigt over alle de brugte detektionssystemer. For yderligere information om de enkelte systemer henvises til deres respektive referencer

Detektionssystem	Sekvens	Koncentration (Nm)	Reference
Signalkrebs (<i>Pacifastacus leniusculus</i>) detektionssystem #1 - 235 bp[#]			
Paclen_CO1_F02	5'-TGTAGTCACGGCACATGCTT-3'	240	NIVA rapport nr. 7447-2019
Paclen_CO1_R02	5'-CCGCTGCTAGAGGAGGATAA-3'	120	NIVA rapport nr. 7447-2019
Paclen_CO1_P01	5'-FAM-AAAGAGGAGTGGGTACTGGATGAAC-BHQ1-3'	60	NIVA rapport nr. 7447-2019
Signalkrebs (<i>Pacifastacus leniusculus</i>) detektionssystem #2 - 65 bp			
Paclen_COI_F0336	5'-AACTAGAGGAATAGTTGAAAG-3'	800	Agersnap et al. 2017
Astlen_COI_R0397	5'-CCGCTGCTAGAGGAGGATAA-3'	800	Agersnap et al. 2017
Paclen_COI_P0357	5'-FAM-AGGAGTGGGTACTGGATGAACT-BHQ1-3'	200	Agersnap et al. 2017
Flodkrebs (<i>Astacus astacus</i>) - 144 bp			
Astast_COI_F01	5'-CGATTTTAGGGGCGGTAAAT-3'	800	NIVA rapport nr. 7447-2019
Astast_COI_R01	5'-CACCTGCCAACACAGGTAGA-3'	800	NIVA rapport nr. 7447-2019
Astast_COI_P01	5'-FAM-TCGAATACCTCTTTTGTGGTCTGT-BHQ-1-3'	200	NIVA rapport nr. 7447-2019
Galizisk sumpkrebs (<i>Astacus leptodactylus</i>) - 70 bp[#]			
Ponlep_CO1_F03	5'-TTTGGGACTTGAGCAGGAAT-3'	800	NIVA rapport nr. 7447-2019
Ponlep_CO1_R03	5'-CTGTTGTCCGAGTTCAACA-3'	240	NIVA rapport nr. 7447-2019
Ponlep_CO1_P03	5'-FAM-TGGGAACCTCTTTAAGAATAATTATTCG-BHQ-1-3'	800	NIVA rapport nr. 7447-2019
Krebsepest (<i>Aphanomyces astaci</i>) - 70 bp			
AphAstITS-39F	5'-AAGGCTTGTGCTGGGATGTT-3'	800	Vrålstad et al. 2009
AphAstITS-97R	5'-CTTCTTGCAGAACCTTCTGCTA-3'	800	Vrålstad et al. 2009
AphAstITS-60T	5'-FAM-TTCGGGACGACCC-BHQq-3'	200	Vrålstad et al. 2009
Louisiana flodkrebs (<i>Procambarus clarkii</i>) - 203 bp			
Procla_co1_F04	5'-GCGGGAGCATCTGTAGATTT-3'	800	NIVA rapport nr. 7447-2019
Procla_co1_R04	5'-ATAGCTCCTGCCAACACAGG-3'	800	NIVA rapport nr. 7447-2019
Procla_co1_P04	5'-FAM-ACGAACAGTAGGGATAACCATGGAT-BHQ1-3'	200	NIVA rapport nr. 7447-2019
Marmorkrebs (<i>Procambarus fallax</i>) -181 bp			
Profal_co1_F01	5'-AGTTGAGAGGGGAGTAGGAAC-3'	800	NIVA rapport nr. 7447-2019
Profal_co1_R01	5'-AGTTATACCAGCTGCCCGTA-3'	800	NIVA rapport nr. 7447-2019
Profal_co1_P01	5'-FAM-AACTGTTTATCCTCCTTGTAGTTCTGC-BHQ1-3'	200	NIVA rapport nr. 7447-2019

Optimeret under dette projekt

Bilag 6: Oversigt over alle vandsystemer med positiv detektion af krebs og krebsepest 2020

Oversigt over alle analyserede vandsystemer fra felt sæsonen 2020 med positiv detektion af krebs og krebsepest. Analyseresultater af prøver indsamlet fra Skjern å i 2021 er inkluderet i tabellen. Tallene viser antallet af stationer med konstateret eDNA fra krebs og krebsepest. Tal i parentes indikerer stationer der udviste et svagt qPCR signal (ct-værdi ≥ 41) og er kategoriseret som 'ikke-konklusive' i rapporten (se rapporttekst for diskussion).

Vandsystem nr.	Vandløb	Signalkrebs	Flodkrebs	Galizisk sumpkrebs	Krebsepest
1504	Alling Å	4	(1)		1
0303	Arrenakke Å	(1)			
1229	As-Rårup Skelbæk	1			
1708	Bangsbo Å	1			
2909	Brede Å		(1)		
1012	Brende Å	1	3		
1307	Bygholm Å		1		1
0105	Byå		1		
2506	Damhus Å		1		
0334	Elverdamsåen	1	1		
2611	Falen å		(1)		
0519	Faxe Å	1			
0625	Fladså	1			
2504	Flynder Å	1			1
0630	Fuglebæk Kanal			(1)	
2503	Fåremølle Å	1			1
0915	Geels Å	1			
1626	Gerå		2 (1)		
1317	Giber Å	(1)			(1)
1417	Grenå	3			
0940	Grubbemølle Å	1			
0306	Græse Å		1		
1506	Gudenå	4	2		2
1208	Gudsø Bæk	1			
1207	Gudsø Å	(1)			
2802	Guldager Møllebæk	1			
1901	Halkær Å	1			
0419	Halleby Å / Åmose Å	1	1		
0833	Halsted Å			1	
1308	Hansted Å	1			
0942	Hattebæk		(1)		
0305	Havelse Å		2		1

Vandsystem nr.	Vandløb	Signalkrebs	Flodkrebs	Galizisk sumpkrebs	Krebsepest
2309	Hellegård Å		1		
0521	Herredsbæk	1			
1401	Hulbæk	(1)			
0937	Hundstrup Å		1		
1018	Hårby Å		1		
2208	Jordbro Å		1		1
2303	Karup å	7 (1)	2		3
1604	Kastbjerg Å	(1)			
2105	Klostermølle Å (Fold Å)	1			1
1205	Kolding Å	1	1		
2808	Konge å	4			4
0508	Køge Å	1	1		
1818	Lerbæk		1		
1817	Lindholm Å	4			
1736	Liver Å		(1)		(1)
2136	Lyngbro Bæk	(1)			
0132	Melsted Å	1			
0531	Mern Å	1			
0211	Nivå		1	1	
0912	Odense Å	(1)	8		(1)
1014	Pugemølle Å	2			
2502	Ramme Å	1			1
2902	Ribe Å	4 (3)			4
1222	Rosenvold Å	1			
1813	Rye Å	4 (1)	3 (2)		
2205	Skals Å		3		2
2701	Skjern Å, 2020	5			11
2701	Skjern Å, 2021	7 (1)			
1301	Skjold Å	(1)	(1)		
0120	Skovsholm Bæk	1			
1427	Skærbæk	1			
2806	Sneum Å	1 (1)			2
1212	Spang Å		1		
0217	St. Vejle Å			1	
0911	Stavids Å	1	2		1
0941	Stensgård Møllebæk		1		
0927	Stokkebæk		1		
2401	Storå	1			1
1003	Storå (på Fyn)	2			1
0605	Tude Å		1		
0622	Suså	7 (1)			6
1426	Treå	(1)			

Vandsystem nr.	Vandløb	Signalkrebs	Flodkrebs	Galizisk sumpkrebs	Krebsepest
0511	Tryggevælde Å	2			
0525	Tubæk	1			
0605	Tude Å		1	1	
1944	Tømmerby Å (Afløb fra Tømmerby Fj.)	1			
1731	Uggerby Å		2 (1)		
2801	Varde Å	9			8
1216	Vejle Å	1 (1)	2 (1)		
0932	Vejstrup Å	1			
2904	Vester Vedsted Bæk	(1)			
3001	Vidå		1		
2304	Vindebæk (Felding Bæk)	1			1
0923	Vindinge Å	1	2		
0518	Vivede Mølleå	1			
0309	Værebro Å			2	
1220	Ørum Å		1		
1320	Århus Å		1		

Bilag 7: Oversigt over alle vandsystemer med positiv detektion af krebs og krebsepest 2021

Oversigt over alle analyserede vandsystemer fra feltsæsonen 2021 med positiv detektion af krebs. Analyseresultater af prøver indsamlet fra Skjern å er inkluderet i tabellen i bilag 6. Analyseresultater af prøver indsamlet fra Skjern å i 2021 er inkluderet i tabellen. Tallene viser antallet af stationer med konstateret eDNA fra krebs og krebsepest. Tal i parentes indikerer stationer der udviste et svagt qPCR signal (ct-værdi ≥ 41) og er kategoriseret som "ikke-konklussive" i rapporten (se rapporttekst for diskussion). Der blev ikke fundet eDNA fra krebsepest i nogle af de nedenstående vandsystemer.

Ø- navn	Sø	Signalkrebs	Flodkrebs	Galizisk sumpkrebs	Krebsepest
Als	Nordborg Sø	1			
Als	Ketting Nor	1			
Als	Sø i Pøl	1			
Als	Sø ved Gyldbjerggård	(1)			
Møn	Hunesø		1 (1)		
Møn	Store Geddesø		1		

Bilag 8: Gennemgang af kendte bekæmpelsesmetoder for invasive krebs og deres effekt

Søren Berg, DTU Aqua, Sektion for Ferskvandsfiskeri og –økologi, Silkeborg

2021

Fremmede og invasive arter af krebs er et problem i hele Europa. Således er ikke mindre end 6 af de 66 arter på EU's liste (3. udgave) over uønskede, invasive dyr og planter i EU krebsdyr, heraf 5 ferskvandskrebs (signalkrebs, marmorkrebs (*Procambarus virginalis*), Louisiana flodkrebs (*Procambarus clarkii*), viril krebs (*Faxonius virilis*) og amerikansk flodkrebs (*Orconectes limosus*)), der alle stammer fra Nordamerika samt kinesisk uldhåndskræb (*Eriocheir sinensis*), der lever det meste af sit liv i ferskvand (Miljøstyrelsen 2020). Hertil skal tilføjes galizisk sumpkrebs (*Astacus leptodactylus*), der af formelle grunde ikke kan optages på EU's liste, fordi den lever naturligt inden for EU's ydre grænser. Men galizisk sumpkrebs er, fra sin naturlige udbredelse i bl.a. Sydøsteuropa, spredt til en lang række lande i Vest- og Nordøsteuropa, herunder Danmark (Kouba m.fl. 2014). Det er dog de arter, der stammer fra Nordamerika, der skaber de største miljømæssige udfordringer i de modtagende økosystemer (Gheradi m.fl. 2011; Chucholl 2016).

De væsentligste problemer med invasive krebs i Danmark vurderes at knytte sig til signalkrebs, hvilket også er tilfældet i mange andre europæiske lande (se fx Kozák m.fl. 2015; Chucholl 2016). I dele af Sydeuropa (især Spanien, Sydvestfrankrig og Italien) er Louisiana flodkrebs vidt udbredt (Kouba m.fl. 2014) og ofte den væsentligste skadevolder. Derfor er mange af de forsøg på bekæmpelse, der er udført i Europa, målrettet de to arter.

Internt i Nordamerika findes der en række eksempler på introduktion af ferskvandskrebs uden for deres naturlige udbredelsesområde, eksempelvis rustfarvet flodkrebs (*Orconectes rusticus*), der især er spredt som følge af dens anvendelse som agn ved lystfiskeri (Bajer m.fl. 2019).

Alle disse introduktioner af krebs med invasive effekter, har ikke så overraskende skabt behov for at prøve at fjerne eller bekæmpe de introducerede krebs og mange metoder er blevet forsøgt anvendt. Nogle metoder er anvendt i praksis, mens andre indtil videre kun er anvendt eksperimentelt. Der er lavet en række reviews over emnet (fx: Gheradi m.fl. 2011; Stebbing m.fl. 2014; Bajer m.fl. 2019; Manfrin m.fl. 2019). Der er i alle disse grundige reviews desværre enighed om, at der endnu ikke er udviklet en effektiv metode til bekæmpelse, der på samme tid er operativ, omkostningseffektiv og miljøvenlig.

Metoder til bekæmpelse kan overordnet opdeles i 1) mekaniske/fysiske, 2) biologisk og 3) kemiske metoder (flere steder opdeles metoderne i 5 kategorier, hvor 1) og 2) hver deles op i to (fx Skov m.fl. 2009)). I praksis har den ene eller anden opdeling ikke nogen betydning.

I det nedenstående gennemgås metoderne enkeltvis, baseret på de i litteraturen beskrevne eksempler og resultater. Sidst i afsnittet opsummeres metoderne samt deres styrker og svagheder i forhold til en række parametre og effekten til at opnå fuldstændig bekæmpelse (dvs. udryddelse) af en afgrænset population (Tabel 2).

Mekaniske / fysiske metoder

Enhver art kan indiskutabelt med det rette incitament, den rette indsats og teknologi efterstræbes så effektivt at arten overudnyttes og risikerer at uddø (Stebbing m.fl. 2014). Det er derfor nærliggende at afprøve om man ved at lægge et meget højt fisketryk på en bestand af ferskvandskrebs, bevidst kan overfiske bestanden til et niveau, der vil medføre at bestanden går til. Det er det ultimative mål for bekæmpelse af invasive arter, herunder krebs. Foruden fysisk fjernelse af individer, omfatter de mekaniske / fysiske metoder også modifikation af levestedets fysiske rammer.

Traditionelt fiskeri

Mange arter af ferskvandskrebs er en skattet delikatess, der fiskes til konsum både kommercielt og rekreativt. Der er derfor udviklet redskaber specielt målrettet dette fiskeri i form af små ruser eller tejer, der typisk udstyres med agn, der kan tiltrække krebsene. Samme grundlæggende teknik anvendes eksempelvis til fangst af krabber og hummer marint. Erfaringerne med den form for fiskeri er at man gennem en meget intensiv indsats kan reducere tætheden af krebs på en befisket strækning (Moorehouse m.fl. 2013; Stebbing m.fl. 2014). Men det kræver en meget høj fiskeriindsats, fx angiver Morehouse & Macdonald (2011), at der blev fisket med én fælde pr. 5 m i både længde- og tværretning i et vandløb (svarende til 42 fælder på en 100 m strækning). Herved lykkedes det, at nedbringe tætheden markant på 100 m forsøgsstrækninger. Berg m.fl. (2020) fandt i modsætning hertil en stigning i tæthed af signalkrebs i Alling Å gennem en 10-årig periode med bekæmpelsesfiskeri. Baseret på de tilgængelige data fra det frivillige bekæmpelsesfiskeri i Alling Å, var afstanden mellem ruserne i gennemsnit 49-92 m i åens længderetning (årligt gennemsnit, 2012-2016 brugt som eksempel), svarende til 1 - 2 ruser pr. 100 m. I et af de eksempler, hvor der er fundet reduktion i tætheden af krebs, er der med andre ord anvendt en tæthed af ruser, som var 20-40 gange større end i Alling Å. Det kræver således en betydelig indsats at opnå en reduktion i tæthed og åbenlyst en meget mere intensiv indsats end tilfældet var i Alling Å (Berg m.fl. 2020). Samtidig skal man foretage bekæmpelse i hele krebsens udbredelsesområde, for at undgå øget indvandring til det befiskede område (Morehouse & Macdonald 2011).

Fiskeri med traditionelle ruser er både køns- og størrelsesselektivt, hvor det generelt er de største individer og især de største hanner, der fanges mest effektivt (Freeman m.fl. 2010; Green m.fl. 2018). De traditionelle ruser på markedet er typisk indrettet, så små individer ikke tilbageholdes (Peay & Hiley 2001). I overensstemmelse hermed var fangst af signalkrebs < 7 cm fraværende ved monitoringsfiskeriet i Alling Å i 2008. Ved det tilsvarende fiskeri i 2018, hvor gennemsnitsstørrelsen på begge køn var faldet, blev der fanget enkelte (0,7 %) signalkrebs < 7 cm (Berg m.fl. 2020).

Da der er et meget tydeligt størrelseshierarki hos krebs, kan størrelsesselektivt fiskeri forbedre levevilkårene (hurtigere vækst, tidligere kønsmodning, øget fekunditet og nedsat dødelighed) hos de tilbageværende krebs (Stebbing m.fl. 2014). Ydermere kan disse ændringer hos den invasive art forstærke den negative effekt af arten på visse processer (fx nedbrydning af organisk materiale, bentisk primærproduktion) i økosystemet og på den måde modvirke genskabelse af en sund miljøtilstand, på trods af nedsat tæthed af den invasive art (Zavorka m.fl. 2020). Det er muligt, at konstruere fælder med mindre tremmeafstand el.lign., som er i stand til at tilbageholde mindre individer (Peay & Hiley 2001), men det er ikke givet at dette i sig selv kan formindske den negative påvirkning af økosystemet. Chadwick m.fl. (2020) angiver, at det til et givent tidspunkt, er en meget lille fraktion (ca. 2,5 %) af individerne i en bestand af signalkrebs, der er store nok til at blive tilbageholdt i standard ruser.

Stebbing m.fl. (2014) konkluderer, at intensivt bekæmpelsesfiskeri kun kan anvendes til at holde tætheden i en bestand nede, men man kan ikke opnå egentlig udryddelse med metoden. Et eksempel på et sted, hvor bekæmpelsesfiskeri er foretaget med succes, er Sparkling Lake, en 64 ha sø i Wiscon-

sin, USA. Her lykkedes det at nedbringe tætheden af rustfarvet flodkrebs med 99 % ved en kombination af rusefiskeri (2001-2008) og prædation fra søens naturlige rovfisk. For at fastholde et højt prædationstryk, blev der indført udvidede fredningsbestemmelser for rovfiskene i søen. Efter bekæmpelsen (2009-2018) er tætheden af rustfarvede flodkrebs forblevet lav, men bestanden er ikke endeligt udryddet (Hein 2019). Det skal bemærkes at Sparkling Lake er lidt usædvanlig for en sø i den størrelse, idet den hverken har til- eller afløb. Men på trods af dette, er den invasive art som sagt ikke udryddet. En stor fordel ved fiskeri med traditionelle krebsruser er en meget beskedne bifangst af andre arter. Samtidig kan andre krebs end mållarten normalt genudsættes uskadt (Berg m.fl. 2020).

Manuel fjernelse

Målrettet fiskeri med ketsjer eller lignende typer af net, er blevet anvendt som supplement til fiskeri med traditionelle ruser. Formålet er dels at øge effektiviteten generelt og dels mere specifikt efterstræbe de mindre størrelser af krebs, der ikke fanges i ruser (Peay 2001; Iversen m.fl. 2011).

Ligesom fiskeri med ketsjer, er manuel fjernelse (med hånden) ved direkte eftersøgning blevet anvendt i en række bekæmpelsesforsøg (Peay 2001; Peters m.fl. 2008).

I begge tilfælde er manuel fjernelse af krebs en meget arbejdstung metode, der hidtil ikke har vist de positive effekter, der var ønsket.

Elektrofiskeri

Ligesom manuel fjernelse, er elektrofiskeri blevet anvendt som bekæmpelsesmetode, både selvstændigt og som supplement til andre teknikker (Iversen m.fl. 2011). I lighed med manuel fjernelse, er elektrofiskeri en arbejdstung metode, der hidtil ikke har vist sig mere effektiv end eksempelvis rusefiskeri (Stebbing m.fl. 2014). Effektiviteten af elektrofiskeri afhænger endvidere altid af størrelsen (bredden), vanddybden og graden af klarhed i det vandløb, der fiskes i. Elektrofiskeri vil derfor som udgangspunkt kun være effektivt (men stadig arbejdstungt) i små, lavvandede og klare vandløb (Gheradi m.fl. 2011; Stebbing m.fl. 2014). Endvidere er krebs meget mindre forudsigelige end fisk i deres bevægelsesmønster (krebs "svømmer" baglæns ved slag med halen) i et elektrisk felt, hvilket nedsætter effektiviteten.

I et lille engelsk vandløb, er det forsøgt at udføre udryddelse ved at udlægge 7 m elektroder på langs af vandløbet og tilføre meget høj spænding (96 KW, 1600 V, 57,8 A jævnstrøm i 2-minutters pulser med 25 min pause imellem, i alt 98 min med spænding på). Dette medførte en 86 % dødelighed for signalkrebs. Øget tidsrum med spænding, øgede også dødeligheden (Peay m.fl. 2015). Da metoden er ikke-selektiv, vil den dog være meget indgribende i forhold til det samlede økosystem (Peay m.fl. 2015; Manfrin m.fl. 2019).

Fysisk habitat modificering

Modificering af levesteder, hvor invasive krebs optræder, med det formål at gøre dem uegnet/utilgængelige for krebsene, er en anden form for bekæmpelse (Stebbing m.fl. 2014).

Udtørring

Tørlægning af søer med invasive krebs, er anvendt flere steder (Iversen m.fl. 2011; Stebbing m.fl. 2014; Simberloff 2020). Det har dog i praksis vist sig at være svært at undgå at krebs overlever udtørring, da krebsene kan klare sig meget længe (måneder) i huler i fugtig jord, også i perioder med lave (ned til -20 °C) temperaturer ((Kozak & Policar 2003). I Alling Å blev tre små søer i tilløbet Skader Å tørlagt, oprenset og efterladt udtørrede i 2 måneder vinteren over uden den ønskede udryddelse blev opnået (Iversen m.fl. 2011). Peay and Hiley (2001) rapporterede ligeledes at udtørring og efterfølgende opgravning af sediment ikke kunne udrydde en bestand af signalkrebs.

Tørlægning af søer samt evt. fjernelse af sediment, kan således ikke i sig selv garantere udryddelse af en bestand af invasive krebs, men en sådan behandling vil normalt decimere bestanden betydeligt (Freeman m.fl. 2010). Derfor anbefales permanent tørlægning, evt. ved opfyldning, for at være sikker på fuldstændig udryddelse (Peay m.fl. 2019).

I vandløb er længerevarende tørlægning, grundet den kontinuerte tilførsel af vand, væsentligt vanskeligere end i søer og dermed forbundet med betydelige praktiske udfordringer og formentlig tilsvarende udgifter. Tørlægning af korte strækninger af vandløb og indsamling af alle synlige krebs, er blevet anvendt med henblik estimering af bestanden (Peay 2001). I forlængelse af en alvorlig tørke i England, hvor floden Misbourne var stort set udtørret i flere uger, blev der fundet signalkrebs, som havde overlevet (Freeman m.fl. 2010). En planlagt udtørring skal med andre ord være både meget effektiv og langvarig. Til fuldstændig bekæmpelse i praksis, må metoden på den baggrund betegnes som uegnet, også fordi den vil have betydelig negativ effekt på det omgivende økosystem.

Ødelæggelse af levesteder

Mange arter af ferskvandskrebs er afhængige af skjul for at undgå prædation. Dels på dagligt basis som skjul gennem døgnets lyse timer, men særligt i forbindelse med skalskifte, hvor krebsene er ekstra sårbare indtil den nye skal er hærdet. Hunner anvender desuden skjul i forbindelse med æglægning. Der er derfor gjort forsøg på at reducere tætheden af krebs ved at fratage dem muligheden for at søge skjul, primært for at gøre andre bekæmpelsestiltag, herunder prædation, mere effektive (Freeman m.fl. 2010). I enkelte tilfælde er det forsøgt at enten bortgrave brinker med huler inkl. de voksne krebs, der sidder i skjul (Skov m.fl. 2009) eller mure stensætningen i kanten af en dam til for at forhindre krebsene i at bruge mellemrummene mellem stene som skjul (Peay 1991). Metoden vurderes til at være meget invasiv over for det samlede økosystem og vil formentlig også være særdeles omkostningstung.

Spærringer

Spærringer med det formål at forhindre yderligere spredning i vandløb, er blevet anvendt med succes i bl.a. Californien og Schweiz (Kirby m.fl. 2005; Hefti & Stucki 2006), mens formålet ikke blev nået i Norge, hvor man forsøgte at forhindre signalkrebs fra Sverige i at brede sig ind i Norge (Johnsen m.fl. 2008). Teknikken er i sig selv ikke egentlig bekæmpelse af en etableret bestand, men et middel til at undgå en forværring af et problem gennem krebsens kolonisering af nye vandområder (Hefti & Stucki 2006; Stepping m.fl. 2014).

Biologisk kontrol

Biologisk kontrol kan ligesom fysisk bekæmpelse opdeles i en række teknikker med hver deres biologiske udgangspunkt, fra prædator kontrol til manipulation af kønsratio. Biologisk kontrol er endvidere det område, hvor der i dag arbejdes mest med udvikling af nye metoder, bl.a. ved anvendelse af molekylære teknikker. Nogle af disse teknikker ikke færdigudviklede og dermed endnu ikke operationelle.

Prædation

Bekæmpelse af invasive arter, herunder krebs, ved at øge prædationen på disse, er en umiddelbart logisk mulighed, ikke mindst fordi ferskvandskrebs har mange naturlige fjender (Kozak m.fl. 2015). Kan man påføre en invasiv art så stort prædationstryk at dette overstiger krebsenes reproduktionsevne, vil man få en negativ bestandsudvikling. Den form for bekæmpelse vil dog næppe medføre udryddelse, idet prædatoren med stor sandsynlighed vil ophøre med at efterstræbe et givent byttet når tætheden af det bliver tilstrækkelig lav. Men den invasive arts effekt på omgivelserne må i situationen antages at blive tydeligt reduceret. Hein (2019) har modelleret at rovfiskene i Sparkling Lake, Wisconsin,

i kombination med opfiskning, havde og fortsat har en betydelig andel i, at søens bestand af rustfarvet krebs blev reduceret markant i årene 2001-2008 og i en efterfølgende årrække (2009-2018) er forblevet på et lavt niveau.

Nedsat reproduktionssucces

Der er på flere forskellige måder arbejdet med at udvikle metoder, som har til formål at reducere reproduktionssucces hos invasive krebs, eksempelvis ved at fange, sterilisere og genudsætte et stort antal hanner, som herefter forgæves skal parre sig med hunner, med det formål at de lægger ubefrugtede æg (Hänfling m.fl. 2011). Radioaktiv bestråling har i et forsøg vist sig at nedsætte fertiliteten med over 50 % hos Louisiana flodkrebs (Manfrin m.fl. 2019). Bestråling med røntgen har også vist sig at kunne ændre vævet i gonaderne hos krebs. I en mindre sø i Norditalien har røntgenbestråling, i kombination med intensivt fiskeri med fælder, nedsat tætheden af Louisiana flodkrebs med ca. 87 % (Manfrin m.fl. 2019). Endelig er det forsøgt at fange og genudsætte hanner, efter at de har fået parringsorganerne fjernet, hvilket reducerer hannernes parringssucces markant (Manfrin m.fl. 2019). Kombinationen af ovennævnte og fjernelse af hunner i fangsten, kunne i en simuleret beregning af bekæmpelse i lukkede damme opnå fuld bekæmpelse efter en årrække, også ved en forventet delvis regenerering af parringsorganerne (Stebbing 2016). Det er dog ikke efterprøvet i praksis.

Genetiske og molekylære metoder

Der er flere nye, innovative metoder til bekæmpelse af invasive krebs under udvikling, som baserer sig på genetiske eller molekylære teknikker (Simberloff 2020).

Manipulation af kønsratio

Rationalet bag manipulation af kønsratio er, at man ved at øge antallet af det ene køn, kan forhindre eller nedsætte reproduktion (Simberloff 2020). Der er til akvakulturformål arbejdet med, gennem inaktivering af gener, at fremavle hunner, der kun producere hanligt afkom. Det mest prominente resultat er udvikling af rejer til akvakultur. Hvis den teknik kan overføres til vildtlevende populationer af krebs, vil man potentielt kunne udrydde en population i løbet af ganske få år. Teknikken er dog fortsat på udviklingsstadiet (Manfrin m.fl. 2019), men er en enkelt gang blevet testet med succes i både laboratorie og in situ (Hänfling m.fl. 2011). Patentering af den type metoder, kan være en økonomisk hindring for at udbrede disse teknikker til bekæmpelse af invasive arter (Simberloff 2020).

Til bekæmpelse af skadevoldende insekter mm, er der også forsket i at genmanipulere deres føde, så der ved indtagelse af fx afgrøder udløses en dødelig tilstand i skadevoldere. Den teknik vil kunne ramme andre arter, der udnytter fødeemnet.

Til bekæmpelse af invasive arter, er det også foreslået at CRISPR – teknologien kan tages i anvendelse. Et af de første eksempler er udvikling af en metode, der søger at fjerne vandremuslingens (*Dreissena polymorpha*) forsvar mod en overførbart cancer, metoden er dog endnu ikke afprøvet i praksis (Simberloff 2020).

Ved CRISPR-Cas9 teknik vil man kunne indbygge et destruktivt træk (fx forstyrret kønsratio, nedsat fertilitet, øget følsomhed over for kemikalier) i en art og herefter opdrætte og udsætte et stort antal individer med dette træk. Gennem en gendrevet kunstig selektion, kan det destruktive gen blive så udbredt at bestanden går til (Webber m.fl. 2015). I lighed med udsætning af andre genmanipulerede arter i naturen, er metoden etisk kontroversiel. Hvis den genmanipulerede art spredes til artens naturlige udbredelsesområde, vil det i yderste konsekvens kunne medføre, at arten kan uddø her og evt. globalt (Webber m.fl. 2015).

Feromoner

Brug af feromoner til bekæmpelse af insekter er vidt udbredt, typisk i form af de hunlige kønsferomoner, der tiltrækker hanner. Enten "forvirres" hannerne, så de ikke kan finde frem til hunnerne, eller også lokkes hannerne ind i fælder, hvor de tilbageholdes før de har parres sig. I begge tilfælde med det resultat at reproduktion forhindres.

Også ferskvandskrebs har kønsferomoner og enkelte er blevet isoleret (Stebbing m.fl. 2014). Et forsøg har vist, at kønsferomoner er i stand til at tiltrække hankrebs til en fælde i parringssæsonen, men feromoner tiltrak dog ikke lige så mange individer (både hanner og hunner) som en fælde med normal lokkemad (Aquiloni m.fl. 2009; Stebbing m.fl. 2014).

Virus, bakterier, svampe og parasitter

Der er endnu ikke udviklet metoder til at anvende patogene virus eller bakterier hos krebs til udryddelse af bestande (Stebbing m.fl. 2014). En kandidat som eksempelvis den dødelige hvidpletsyge, der forårsages af en virus, er ikke artsspecifik og vil dermed angribe hjemmehørende og invasive arter af krebs på lige fod (Stebbing m.fl. 2014). Mange bakterielt betingede sygdomme hos krebs er ligeledes opportunistiske og ikke arts-specifikke og dermed ikke egnede til bekæmpelse. Endvidere kan adskillige forårsage tarminfektioner hos mennesket, hvilket bør tages i betragtning grundet krebsens rolle som fødevarer (Stebbing m.fl. 2014). Det overvejes at bekæmpe karper (*Cyprinus carpio*) i Australien med den stærkt dødelige koi herpes virus, som netop er relativt artsspecifik (kan også ramme brasen (*Abramis brama*)) (Bajer m.fl. 2019). Fra forsøg med terrestriske dyr ved man dog at selv om dødeligheden kan være høj, vil en lille andel af populationen som oftest udvikle resistens, hvilket forhindrer fuldstændig udryddelse. Det forhold vil have betydning for effekten af infektioner som bekæmpelsesmetode.

Bortset fra den svamp/alge, *Aphanomyces astaci*, der forårsager krebsepest, findes der ikke andre svampe, der har så klar en patogen profil eller er arts-specifikke nok til at de kan anvendes som bekæmpelsesredskab. Det samme gør sig gældende for grupperne Mikrosporidiae (hvorunder porcelænssyge hører), Mesomycetozoa, Protista og Coccidia (Stebbing m.fl. 2014).

Kemisk bekæmpelsesmetoder

Sammen med varig udtørring/opfyldning af søer, er kemisk bekæmpelse med biocider den eneste i dag tilgængelige metode, hvormed man i praksis har opnået fuld udryddelse af bestande af invasive ferskvandskrebs (Peay m.fl. 2019).

Sandodden og Johnsen (2010) anvendte i 2008 med succes det syntetiske pyrethroid med handelsnavnet BETAMAX VET® (baseret på aktivstoffet cypermethrin) til bekæmpelse af signalkrebs i Dammane, et mindre vandløb i Syd Norge, der løber gennem 5 små damme på sin vej til havet. Der blev spredt BETAMAX VET® i dammene samt drypdoseret i vandløbet opstrøms dammene. Inden behandlingen blev de delvis tømt for vand. Et tilsvarende projekt blev udført i et sammenligneligt vandløb på øen Ostøya i Oslofjorden i 2009. I begge tilfælde blev der behandlet med BETAMAX VET® to gange med 14 dages mellemrum. I 2011 (Dammane) og 2017 (Ostøya) blev det konkluderet at bestandene af signalkrebs i begge tilfælde var blevet effektivt bekæmpet (Sandodden 2019).

Peay m.fl. (2019) syntetiserer erfaringerne fra 6 projekter i Storbritannien, 3 i Sverige og de 2 ovenfor beskrevne i Norge, hvor der er anvendt pyrethroider til bekæmpelse af signalkrebs i søer. De tre i Sverige, et vandingsreservoir og to tidligere stenbrud, er alle beliggende på Gotland, der - sammen med Öland - er udpeget til nationale safe-sites eller "reservater" for flodkrebs (Söderbäck & Edsman 1999).

Bekæmpelsen resulterede i udryddelse ved anvendelse af et syntetisk pyrethroid (baseret på aktivstoffet deltamethrin).

Konklusion bekæmpelse

Den samlede konklusion på syntesen i Peay m.fl. (2019) er, at:

- der i dag ikke findes andre operationelle metoder til komplet udryddelse af invasive krebs end 1) permanent fjernelse af levestedet (fx opfyldning af små søer) eller 2) bekæmpelse med biocider i form af syntetiske eller naturlige pyrethroider. Denne gruppe pesticider betegnes som mindre problematiske for miljøet end andre grupper af pesticider (carbamater, organofosfater o.l.), idet de nedbrydes lettere (Lidova m.fl. 2019). Man kan håbe på at der i fremtiden bliver udviklet bekæmpelsesmetoder, der er billige, effektive og uden alvorlige bivirkninger, men disse metoder findes ikke endnu.
- muligheden for med succes at bekæmpe invasive krebs med biocider afhænger af lokalitetens fysiske kompleksitet. Bedst er muligheden i små (< 2 ha) lukkede (uden til- og afløb) søer. Fuldstændig bekæmpelse skønnes mulig i små bække, men skal evalueres fra sag til sag, mens fuldstændig bekæmpelse i større vandløb og større søer med gennemstrømning, ikke anses for gennemførlig.
- bekæmpelse med pyrethroider har omfattende effekt på det øvrige dyreliv i bekæmpelsesområdet. Afhængig af det konkrete middel kan såvel invertebrater som padder og fisk blive alvorligt påvirket.

Om valg af biocid er konklusionen at:

- syntetiske pyrethroider har en højere toksicitet end naturlige og de kan derfor anvendes i lavere dosis.
- naturlige pyrethroider i form af udtræk fra *Chrysanthemum* sp., hurtigt nedbrydes af UV-stråling og ikke har toksiske nedbrydningsprodukter.
- syntetiske pyrethroider nedbrydes langsommere end naturlige.
- syntetiske pyrethroider synes at give større sikkerhed for ønsket effekt, muligvis grundet den langsommere nedbrydning, idet fuld udryddelse kræver en forholdsvis lang eksponeringstid (længde afhænger af dosis – interval 24-96 timer) (Lidova m.fl. 2019).

Tabel 1 opsummerer de ovenfor beskrevne metoder til bekæmpelse af invasive krebs. Som det fremgår af kolonnerne *effekt på omgivelserne* og *samlet effekt*, er der sammenhæng mellem disse to faktorer. De metoder som har den bedste effekt i forhold til bekæmpelse af den invasive art, har samtidig betydelig effekt på det omgivende økosystem.

Tabel 1. Opsummering af de ovenfor gennemgåede metoder med hensyn til styrker og svagheder. Vurdering i forhold til en række parametres betydning for metoden: **populationsstørrelse** (antal individer i den aktuelle population), **arealstørrelse** (dimensioner på den habitat populationen lever i), **artsspecificitet** (metodens evne til kun at ramme den ønskede art af krebs), **effekt på omgivelser** (potentielle bivirkninger på det omgivende økosystem), **tidsramme** (nødvendig udstrækning i tid for at opnå ønsket effekt), **udgiftsniveau** (for bekæmpelse) og **samlet effekt** (metodens evne til at opnå målet om faktisk udryddelse).

*: i forhold til et mål om fuldstændig bekæmpelse af målarten. Omarbejdet med udgangspunkt i Gheradi m.fl. (2011).

Metode	Populations- størrelse	Areal- størrelse	Arts- specificitet	Effekt på omgivelser	Tidsramme	Udgifts- niveau	Samlet effekt*
Fælder	+++	+++	+++	+	+++	+++	+(+)
Manuel fangst	+++	+++	+++	+	+++	+++	+
Elektrofiskeri	+++	+++	++	++	+++	+++	+
Udtørring	+	+	+	+++	+	+++	+++
Fjerne levested	-	+	+	++	++	+++	++
Fysisk barriere	-	+	++	++	+	++	+
Prædation	+++	++	+	++	+++	+	+
Nedsat reproduktion	-	+	+++	+	+++	++	?
Manipuleret kønsratio	+	+	+++	+	+++	++	?
Feromoner	-	++	+++	+	+++	+	+
Virus, bakterier mm	-	-	+++	+	+	+	(?)
Syntetiske pyrethoider	-	++	+	+++	+	++	+++
Naturlige pyrethoider	-	++	+	++	+	++	+++

Faktorens betydning, effekt mm: + lav, ++ medium, +++ høj, - ikke relevant, ? ukendt.

Anvendt litteratur

- Aquiloni, L., Aldo Becciolini, A., Berti, R., Porciani, S., Trunfio, C. & Gherardi, F., 2009. Managing invasive crayfish: use of X-ray sterilisation of males. *Freshwater Biology* **54**: 1510–1519.
- Bajer P.G., Ghosal R., Maselko M., Smanski M.J., Lechelt J.D., Hansen G., Kornis M.S., 2019. Biological control of invasive fish and aquatic invertebrates: a brief review with case studies. *Management of Biological Invasions* **10**: 227-254.
- Berg, S. 2013. Signalkrebs – en ny og uvelkommen art på Bornholm. Natur på Bornholm nr. 11. Bug-Book Publishing, side 1-7.
- Berg, S., Pedersen. S., Pedersen, St.S., Vindum, K.E. & Ravn, H.D., 2020. Signalkrebs i Alling Å – udvikling 2008 til 2018. DTU Aqua rapport nr. 366-2020.
- Chadwick, D.D.A., Pritchard, E.G., Bradley, P., Sayer, C.D., Chadwick, M.A., Eagle, L.J.B. & Axmacher, J.C., 2020. A novel 'triple drawdown' method highlights deficiencies in invasive alien crayfish survey and control techniques. *Journal of Applied Ecology* 2020;00:1–11. DOI: 10.1111/1365-2664.13758.
- Chucholl, C., 2016. The bad and the super-bad: prioritizing the threat of six invasive alien to three imperilled native crayfishes. *Biological Invasions* **18**: 1967–1988.
- Filipe, A.F., Quaglietta, L., Ferreira, M., Magalhães, M.F. & Beja, P., 2017. Geostatistical distribution modelling of two invasive crayfish across dendritic stream networks. *Biological Invasions* **19**: 2099-2112.
- Freeman M.A., Turnbulla, J.F., Yeomans, W.E. & Bean, C.W., 2010. Prospects for management strategies of invasive crayfish populations with an emphasis on biological control. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **20**: 211–223.
- Gherardi, F., Aquiloni, L., Diéguez-Urbeondo, J. Tricarico, E., 2011. Managing invasive crayfish: is there a hope? *Aquatic Science* **73**: 185-200.
- Green N., Bentley, M., Stebbings, P., Andreou, D. & Britton, R., 2018. Trapping for invasive crayfish: comparisons of efficacy and selectivity of baited traps versus novel artificial refuge traps. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems* **419**, 15.
- Hefti, D. & Stucki, P., 2006. Crayfish management for Swiss waters. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **380-382**: 937-950.
- Herrmann, A., Schnabler, A. & Martens, A., 2018. Phenology of overland dispersal in the invasive crayfish *Faxonius immunis* (Hagen) at the Upper Rhine River area. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems* **419**, 30. <https://doi.org/10.1051/kmae/2018018>.
- Hein, C.L., Vander Sanden, J. & Magnuson, J.J., 2007. Intensive trapping and increased fish predation cause massive population decline of an invasive crayfish. *Freshwater Biology* **52**: 1134-1146.
- Hein, C.L., 2019. Rusty crayfish in Sparkling Lake 18 years after a removal experiment. Conference presentation. *41st Annual Wisconsin Lakes Partnership Convention*, 10.-12. April 2019, Stevens Point, Wisconsin, USA. (dato tilgæet: 23.11.2020).
- Hänfling, B., Edwards, F. & Gherardi, F., 2011. Invasive alien Crustacea: dispersal, establishment, impact and control. *BioControl* **56**: 573-595.

- Iversen, K., Vindum, K.E. & Hansen, M., 2011. Bekæmpelse af signalkrebs i Alling Å-systemet. Danmarks Center for Vildlaks.
- Jespersen, H., Rasmussen, G. & Pedersen, S., 2021. Severity of summer drought as predictor for smolt recruitment in migratory brown trout (*Salmo trutta*). *Ecology of Freshwater Fish* **30**: 115-124.
- Kerby, J.L.; Riley, S.P.D.; Kats, L.B.; Wilson, P. Barriers and flow as limiting factors in the spread of an invasive crayfish (*Procambarus clarkii*) in southern California streams. *Biological Conservation* **126**: 402–409.
- Kouba, A., Petrusek, A. & Kozák, P., 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **413**, 05. DOI: 10.1051/kmae/2014007.
- Kozak, P. & Policar, T., 2003. Practical elimination of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) from a pond. In: Holdich DM, Sibley PJ (eds.) *Management & conservation of crayfish*. Proceedings of a conference held on 7th November, 2002. Environment Agency, Bristol, UK, pp 200–208.
- Kozak, P., Ďuriš, Z., Petrusek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková-Balcarová, E. & Policar T., 2015. Crayfish Biology and Culture. University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters.
- Lidova, J., Buric, M., Kouba, A. & Velisek, J. 2019. Acute toxicity of two pyrethroid insecticides for five non-indigenous crayfish species in Europe. *Veterinarni Medicina* **64**: 125–133
- Manfrin, C., Souty-Grosset, C., Anastácio, P.M., Reynolds, J., & Giulianini, P.G., 2019 Detection and Control of Invasive Freshwater Crayfish: From Traditional to Innovative Methods. *Diversity* **11**, 5; doi:10.3390/d11010005
- McArdle, B.H., 1990. When Are Rare Species Not There? *Oikos* **57**: 276-277.
- Miljøstyrelsen, 2020. Invasive arter i EU. <https://mst.dk/natur-vand/natur/national-naturbeskyttelse/invasive-arter/de-invasive-arter/invasive-arter-i-eu/>. Dato tilgæet: 14.12.2020.
- Peay, S., 2001. Eradication of alien crayfish populations. *R&D Technical Report W1-037/TR1*. Environment Agency and English Nature.
- Peay S., & Hiley, P.D., 2001. Eradication of alien crayfish. Phase II. Environment Agency Technical Report W1–037/TR1. Bristol: Environment Agency, 118 pp.
- Peay, S., Hiley, P.D., Collen, P. & Martion, I., 2006. Biocide treatment of ponds in Scotland to eradicate signal crayfish. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **380-382**: 1363-1379.
- Söderbäck, B. & Edsman, L., 1999. Åtgärdsprogram för bevarande av Flodkräfta. Redaktion: Järvi, T. & Thorell, L.G. Fiskeriverket och Naturvårdsverket.
- Peay, S., Dunn, A., Kunin, W.E., Mckimm, R. & Harod, C., 2015. A method test of the use of electric shock treatment to control invasive signal crayfish in streams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **25**: 874–880.
- Peay, S., Johnson, S., Bean, C.W., Dunn, A.M., Sandodden, R. & Edsman, L., 2019. Biocide treatment of invasive signal crayfish: successes, failures, and lessons learned. *Diversity* **11**, 29: 1-26.
- Peters, J.A., Kreps, T. & Lodge, D.M., 2008. Assessing the Impacts of Rusty Crayfish (*Orconectes rusticus*) on Submergent Macrophytes in a North-Temperate U.S. Lake Using Electric Fences. *The American Midland Naturalist* **159**: 287-297

Sandodden, R., 2019. Eradication of invasive alien crayfish: past experiences and further possibilities. I: C.R. Veitch, M.N. Clout, A.R. Martin, J.C. Russell & C.J. West (red.): *Island invasives: scaling up to meet the challenge. Occasional Paper SSC no. 62*. Gland, Switzerland: IUCN, 405–409.

Sandodden, R. & Johnsen, S.I., 2010. Eradication of introduced signal crayfish *Pasifastacus leniusculus* using the pharmaceutical BETAMAX VET. *Aquatic Invasions* **5**: 75-81.

Simberloff, D., 2020. Maintenance management and eradication of established aquatic invaders. *Hydrobiologia*, (Early Access: AUG 2020). DOI: 10.1007/s10750-020-04352-5.

Skov, C., Sivebæk, F., Aarestrup, K., Vrålstad, T., Hansen, P. G. & Berg, S., 2009. Udbredelse og bekæmpelse af signalkrebs i Alling Å. Pilotprojekt og anbefaling til fremtidige tiltag. DTU Aqua, Sektion for Ferskvandsfiskeri.

Stebbing, P., McPherson, N. Ryder, D. & Jeffery, K., 2016. Controlling invasive crayfish, managing signal crayfish populations in small, enclosed water bodies. *Report C5775*. Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (Cefas).

Stebbing, P., Longshaw M. & Scott, A., 2014. Review of methods for the management of non-indigenous crayfish, with particular reference to Great Britain. *Ethology, Ecology & Evolution* **26**: 204-231.

Zavorka, L., Lassus, R., Britton, J.R. & Cucherousset, J., 2020. Phenotypic responses of invasive species to removals affect ecosystem functioning and restoration. *Global Change Biology* **26**: 5693–5704.

Webber, B.L., Raghuc, S., Owain R. & Edwards, O.R., 2015. Opinion: Is CRISPR-based gene drive a biocontrol silver bullet or global conservation threat? *PNAS* **112**: 10565–10567.

Bilag 9: Oversigt over samtlige qPCR testresultater

Tabeller med information omkring de individuelle qPCR kørsler fra alle stationer med positiv detektion af krebs og krebspest. Informationerne inkluderer ud over generelle informationer omkring lokaliteten relevante data omkring qPCR analyserne herunder blandt andet antallet af positive reaktioner, Ct-gennemsnit af positive reaktioner og ct-range. Datakolonnen 'Inhibering' repræsenterer resultaterne af IPC analyserne. Prøver med observeret inhibering blev fortyndet før analyse (se rapport). Felter med 2 tal adskilt med komma repræsenterer prøver med ct-værdier ≥ 41 . Her repræsenterer tallene hhv. resultater af den første analyse og dernæst genanalyse af prøven fortyndet 1:10. Såkaldt 'Limit of detektion' (LOD) og 'limit of quantification' (LOQ) er udregnet ud fra de observerede ct-værdier og er baseret på analyse af reaktioner med kendt kopiantal (Ellison et al. 2006). I denne sammenhæng dækker værdier over LOQ koncentrationer (Gennemsnitlig antal kopier per qPCR), som med høj sikkerhed kan kvantificeres, og værdier over LOD koncentrationer med semi-quantitativbestemmelse. En kvantitativ analyse er dog ikke indgået i rapporten. Her er fokus på påvisning af eDNA. Her blev benyttet en ct-værdi < 41 brugt som sikker (konstateret) påvisning af eDNA, mens ct-værdier ≥ 41 betegnes som ikke konklussive. For signalkrebs blev der benyttet to forskellige detektionssystemer, og stationer med positiv detektion for begge systemer er ligeledes betegnet som sikker og kategoriseret som konstateret. ID = ingen data. Koncentrationsestimater er kun vist når de estimerede koncentrationer var over LOD for minimum et af de tre qPCR replikater. For signalkrebs er LOD/LOQ kun vist for detektionssystem #2.

A. Flodkrebs

Vandsystem nr.	Vandløb	Bredde (UTM)	Længde (UTM)	Dato	Prøve ID	Filtreret vandvolumen (L)	Inhibering	Antal positive reaktioner	Gnm Ct-værdi	Ct-range	Gnm kopier per qPCR	\geq LOD	\geq LOQ	Konstateret	Ikke konklusiv
1504	Alling Å	56'27.8743	10'19.0773	06-07-2020	K0042	3,6	Ingen	1/3, 0/3	44,93, ID	44,93, ID	ID, ID	NEJ, ID	NEJ, ID		1
2909	Brede Å	55'6.7612	8'43.8954	09-09-2020	K0306	5	Ingen	1/3, 0/3	48,27, ID	48,27, ID	ID, ID	NEJ, ID	NEJ, ID		1
1012	Brende Å	55'22.1209	10'0.3724	01-07-2020	K0202	5	Ingen	2/3	41,63	39,77-43,48	0,31	JA (1)	JA (1)	1	
1012	Brende Å	55'22.3110	9'54.8090	01-07-2020	K0226	3,85	Ingen	3/3	36,27	35,45-37,1	7,56	JA (2)	JA (2)	1	
1012	Brende Å	55'21.5556	9'52.5044	01-07-2020	K0228	4,2	Ingen	3/3	36,24	35,69-36,52	7,20	JA (1)	JA (1)	1	
1307	Bygholm Å	55'52.3563	9'45.2720	21-09-2020	K0390	5	Ingen	1/3	40,24	40,24	ID	NEJ	NEJ	1	
0105	Byå	55'6.6002	14'42.0453	30-06-2020	K0420	5	Ingen	3/3	30,63	30,53-30,71	316,21	JA	JA	1	
2506	Damhus Å	56'20.8397	8'18.2119	23-08-2020	K0176	5	Ingen	1/3, 1/3	41,83/39,54	41,83/39,54	ID/3,10	NEJ/JA	NEJ/NEJ	1	
0334	Elverdamsåen	55'38.0612	11'47.5623	08-09-2020	K0528	5	Ingen	3/3	33,06	32,95-33,25	60,07	JA	JA	1	

2611	Falen å	55'47.2735	8'27.2083	25-08-2020	K0260	5	Ingen	1/3, 0/3	41,75, ID	41,75, ID	ID, ID	NEJ, ID	NEJ, ID		1
1626	Gerå	57'06.9700	10'09.9303	15-07-2020	K0018	5	Ingen	2/3	35,50	35,12-35,16	20,33	JA	JA	1	
1626	Gerå	57'07.1144	10'22.6141	15-07-2020	K0021	5	Ingen	3/3, 0/3	43,52, ID	43,01-43,89, ID	ID, ID	NEJ, ID	NEJ, ID		1
1626	Gerå	57'06.5788	10'16.7847	15-07-2020	K0039	5	Ingen	3/3	37,67	37,55-38,61	2,98	JA	NEJ	1	
0306	Græse Å	55'51.0182	12'05.5160	30-08-2020	K0489	5	Inhibering	2/3	39,61	38,55-40,67	1,62	JA (1)	NEJ	1	
1506	Gudenå	56'00.8263	9'41.8574	03-07-2020	K0626	3,9	Ingen	3/3	36,78	36,16-37,88	6,60	JA (2)	JA (2)	1	
1506	Gudenå	55'58.5246	9'41.8487	03-07-2020	K0627	4	Ingen	3/3	33,27	32,99-33,47	64,80	JA	JA	1	
0419	Halleby Å / Åmose Å (5)	55'34.4053	11'35.3797	12-09-2020	K0529	4,4	Ingen	3/3	35,86	35,26-36,79	9,01	JA	JA	1	
0942	Hattebæk	55'9.6104	10'8.4124	25-06-2020	K0641	2,65	Ingen	1/3, 0/3	45,49, ID	45,49, ID	0,02, ID	NEJ, ID	NEJ, ID		1
0305	Havelse Å (2)	55'53.9875	12'09.0764	30-08-2020	K0497	5	Ingen	3/3	35,17	34,72-35,57	19,01	JA	JA	1	
0305	Havelse Å (3)	55'53.6853	12'12.7888	30-08-2020	K0467	5	Ingen	3/3, 2/3	47,64/40,06	46,55-49,46/38,99-41,12	ID/2,082	NEJ/JA (1)	NEJ/NEJ	1	
2309	Hellegård Å	56'28.3460	8'43.5098	18-08-2020	K0168	5	Ingen	3/3	36,60	35,72-37,44	11,06	JA	JA (1)	1	
0937	Hundstrup Å	55'3.9450	10'22.3508	25-06-2020	K0650	5	Ingen	2/3	38,17	37,98-38,36	1,64	JA	NEJ	1	
1018	Hårby Å	55'11.5670	10'6.1624	29-06-2020	K0640	4,55	Ingen	3/3	36,06	35,27-36,51	10,32	JA	JA	1	
2208	Jordbro Å	56'33.1355	9'13.3954	07-08-2020	K0105	5	Ingen	2/3	38,18	38,01-38,34	2,22	JA	NEJ	1	
2303	Karup å	56'11.5504	9'15.8780	25-06-2020	K0621	2,05	Ingen	3/3	39,58	38,31-40,53	0,76	JA (1)	NEJ	1	
2303	Karup å	56'16.7818	9'11.5789	25-06-2020	K0632	2	Ingen	1/3	40,21	40,21	ID	NEJ	NEJ	1	
1205	Kolding Å	55'29.7858	09'26.1820	22-07-2020	K0221	3,5	Ingen	2/3	42,63	39,44-45,82	0,37	JA (1)	JA (1)	1	
1205	Kolding Å	55'30.0854	09'22.6435	22-07-2020	K0267	5	Ingen	3/3	39,18	38,03-39,79	ID	NEJ	NEJ	1	
0508	Køge Å (1)	55'27.4636	12'09.8273	28-07-2020	K0477	5	Ingen	3/3	35,06	34,71-35,38	11,25	JA	JA (2)	1	
1818	Lerbæk	57'5.8374	9'58.0930	28-07-2020	K0144	5	Ingen	2/3	38,64	38,38-38,89	2,07	JA	NEJ	1	
1736	Liver Å	57'31.0035	9'53.8668	18-07-2020	K0056	5	Ingen	1/3, 0/3	45,77, ID	45,77, ID	ID, ID	NEJ, ID	NEJ, ID		1

0211	Nivå	55'12.7729	11'51.9260	17-09-2020	K0516	5	Ingen	3/3	40,09	38,48-41,78	ID	NEJ	NEJ	1	
0912	Odense Å	55'23.9650	10'27.4730	07-07-2020	K0214	5	Ingen	3/3	39,49	38,69-39,98	0,76	JA (1)	JA (1)	1	
0912	Odense Å	55'19.9102	10'19.5814	07-07-2020	K0314	5	Ingen	3/3	34,40	34,29-34,61	29,78	JA	JA	1	
0912	Odense Å	55'11.9452	10'19.4492	07-07-2020	K0315	5	Ingen	3/3	36,33	36,18-36,43	7,97	JA	JA	1	
0912	Odense Å	55'13.8210	10'15.5550	07-07-2020	K0319	5	Ingen	3/3	38,39	37,53-39,08	ID	NEJ	NEJ	1	
0912	Odense Å	55'16.4642	10'14.3526	07-07-2020	K0325	5	Ingen	3/3	32,46	32,38-32,6	93,51	JA	JA	1	
0912	Odense Å	55'18.9830	10'17.5445	07-07-2020	K0328	5	Ingen	3/3	32,25	32,07-32,39	108,40	JA	JA	1	
0912	Odense Å	55'21.5396	10'22.5012	07-07-2020	K0637	5	Ingen	3/3	35,00	34,58-35,58	20,58	JA	JA	1	
0912	Odense Å	55'23.5511	10'23.2674	07-07-2020	K0644	5	Ingen	3/3	36,97	36,34-38,01	5,72	JA (2)	JA (2)	1	
1813	Rye Å	57'8.4689	9'42.4343	27-07-2020	K0051	5	Ingen	1/3	40,98	40,98	ID	NEJ	NEJ	1	
1813	Rye Å	57'12.9619	9'43.0861	27-07-2020	K0053	5	Ingen	3/3, 0/3	44,12, ID	42,27-46,89, ID	ID, ID	NEJ, ID	NEJ, ID		1
1813	Rye Å	57'10.1372	9'42.9805	27-07-2020	K0055	5	Ingen	2/3	39,98	38,74-41,21	1,14	JA (1)	NEJ	1	
1813	Rye Å	57'16.2792	9'46.9777	27-07-2020	K0070	5	Ingen	2/3, 1/3	46,22/39,77	46,09-46,35/39,77	ID/2,68	NEJ/JA	NEJ/NEJ	1	
1813	Rye Å	57'15.6530	9'52.9724	27-07-2020	K0090	5	Ingen	2/3, 0/3	48,27, ID	47,49-49,05, ID	ID, ID	NEJ, ID	NEJ, ID		1
2205	Skals Å	56'35.0915	9'39.5756	06-08-2020	K0114	3,6	Ingen	1/3	40,60	40,60	ID	NEJ	NEJ	1	
2205	Skals Å	56'34.3973	9'44.6713	06-08-2020	K0119	3,2	Ingen	2/3	39,24	38,62-39,86	1,18	JA (1)	NEJ	1	
2205	Skals Å	56'29.5273	9'51.2835	06-08-2020	K0148	5	Ingen	3/3	32,68	32,55-32,85	92,72	JA	JA	1	
1301	Skjold Å	55'46.2950	10'0.3019	21-09-2020	K0362	5	Ingen	2/3, 0/3	43,59, ID	43,35-43,83, ID	ID, ID	NEJ, ID	NEJ, ID		1
1212	Spang Å	55'36.0223	09'39.7905	21-07-2020	K0225	4,2	Ingen	3/3	39,02	38,01-40,79	1,29	JA (2)	JA (2)	1	
0911	Stavids Å	55'25.9373	10'17.5726	14-07-2020	K0229	5	Ingen	3/3	37,48	36,24-39,04	3,68	JA (3)	JA (3)	1	
0911	Stavids Å	55'24.9897	10'22.0053	14-07-2020	K0639	4,35	Ingen	2/3	39,77	39,78-39,99	ID	NEJ	NEJ	1	
0941	Stensgård Møllebæk	55'8.3860	10'9.8639	25-06-2020	K0636	1,6	Ingen	3/3	39,36	38,96-39,76	ID	NEJ	NEJ	1	

0927	Stokkebæk	55'9.7589	10'42.1147	06-07-2020	K0240	5	Ingen	1/3	39,33	39,43	ID	NEJ	NEJ	1	
0605	Tude Å (3)	55'29.9761	11'26.1565	22-07-2020	K0445	5	Ingen	3/3	36,72	35,39-38,80	56,91	JA	JA	1	
1731	Uggerby Å	57'26.9170	10'06.2123	17-07-2020	K0052	5	Ingen	3/3	38,30	37,61-39,04	2,45	JA	NEJ	1	
1731	Uggerby Å	57'28.2695	10'12.4911	17-07-2020	K0080	5	Ingen	1/3, 0/3	42,20, ID	42,20, ID	ID, ID	NEJ, ID	NEJ, ID		1
1731	Uggerby Å	57'30.1331	10'16.0597	17-07-2020	K0098	5	Ingen	1/3	38,97	38,45	1,89	JA	NEJ	1	
1216	Vejle Å	55'42.3035	09'30.0014	17-07-2020	K0231	5	Ingen	2/3, 0/3	44,54, ID	44,19-44,89, ID	ID, ID	NEJ, ID	NEJ, ID		1
1216	Vejle Å	55'41.3546	09'24.3261	21-07-2020	K0257	5	Ingen	3/3	43,08	40,81-46,01	ID	NEJ	NEJ	1	
1216	Vejle Å	55'39.0298	09'18.4349	21-07-2020	K0300	5	Ingen	1/3	38,82	38,82	ID	NEJ	NEJ	1	
3001	Vidå	54'57.2819	8'41.5317	09-09-2020	K0346	5	Ingen	3/3	38,02	37,12-38,52	2,09	JA	NEJ	1	
0923	Vindinge Å	55'20.8545	10'40.2008	08-07-2020	K0215	5	Ingen	3/3	36,00	35,85-36,52	7,71	JA (2)	JA (2)	1	
0923	Vindinge Å	55'18.4625	10'43.8167	08-07-2020	K0243	5	Ingen	3/3	34,59	34,14-34,97	22,24	JA	JA	1	
1220	Ørum Å	55'45.9020	09'46.7165	17-07-2020	K0213	4,3	Ingen	3/3	37,58	36,66-38,19	2,91	JA (3)	JA (3)	1	
1320	Århus Å	56'6.3882	10'0.9973	22-09-2020	K0385	5	Ingen	3/3	37,98	37,39-38,42	2,17	JA	NEJ	1	
Ø-navn	Sø	X	Y	Dato	Prøve ID	Filtreret vandvolumen (L)	Inhibering	Antal Positive	Gnm Ct-værdi	Ct-range	Gnm kopier	≥LOD	≥LOQ	Konstateret	Ikke konklusiv
Møn	Hunesø	725468,98	6098664,381	22-07-2021	K0601	2,0	Ingen	3/3	35,04	34,55-34,82	21,42	JA	JA	1	
Møn	Store Geddesø	725715,724	6097966,734	22-07-2021	K0603	2,0	Ingen	1/3	39,78	39,78	1,22	JA	NEJ	1	
Møn	Hunesø	725467,167	6098533,704	22-07-2021	K0610	2,0	Ingen	1/3	41,21	41,21	ID	NEJ	NEJ		1

B. Signalkrebs

Vandsystem nr.	Vandløb	Bredde (UTM)	Længde (UTM)	Dato	Prøve ID	Filtreret vandvolumen (L)	Inhibering	Antal positive reaktioner	Gnm Ct-værdi	Ct-range	Gnm kopier	≥LO D	≥LO Q	Detekteret med assay 1	Konstatet	Ikke konklusiv
1504	Alling Å	56'25.1673	10'19.2832	06-07-2020	K0013	4	Ok	3/3	47,21	46,19-48,26	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1504	Alling Å	56'23.7316	10'12.4178	06-07-2020	K0017	3,8	Fortyndet 1:10	3/3	35,26	34,86-35,8	ID	ID	ID	JA	1	
1504	Alling Å	56'27.8743	10'19.0773	06-07-2020	K0042	3,6	Ok	1/3	49,78	49,78	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1504	Alling Å	56'22.9248	10'05.0779	06-07-2020	K0044	3,7	Fortyndet 1:10	3/3	35,05	34,96-35,23	17,06	JA	JA	JA	1	
0303	Arrenakke Åsystem	55'12.7682	11'51.9318	30-08-2020	K0496	5	Ok	2/3	45,84	45,49-46,19	ID	NEJ	NEJ	NEJ		1
1229	As-Rårup Skelbæk	55'43.9393	09'59.7686	17-07-2020	K0211	5	Ok	3/3	41,53	39,53-43,2	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1708	Bangsbo Å	57'24.0787	10'28.5201	16-07-2020	K0060	5	Ok	3/3	47,17	46,92-47,61	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1012	Brende Å	55'22.1209	10'0.3724	01-07-2020	K0202	5	Ok	2/3	47,47	47,47	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0334	Elverdamsåen	55'38.0612	11'47.5623	08-09-2020	K0528	5	Ok	3/3	43,53	42,26-45,43	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0519	Faxe Å	55'14.3320	12'07.0282	02-08-2020	K0460	5	Ok	3/3	39,33	39,29-39,35	1,66	JA	NEJ	JA	1	
0625	Fladså (2)	55'11.2004	11'53.3998	27-07-2020	K0455	4,5	Ok	3/3	48,81	48,6-49,01	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2504	Flynder Å	56'24.6387	8'18.5969	22-08-2020	K0159	5	Fortyndet 1:10	3/3	39,38	38,57-40,77	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2503	Fåremølle Å	56'25.7708	8'11.5218	22-08-2020	K0157	5	Ok	3/3	42,87	42,31-43,42	ID	NEJ	NEJ	JA	1	

0915	Geels Å	55'25.9575	10'31.5914	14-07-2020	K0239	5	Fortyndet 1:10	1/3	40,41	40,41	0,52	JA	NEJ	JA	1	
1317	Giber Å	56'4.9057	10'13.9410	22-09-2020	K0352	5	Fortyndet 1:10	ID	ID	ID	ID	ID	ID	JA		1
1417	Grenå	56'23.3788	10'44.0082	07-07-2020	K0006	4,8	Ok	3/3	44,93	43,63-46,24	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1417	Grenå	56'23.8676	10'42.8777	07-07-2020	K0022	1,2	Inhibering	1/3	41,79	41,79	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1417	Grenå	56'24.6752	10'51.4638	07-07-2020	K0047	3,9	Ok	3/3	41,50	40,97-42,14	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0940	Grubbemølle Å	55'7.7896	10'10.7621	25-06-2020	K0648	5	Fortyndet 1:10	1/3	39,93	39,93	0,71	JA	NEJ	JA	1	
1506	Gudenå	56'23.6301	9'47.6325	04-07-2020	K0005	3,7	Ok	3/3	38,87	37,96-40,47	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1506	Gudenå	56'17.8311	9'40.2455	03-07-2020	K0007	4	Ok	3/3	41,68	38,92-45,35	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1506	Gudenå	56'25.9340	9'57.9428	04-07-2020	K0023	4,1	Ok	3/3	39,50	38,9-40,6	1,02	JA (2)	NEJ	JA	1	
1506	Gudenå	56'23.5713	9'54.4679	04-07-2020	K0049	3,8	Ok	3/3	39,31	38,86-39,55	1,05	JA (1)	NEJ	JA	1	
1208	Gudsø Bæk	55'31.9032	09'35.1315	21-07-2020	K0248	5	Fortyndet 1:10	3/3	45,98	42,68-48,4	0,04	JA	NEJ	JA	1	
1207	Gudsø Å	55'31.8336	09'34.5997	22-07-2020	K0253	5	Fortyndet 1:10	ID	ID	ID	ID	ID	ID	JA		1
2802	Guldager Møllebæk	55'30.7076	8'22.7440	01-09-2020	K0274	5	Ok	3/3	41,75	41,39-42,44	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1901	Halkær Å	56'53.1716	9'33.9176	16-08-2020	K0188	5	Fortyndet 1:10	1/3	46,57	46,57	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0419	Halleby Å / Åmose Å (2)	55'33.8481	11'11.8916	11-09-2020	K0518	5	Ok	2/3	42,91	42,82-43	ID	NEJ	NEJ	JA	1	

1308	Hansted Å	55'53.0618	9'49.5830	21-09-2020	K0354	5	Fortyndet 1:10	1/3	39,11	39,11	1,21	JA	NEJ	JA	1	
0521	Herredsbæk	55'14.3369	12'07.0316	02-08-2020	K0498	3,5	Ok	3/3	42,96	42,67-43,45	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1401	Hulbæk	56'17.3463	10'22.7408	07-07-2020	K0032	4,2	Ok	1/3	45,33	45,33	ID	NEJ	NEJ	NEJ		1
2303	Karup å	56'22.6687	9'04.4768	25-06-2020	K0617	1,85	Fortyndet 1:10	3/3	38,59	37,97-39,21	1,46	JA	NEJ	JA	1	
2303	Karup å	56'24.4192	9'00.4698	25-06-2020	K0618	1,65	Fortyndet 1:10	3/3	35,26	34,86-35,8	ID	ID	ID	JA	1	
2303	Karup å	56'20.7871	9'06.3680	25-06-2020	K0619	1,87	Fortyndet 1:10	ID	ID	ID	ID	ID	ID	JA		1
2303	Karup å	56.32.2323	8'59.8407	25-06-2020	K0620	1,85	Inhibering	3/3	36,66	36,16-37,55	3,44	JA	NEJ	JA	1	
2303	Karup å	56'14.8577	9'11.4484	25-06-2020	K0623	2	Ok	1/3	48,83	48,83	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2303	Karup å	56'18.3724	9'09.3031	25-06-2020	K0625	1,8	Fortyndet 1:10	2/3	39,80	38,69-40,9	0,99	JA	NEJ	JA	1	
2303	Karup å	56'27.7104	8.59.0684	25-06-2020	K0630	1,8	Inhibering	3/3	37,79	37,27-38,55	1,23	JA (2)	NEJ	JA	1	
2303	Karup å	56'16.7818	9'11.5789	25-06-2020	K0632	2	Ok	2/3	48,71	48,37-49,05	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1604	Kastbjerg Å	56 41.3225	10 6.1611	13-07-2020	K0030	4,7	Fortyndet 1:10	ID	ID	ID	ID	ID	ID	JA		1
2105	Klostermølle Å (Fold Å)	56'32.9020	8'29.4082	18-08-2020	K0184	5	Ok	3/3	35,82	35,62-36,2	9,30	JA	JA (2)	JA	1	
1205	Kolding Å	55'29.7858	09'26.1820	22-07-2020	K0221	3,5	Ok	1/3	47,78	47,78	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2808	Konge å	55'24.4796	8'53.1227	02-09-2020	K0304	3,6	Ok	2/3	47,05	46,71-47,39	ID	NEJ	NEJ	JA	1	

2808	Kongeå	55'26.3840	8'59.8331	02-09-2020	K0309	3,8	Fortyndet 1:10	2/3	39,92	38,3-41,54	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2808	Kongeå	55'29.4328	9'8.1892	02-09-2020	K0316	5	Fortyndet 1:10	3/3	38,50	38,12-38,83	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2808	Kongeå	55'26.5934	9'8.2006	02-09-2020	K0318	3,4	Ok	3/3	46,82	45,6-48,23	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0508	Køge Å (1)	55'27.4636	12'09.8273	28-07-2020	K0477	5	Ok	3/3	50,00	50,00	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1817	Lindholm Å	57'6.8938	9'55.0102	28-07-2020	K0111	0,5	Inhibering	3/3	36,67	36-37,58	4,21	JA (2)	NEJ	NEJ	1	
1817	Lindholm Å	57'12.9350	9'54.6736	28-07-2020	K0123	1,2	Inhibering	3/3	39,27	38,11-40,07	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1817	Lindholm Å	57'5.0136	9'53.5826	28-07-2020	K0134	1,2	Inhibering	3/3	34,41	34,07-34,9	19,14	JA	JA	JA	1	
1817	Lindholm Å	57'9.6428	9'54.8862	28-07-2020	K0136	1,8	Inhibering	3/3	38,57	37,54-39,8	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2136	Lyngbro Bæk	56'49.3923	8'40.2670	17-08-2020	K0186	5	Fortyndet 1:10	ID	ID	ID	ID	ID	ID	JA		1
0132	Melsted Å	55'12.0919	14'58.8124	03-07-2020	K0412	5	Ok	2/3	45,77	45,12-46,42	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0531	Mern Å	55'01.9183	12'06.1689	05-08-2020	K0487	5	Ok	3/3	33,87	33,43-34,23	40,67	JA	JA	JA	1	
0912	Odense Å	55'16.4642	10'14.3526	07-07-2020	K0325	5	Ok	1/3	44,26	44,26	ID	NEJ	NEJ	NEJ		1
1014	Pugemølle Å	55'19.2739	9'54.2096	29-06-2020	K0635	5	Ok	1/3	49,11	49,11	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1014	Pugemølle Å	55'19.4743	10'0.2024	29-06-2020	K0643	1,55	Ok	1/3	49,20	49,2	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2502	Ramme Å	56'27.1193	8'7.8220	22-08-2020	K0190	5	Ok	3/3	41,80	40,71-43,1	ID	NEJ	NEJ	JA	1	

2902	Ribe Å	55'18.9611	8'55.8448	07-09-2020	K0303	5	Ok	3/3	45,86	44,58-46,73	ID	NEJ	NEJ	JA		1
2902	Ribe Å	55'17.5157	9'8.6940	07-09-2020	K0310	5	Ok	3/3	41,09	40,55-41,6	0,52	JA (1)	NEJ	JA	1	
2902	Ribe Å	55'18.3124	8'57.8677	07-09-2020	K0313	5	Ok	2/3	49,36	49,16-49,56	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2902	Ribe Å	55'19.9554	8'42.0946	07-09-2020	K0333	5	Ok	2/3	47,46	46,45-48,47	ID	NEJ	NEJ	NEJ	1	
2902	Ribe Å	55'18.0900	9'14.5192	07-09-2020	K0334	5	Ok	1/3	49,02	49,02	ID	NEJ	NEJ	NEJ		1
2902	Ribe Å	55'17.7434	9'3.4426	07-09-2020	K0335	5	Ok	3/3	46,05	45,17-45,78	ID	NEJ	NEJ	JA		1
2902	Ribe Å	55'19.1322	8'50.8720	07-09-2020	K0340	5	Fortyndet 1:10	ID	ID	ID	ID	ID	ID	JA	1	
1222	Rosenvold Å	55'41.0743	09'49.3452	17-07-2020	K0237	2,5	Fortyndet 1:10	3/3	37,00	36,47-37,97	5,25	JA	NEJ	JA	1	
1813	Rye Å	57'12.9619	9'43.0861	27-07-2020	K0053	5	Fortyndet 1:10	ID	ID	ID	ID	ID	ID	JA		1
1813	Rye Å	57'10.1372	9'42.9805	27-07-2020	K0055	5	Ok	1/3	50,00	NA	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1813	Rye Å	57'12.7078	10'1.6487	27-07-2020	K0058	5	Ok	3/3	48,28	47,87-48,92	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1813	Rye Å	57'16.2792	9'46.9777	27-07-2020	K0070	5	Fortyndet 1:10	3/3	39,65	38,29-41,2	1,11	JA (2)	NEJ	JA	1	
1813	Rye Å	57'15.6530	9'52.9724	27-07-2020	K0090	5	Fortyndet 1:10	3/3	39,05	38,01-40,87	1,65	JA (2)	NEJ	JA	1	
2701	Skjern Å	55'58.5439	8'53.9330	30-08-2020	K0268	4,2	Fortyndet 1:10	3/3	40,27	38,8-41,43	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2701	Skjern Å	55'57.3501	8'39.9847	30-08-2020	K0283	4	Fortyndet 1:10	1/3	39,93	39,93	ID	ID	ID	JA	1	

2701	Skjern Å	55'56.5381	8'34.5385	30-08-2020	K0290	4,5	Fortyndet 1:10	1/3	40,28	40,28	ID3	NEJ	NEJ	JA	1	
2701	Skjern Å	55'56.4152	8'47.0041	30-08-2020	K0293	4,2	Fortyndet 1:10	3/3	39,41	38,11-40,63	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2701	Skjern Å	55'54.4505	8'26.3212	30-08-2020	K0296	5	Fortyndet 1:10	1/3	40,93	40,93	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1301	Skjold Å	55'46.2950	10'0.3019	21-09-2020	K0362	5	Fortyndet 1:10	ID	ID	ID	ID	ID	ID	JA		1
0120	Skovsholm Bæk	55'6.7504	15'8.5862	02-07-2020	K0417	5	Ok	2/3	96,04	46,9-49,14	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1427	Skærbæk	56'31.4385	10'37.6329	08-07-2020	K0014	4,1	Ok	1/3	50,00	NA	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2806	Sneum Å	55'33.2120	8'47.0590	01-09-2020	K0286	5	Fortyndet 1:10	1/3	39,67	39,67	ID	ID	ID	JA		1
2806	Sneum Å	55'26.4004	8'37.1966	01-09-2020	K0323	5	Fortyndet 1:10	1/3	41,09	41,09	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0911	Stavids Å	55'24.9897	10'22.0053	14-07-2020	K0639	4,35	Ok	1/3	48,92	48,92	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2401	Storå	56'20.0983	8'20.7207	22-08-2020	K0152	5	Ok	1/3	49,75	49,75	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1003	Storå (på Fyn)	55'30.8683	09'57.5410	02-07-2020	K0230	5	Ok	3/3	46,69	44,58-48,09	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1003	Storå (på Fyn)	55'28.9344	09'58.9325	02-07-2020	K0233	5	Ok	3/3	41,25	40,55-42,19	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0622	Suså (1)	55'14.8234	11'45.1180	24-07-2020	K0440	5	Ok	3/3	39,21	37,6-41,54	3,23	JA (2)	NEJ	JA	1	
0622	Suså (2)	55'18.0253	11'41.3760	24-07-2020	K0449	5	Ok	1/3	42,06	42,06	ID	NEJ	NEJ	NEJ		1
0622	Suså (3)	55'18.0250	11'41.3814	24-07-2020	K0443	5	Ok	3/3	39,49	38,92-40,55	1,37	JA (2)	NEJ	JA	1	

0622	Suså (4)	55'23.2297	11'45.4709	24-07-2020	K0419	5	Ok	2/3	42,09	41,36-42,82	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0622	Suså (5)	55'21.7278	11'50.2880	24-07-2020	K0439	5	Ok	3/3	40,86	40,16-41,82	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0622	Suså (6)	55'20.0603	11'52.6310	24-07-2020	K0444	5	Ok	3/3	35,18	34,75-35,41	20,16	JA	JA	JA	1	
0622	Suså (7)	55'20.0411	11'52.6780	24-07-2020	K0409	5	Ok	3/3	39,26	38,38-40,44	2,33	JA (2)	NEJ	NEJ	1	
0622	Suså (8)	55'15.4549	11'59.9611	27-07-2020	K0451	3,2	Fortyndet 1:10	3/3	34,36	33,83-34,65	ID	ID	ID	JA	1	
1426	Treå	56'31.7930	10'41.8147	08-07-2020	K0020	4,2	Fortyndet 1:10	ID	ID	ID	ID	ID	ID	JA		1
0511	Tryggevælde Å (1)	55'21.0576	12'15.8878	30-07-2020	K0473	5	Ok	1/3	50,00	NA	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0511	Tryggevælde Å (4)	55'18.4949	12'03.9382	30-07-2020	K0452	4,5	Ok	3/3	44,26	43,31-46,06	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0525	Tubæk	55'06.5978	12'01.9957	05-08-2020	K0462	5	Ok	3/3	39,07	38,15-40,23	2,26	JA (2)	NEJ	JA	1	
1944	Tømmerby Å (Afløb fra Tømmerby Fj.)	57'02.1974	8'55.9218	29-07-2020	K0146	4,1	Ok	3/3	44,23	43,84-44,64	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2801	Varde Å	55'41.6792	8'40.1673	01-09-2020	K0278	4,1	Fortyndet 1:10	1/3	38,10	38,10	1,21	JA	NEJ	JA	1	
2801	Varde Å	55'42.5741	8'42.7631	31-08-2020	K0282	5	Fortyndet 1:10	2/3	43,37	39,58-41,22	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2801	Varde Å	55'37.9841	8'30.9181	01-09-2020	K0285	5	Fortyndet 1:10	1/3	40,91	40,91	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2801	Varde Å	55'39.1949	8'34.5708	01-09-2020	K0287	5	Ok	1/3	48,23	48,23	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2801	Varde Å	55'41.7929	8'47.1339	31-08-2020	K0288	5	Fortyndet 1:10	2/3	39,07	38,99+39,14	1,25	JA	NEJ	JA	1	

2801	Varde Å	55'39.3898	8'53.8939	31-08-2020	K029 1	5	Inhibering	3/3	39,29	37,83-40,4	2,01	JA	NEJ	JA	1	
2801	Varde Å	55'40.7837	8'52.0813	31-08-2020	K029 2	5	Fortyndet 1:10	3/3	36,70	36,36-37,27	6,01	JA	NEJ	JA	1	
2801	Varde Å	55'41.0597	8'36.0622	31-08-2020	K029 4	5	Fortyndet 1:10	2/3	39,285	38,34-40,23	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2801	Varde Å	55'36.7297	8'27.5746	01-09-2020	K029 5	4,8	Fortyndet 1:10	1/3	40,43	40,43	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
1216	Vejle Å	55'42.3035	09'30.0014	17-07-2020	K023 1	5	Fortyndet 1:10	ID	ID	ID	ID	ID	ID	JA		1
1216	Vejle Å	55'39.0298	09'18.4349	21-07-2020	K030 0	5	Ok	3/3	48,25	47,62-48,89	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0932	Vejstrup Å	55'5.2806	10'45.0878	06-07-2020	K033 9	5	Fortyndet 1:10	1/3	39,79	39,79	0,78	JA	NEJ	JA	1	
2904	Vester Vedsted Bæk	55'17.5912	8'40.2107	08-09-2020	K034 3	5	Fortyndet 1:10	ID	ID	ID	ID	ID	ID	JA		1
2304	Vindebæk (Felding Bæk)	56'34.2042	9'2.3107	18-08-2020	K019 3	2	Fortyndet 1:10	2/3	40,40	39,58-41,28	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
0923	Vindinge Å	55'19.8729	10'36.8521	08-07-2020	K024 5	5	Fortyndet 1:10	1/3	46,24	46,24	ID	ID	ID	JA	1	
0518	Vivede Mølleå	55'12.7684	11'51.9280	02-08-2020	K045 4	5	Ok	1/3	45,94	45,94	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
Skjern Å 2021																
2701	Karstoft Å v. Nr. Grene	491694,8275	6201027,35	22-07-2021	K056 1	5,0	Ok	3/3, 3/3	41,83, 37,27	41,0-42,89, 36,69-38,14	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2701	Rind Å v. Arnborg Kirke	498062,6783	6206379,115	22-07-2021	K055 5	5,0	Ok	3/3, 3/3	41,84, 34,16	40,96-42,37, 33,48-35,23	ID	NEJ	NEJ	JA	1	

2701	Skjern Å v. Albæk Bro	473495,2811	6199734,886	23-07-2021	K0562	5,0	Ok	3/3, 2/3	49,51, 39,02	49,11-49,97, 37,61-40,42	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2701	Skjern Å v. Kong Hans Bro	468694,8131	6198329,935	23-07-2021	K0788	5,0	Fortyndet 1:10	1/3	37,49	37,49	3,35	JA	NEJ	JA	1	
2701	Skjern Å v. Sandkrog	482314,0762	6201296,545	22-07-2021	K0569	5,0	Fortyndet 1:10	2/3	39,92	39,76-40,08	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2701	Skjern Å v. Skarrild Bro	493688,9015	6203386,807	22-07-2021	K0575	5,0	Ok	3/3, 3/3	46,60, 36,52	45,79-47,68, 35,77-37,13	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
2701	Skjern Å v. Skjern Å Bro	497749,0039	6205609,832	22-07-2021	K0551	5,0	Fortyndet 1:10	0/3	ID	ID	ID	ID	ID	JA		1
2701	Vorgod Å v. Bjørsløv	483167,0122	6207511,925	22-07-2021	K0552	5,0	Ok	3/3, 0/3	47,15, ID	46,71-47,49, ID	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
Vandsystem/Ø-navn	Sø	X	Y	Dato	Prøve ID	Filtreret vandvolumen (L)	Inhibering	Antal Positive	Gnm Ct-værdi	Ct-range	Gnm kopier	≥LO D	≥LO Q	Detekteret med assay 2	Konstatert	Ikke konklusiv
Als	Ketting Nor (I)	555078,2221	6091749,671	22-08-2021	K0838	5,0	Ok	3/3, 2/3	44,08, 39,06	42,58-45,56, 38,48-39,63	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
Als	Nordborg Sø (I)	547979,1028	6101522,066	26-07-2021	K0570	3,0	Ok	3/3, 3/3	39,96, 38,52	38,81-40,94, 38,17-39,51	1,03	JA (1)	NEJ	JA	1	
Als	Sø i Pøl	548559,4039	6102809,659	26-07-2021	K0566	3,0	Ok	1/3, 0/3	41,34, ID	41,34, ID	ID	NEJ	NEJ	JA	1	
Als	Sø ved Gyldbjeriggård	559768,7656	6080297,368	05-08-2021	K0600	5,0	Ok	1/3, 0/3	39,99, ID	39,99, ID	ID	NEJ	NEJ	JA		1

C. Galizisk sumpkrebs

Vandsystem nr.	Vandløb	Bredde (UTM)	Længde (UTM)	Dato	Prøve ID	Filtreret vandvolumen (L)	Inhibering	Antal positive reaktioner	Gnm Ct-værdi	Ct-range	Gnm kopier	≥LOD	≥LOQ	Konstateret	Ikke konklusiv
0605	Tude Å (2)	55'27.4546	11'19.8212	22-07-2020	K0436	5	Ingen	1/3	39,85	39,85	1,06	JA	JA	1	
0309	Værebros Å (1)	55'45.9270	12'07.2284	31-08-2020	K0456	5	Ingen	2/3	38,24	37,56-38,91	9,08	JA	JA(1)	1	
0309	Værebros Å (2)	55'44.3395	12'13.9875	31-08-2020	K0481	5	Ingen	1/3	40,57	40,57	ID	NEJ	NEJ	1	
0833	Halsted Å	54'50.4514	11'13.0827	23-08-2020	K0488	3,5	Ingen	2/3	40,17	39,87-40,86	ID	NEJ	NEJ	1	
0211	Nivå	55'12.7729	11'51.9260	17-09-2020	K0516	5	Ingen	1/3	40,01	40,01	1,24	JA	NEJ	1	
0630	Fuglebæk Kanal	55'04.4549	11'50.2049	21-09-2020	K0533	1,8	Ingen	1/3, 0/3	41,87, ID	41,87, ID	ID, ID	NEJ, ID	NEJ, ID		1
0217	St. Vejle Å	55'39.2308	12'29.0355	17-09-2020	K0547	5	Ingen	2/3	39,84	39,75-39,92	1,08	JA	JA	1	

D. Krebspest

Vandsystem nr.	Vandløb	Bredde (UTM)	Længde (UTM)	Dato	Prøve ID	Filtreret vand volumen (L)	Inhibering	Antal positive reaktioner	Gnm Ct-værdi	Ct-range	Gnm kopier	≥LOD	≥LOQ	Konstateret	Ikke konklusiv
1504	Alling Å	56'27.8743	10'19.0773	06-07-2020	K0042	3,6	Ok	3/3	36,07	35,54-36,86	6,39	JA	NEJ	1	
1307	Bygholm Å	55'52.3563	9'45.2720	21-09-2020	K0390	5	Ingen	3/3	35,42	34,88-36,11	15,17	JA	JA	1	
2504	Flynder Å	56'24.6387	8'18.5969	22-08-2020	K0159	5	Fortyndet 1:10	3/3	36,57	35,69-37,23	4,60	JA (2)	NEJ	1	
2503	Fåremølle Å	56'25.7708	8'11.5218	22-08-2020	K0157	5	Ok	3/3	36,82	36,31-37,38	6,02	JA (2)	JA (2)	1	
1317	Giber Å	56'4.9057	10'13.9410	22-09-2020	K0352	5	Fortyndet 1:10	3/3	45,51	44,97-46,18	0,01	NEJ	NEJ		1
1506	Gudenå	56'25.9340	9'57.9428	04-07-2020	K0023	4,1	Ok	3/3	36,98	36,58-37,37	3,25	JA	NEJ	1	
1506	Gudenå	56'23.5713	9'54.4679	04-07-2020	K0049	3,8	Ok	3/3	37,06	36,79-37,33	2,99	JA	NEJ	1	
0305	Havelse Å (2)	55'53.9875	12'09.0764	30-08-2020	K0497	5	Ingen	3/3	33,92	34,21-35,18	23,25	JA	JA	1	
2208	Jordbro Å	56'33.1355	9'13.3954	07-08-2020	K0105	5	Ingen	3/3	34,64	34,36-34,89	16,66	JA	JA	1	
2701	Karstoft Å v. Nr. Grene	491694,8275	6201027,35	22-07-2021	K0561	5,0	Ok	3/3	36,82	35,99-36,79	5,56	JA	NEJ	1	
2303	Karup å	56'24.4192	9'00.4698	25-06-2020	K0618	1,65	Fortyndet 1:10	3/3	33,59	33,25-33,76	34,21	JA	JA	1	
2303	Karup å	56.32.2323	8'59.8407	25-06-2020	K0620	1,85	Inhibering	3/3	35,45	35,1-35,72	13,43	JA	JA	1	
2303	Karup å	56'27.7104	8.59.0684	25-06-2020	K0630	1,8	Inhibering	3/3	35,94	35,68-35,81	9,72	JA	JA	1	
2105	Klostermølle Å (Fold Å)	56'32.9020	8'29.4082	18-08-2020	K0184	5	Ok	3/3	31,18	30,97-31,41	229,34	JA	JA	1	
2808	Konge å	55'24.4796	8'53.1227	02-09-2020	K0304	3,6	Ok	3/3	37,06	35,75-38,53	6,32	JA (2)	JA (2)	1	
2808	Kongeå	55'26.3840	8'59.8331	02-09-2020	K0309	3,8	Fortyndet 1:10	3/3	36,21	35,73-36,52	5,72	JA	NEJ	1	
2808	Kongeå	55'29.4328	9'8.1892	02-09-2020	K0316	5	Fortyndet 1:10	3/3	38,08	36,08-39,73	2,46	JA (1)	NEJ	1	

2808	Kongeå	55'26.5934	9'8.2006	02-09-2020	K0318	3,4	Ok	3/3	35,83	35,67-36,12	11,12	JA	JA	1	
1736	Liver Å	57'31.0035	9'53.8668	18-07-2020	K0056	5	Ingen	1/3	48	47,3	ID	NEJ	NEJ		1
0912	Odense Å	55'21.5396	10'22.5012	07-07-2020	K0637	5	Ingen	2/3	44,94	41,09-48,79	0,14	NEJ	NEJ		1
2502	Ramme Å	56'27.1193	8'7.8220	22-08-2020	K0190	5	Ok	3/3	36,41	36,33-36,51	7,54	JA	JA	1	
2902	Ribe Å	55'18.9611	8'55.8448	07-09-2020	K0303	5	Ok	3/3	36,90	35,73-38,6	7,08	JA (2)	JA (2)	1	
2902	Ribe Å	55'17.5157	9'8.6940	07-09-2020	K0310	5	Ok	3/3	35,82	35,68-35,96	11,11	JA	JA	1	
2902	Ribe Å	55'17.7434	9'3.4426	07-09-2020	K0335	5	Ok	3/3	34,49	34,23-34,99	23,24	JA	JA	1	
2902	Ribe Å	55'19.1322	8'50.8720	07-09-2020	K0340	5	Fortyndet 1:10	3/3	37,86	37,09-38,55	1,93	JA (2)	NEJ	1	
2701	Rind Å v. Arnborg Kirke	498062,6783	6206379,115	22-07-2021	K0555	5,0	Ok	3/3	32,28	32,2-32,43	94,73	JA	JA	1	
2205	Skals Å	56'35.0915	9'39.5756	06-08-2020	K0114	3,6	Ingen	3/3	38,10	37,54-38,43	1,45	JA (2)	NEJ	1	
2205	Skals Å	56'34.3973	9'44.6713	06-08-2020	K0119	3,2	Ingen	3/3	38,27	37,96-38,44	1,25	JA (1)	NEJ	1	
2701	Skjern Å	55'58.5439	8'53.9330	30-08-2020	K0268	4,2	Fortyndet 1:10	3/3	34,42	33,91-34,84	22,46	JA	JA	1	
2701	Skjern Å	55'57.3501	8'39.9847	30-08-2020	K0283	4	Fortyndet 1:10	3/3	35,65	35,28-36,13	8,75	JA	JA	1	
2701	Skjern Å	55'56.5381	8'34.5385	30-08-2020	K0290	4,5	Fortyndet 1:10	2/3	35,35	35,08-35,61	10,73	JA	JA	1	
2701	Skjern Å	55'56.4152	8'47.0041	30-08-2020	K0293	4,2	Fortyndet 1:10	2/3	34,69	34,58-34,79	16,83	JA	JA	1	
2701	Skjern Å	55'54.4505	8'26.3212	30-08-2020	K0296	5	Fortyndet 1:10	2/3	36,16	35,62-36,7	6,40	JA	JA	1	
2701	Skjern Å v. Albæk Bro	473495,2811	6199734,886	23-07-2021	K0562	5,0	Ok	3/3	37,25	36,58-37,73	3,25	JA	NEJ	1	
2701	Skjern Å v. Kong Hans Bro	468694,8131	6198329,935	23-07-2021	K0788	5,0	Fortyndet 1:10	3/3	38,44	37,42-39,76	1,65	JA (2)	NEJ	1	
2701	Skjern Å v. Sandkrog	482314,0762	6201296,545	22-07-2021	K0569	5,0	Fortyndet 1:10	3/3	37,33	36,49-37,99	3,21	JA	NEJ	1	
2701	Skjern Å v. Skarrild Bro	493688,9015	6203386,807	22-07-2021	K0575	5,0	Ok	3/3	34,72	34,46-35,22	18,10	JA	JA	1	

2806	Sneum Å	55'33.2120	8'47.0590	01-09-2020	K0286	5	Fortyndet 1:10	3/3	36,45	36,14-36,76	4,56	JA	NEJ	1	
2806	Sneum Å	55'26.4004	8'37.1966	01-09-2020	K0323	5	Fortyndet 1:10	3/3	36,94	36,27-38,13	3,86	JA	NEJ	1	
0911	Stavids Å	55'24.9897	10'22.0053	14-07-2020	K0639	4,35	Ingen	1/3	39,47	39,47	0,93	JA	JA	1	
2401	Storå	56'20.0983	8'20.7207	22-08-2020	K0152	5	Ok	2/3	37,17	36,72-37,61	4,80	JA (1)	JA (1)	1	
1003	Storå (på Fyn)	55'28.9344	09'58.9325	02-07-2020	K0233	5	Ok	3/3	36,21	35,79-36,88	7,90	JA	JA (1)	1	
0622	Suså (3)	55'18.0250	11'41.3814	24-07-2020	K0443	5	Ok	3/3	35,04	34,96-35,13	19,37	JA	JA	1	
0622	Suså (4)	55'23.2297	11'45.4709	24-07-2020	K0419	5	Ok	1/3	38,33	38,33	2,24	JA	NEJ	1	
0622	Suså (5)	55'21.7278	11'50.2880	24-07-2020	K0439	5	Ok	3/3	35,19	34,55-36,16	19,23	JA	JA	1	
0622	Suså (6)	55'20.0603	11'52.6310	24-07-2020	K0444	5	Ok	3/3	35,32	35,24-35,41	16,07	JA	JA	1	
0622	Suså (7)	55'20.0411	11'52.6780	24-07-2020	K0409	5	Ok	3/3	37,51	36,99-38,31	4,08	JA	NEJ	1	
0622	Suså (8)	55'15.4549	11'59.9611	27-07-2020	K0451	3,2	Fortyndet 1:10	3/3	36,10	35,49-36,97	6,56	JA	NEJ	1	
2801	Varde Å	55'41.6792	8'40.1673	01-09-2020	K0278	4,1	Fortyndet 1:10	3/3	38,11	37,69-38,81	1,57	JA (2)	NEJ	1	
2801	Varde Å	55'37.9841	8'30.9181	01-09-2020	K0285	5	Fortyndet 1:10	3/3	37,64	36,47-36,76	2,41	JA	NEJ	1	
2801	Varde Å	55'39.1949	8'34.5708	01-09-2020	K0287	5	Ok	3/3	37,32	36,64-38,17	4,50	JA (2)	JA (2)	1	
2801	Varde Å	55'41.7929	8'47.1339	31-08-2020	K0288	5	Fortyndet 1:10	3/3	13,75	38-38,58	1,25	JA (1)	NEJ	1	
2801	Varde Å	55'39.3898	8'53.8939	31-08-2020	K0291	5	Inhibering	3/3	36,89	36,57-37,48	5,69	JA (2)	JA (2)	1	
2801	Varde Å	55'40.7837	8'52.0813	31-08-2020	K0292	5	Fortyndet 1:10	3/3	36,46	35,5-37,4	5,39	JA	NEJ	1	
2801	Varde Å	55'41.0597	8'36.0622	31-08-2020	K0294	5	Fortyndet 1:10	3/3	36,47	35,64-37,61	5,37	JA	NEJ	1	
2801	Varde Å	55'36.7297	8'27.5746	01-09-2020	K0295	4,8	Fortyndet 1:10	3/3	37,95	37,06-38,69	1,86	JA (2)	NEJ	1	
2304	Vindebæk (Felding Bæk)	56'34.2042	9'2.3107	18-08-2020	K0193	2	Fortyndet 1:10	3/3	33,78	33,53-34,03	29,46	JA	JA	1	

Referencer

Ellison, S. L. R., English, C. A., Burns, M. J., & Keer, J. T. (2006). Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnology*, 6, 1–11. doi:10.1186/1472-6750-6-33

Bilag 10: Oversigt over stationer, hvor der er foretaget test for forekomst af marmorkrebs og louisiana flodkrebs

Vandsystem nr.	Vandløb navn	Bredde grader/decimal-minutter	Længde grader/decimal-minutter	Dato
0100	Pissebæk	55'15.1538	14'44.6732	29-06-2020
0102	Kæmpeå	55'12.4174	14'42.3939	29-06-2020
0103	Baggeå	55'9.1674	14'42.7725	30-06-2020
0104	Blykobbe Å	55'8.6150	14'42.7770	30-06-2020
0105	Byå	55'6.6002	14'42.0453	30-06-2020
0109	Lilleå	55'7.8295	14'50.5290	30-06-2020
0111	Læså	55'2.1538	14'54.5516	01-07-2020
0111	Læså	55'4.6558	14'53.8614	01-07-2020
0112	Grødby Å	55'1.4262	14'54.4167	01-07-2020
0114	Henrikebæk	55'1.0771	14'56.7256	01-07-2020
0115	Øle Å	55'0.4940	14'59.7416	01-07-2020
0119	Sørbæk	55'3.4111	15'7.6092	01-07-2020
0120	Skovsholm Bæk	55'6.7504	15'8.5862	02-07-2020
0121	Grynebæk	55'8.5110	15'7.5764	02-07-2020
0122	Vaseå	55'8.5540	15'7.03385	02-07-2020
0123	Gyldens Å	55'8.4897	15'5.3794	02-07-2020
0123	Gyldenså	55'7.8652	15'2.7250	02-07-2020
0125	Sølyst Bæk	55'9.4249	15'3.9659	02-07-2020
0127	Risebæk	55'10.4948	15'1.3921	02-07-2020
0128	Kelse Å	55'10.5985	15'1.2070	02-07-2020
0131	Kobbe Å	55'11.6237	14'59.3344	03-07-2020
0132	Melsted Å	55'12.0919	14'58.8124	03-07-2020
0133	Bobbeå	55'12.4219	14'56.5532	03-07-2020
0134	Vasebæk	55'13.0616	14'55.1990	03-07-2020
0135	Vårbæk	55'13.2004	14'54.5452	03-07-2020
0136	Døndal Bæk	55'13.6636	14'53.0690	04-07-2020
0137	Møllegård Bæk	55'13.8483	14'52.6356	04-07-2020
0138	Blåkilde Bæk	55'14.3900	14'51.7081	04-07-2020
0138a	Kås Bæk	55'14.4536	14'51.3551	04-07-2020
0139	Tjen Å	55'14.7182	14'50.8532	04-07-2020
0140	Møllebæk	55'14.9439	14'49.7298	04-07-2020
0141	Bakkebæk	55'15.2410	14'49.2483	04-07-2020
0142	Kampelykke Å	55'16.8290	14'47.9158	04-07-2020
0305	Havelse Å	55'52.9669	12'04.1123	30-08-2020
0305	Havelse Å	55'53.6853	12'12.7888	30-08-2020
0309	Værebro Å	55'45.9270	12'07.2284	31-08-2020
0309	Værebro Å	55'44.3395	12'13.9875	31-08-2020
0309	Værebro Å	55'44.3512	12'13.9891	31-08-2020

Vandsystem nr.	Vandløb navn	Bredde grader/decimal-minutter	Længde grader/decimal-minutter	Dato
0337	Svinninge-Audebokanal	55'44.0718	11'27.2564	09-09-2020
0337	Svinninge-Audebokanal	55'45.0502	11'32.1714	09-09-2020
0419	Halleby Å / Åmose Å	55'33.8481	11'11.8916	11-09-2020
0419	Halleby Å / Åmose Å	55'34.7682	11'27.6173	12-09-2020
0419	Halleby Å / Åmose Å	55'34.4128	11'35.3845	12-09-2020
0508	Køge Å	55'27.4636	12'09.8273	28-07-2020
0508	Køge Å	55'28.3323	12'04.2936	30-07-2020
0508	Køge Å	55'28.3853	12'04.2905	30-07-2020
0511	Tryggevælde Å	55'18.4949	12'03.9382	30-07-2020
0511	Tryggevælde Å	55'20.0189	12'06.6737	30-07-2020
0511	Tyggevælde Å	55'20.0552	12'12.2546	30-07-2020
0605	Tude Å	55'27.4546	11'19.8212	22-07-2020
0605	Tude Å	55'29.9761	11'26.1565	22-07-2020
0605	Tude Å	55'24.3545	11'15.5451	22-07-2020
0621	Saltø å	55'14.7127	11'32.7679	22-07-2020
0621	Saltø Å	55'12.6329	11'22.8999	22-07-2020
0621	Saltø Å	55'14.7051	11'32.7673	22-07-2020
0622	Suså	55'23.2297	11'45.4709	24-07-2020
0622	Suså	55'14.8234	11'45.1180	24-07-2020
0622	Suså	55'20.0603	11'52.6310	24-07-2020
0906	Vandløb v. Romsø	55'32.7419	10'26.5220	14-07-2020
0907	Vandl. gennem Fjordmarken	55'32.6578	10'26.1678	14-07-2020
0911	Stavids Å	55'25.9373	10'17.5726	14-07-2020
0911	Stavids Å	55'26.5909	10'12.8860	14-07-2020
0911	Stavids Å	55'24.9897	10'22.0053	14-07-2020
0912	Odense Å	55'23.9650	10'27.4730	07-07-2020
0912	Odense Å	55'13.8210	10'15.5550	07-07-2020
0912	Odense Å	55'21.5396	10'22.5012	07-07-2020
0923	Vindinge Å	55'20.8545	10'40.2008	08-07-2020
0923	Vindinge Å	55'18.4625	10'43.8167	08-07-2020
0923	Vindinge Å	55'19.8729	10'36.8521	08-07-2020
0945	Vandløb fra Stokkeby	55'53.0579	10'22.2497	16-07-2020
0953	Ålerenden	54'50.4821	10'40.7305	16-07-2020
0955a	Akkemoserenden	54'56.7703	10'49.8781	16-07-2020
0959	Påø Bæk	54'50.9171	10'45.9940	16-07-2020
1003	Storå (på Fyn)	55'30.8683	09'57.5410	02-07-2020
1003	Storå (på Fyn)	55'28.9344	09'58.9325	02-07-2020
1012	Brende Å	55'22.1209	10'0.3724	01-07-2020
1012	Brende Å	55'22.3110	9'54.8090	01-07-2020

Vandsystem nr.	Vandløb navn	Bredde grader/decimal-minutter	Længde grader/decimal-minutter	Dato
1012	Brende Å	55'21.5556	9'52.5044	01-07-2020
1205	Kolding Å	55'29.9191	09'18.1317	22-07-2020
1205	Kolding Å	55'29.7858	09'26.1820	22-07-2020
1205	Kolding Å	55'30.0854	09'22.6435	22-07-2020
1205a	Marielundsbaekken	55'29.9278	09'29.3732	22-07-2020
1216	Vejle Å	55'42.3035	09'30.0014	17-07-2020
1216	Vejle Å	55'42.9010	09'32.1077	17-07-2020
1216	Vejle Å	55'41.3546	09'24.3261	21-07-2020
1320	Århus Å	56'8.3887	10'9.3217	23-09-2020
1320	Århus Å	56'6.3882	10'0.9973	22-09-2020
1320	Århus Å	56'8.0982	10'2.4110	23-09-2020
1417	Grenå	56'23.3788	10'44.0082	07-07-2020
1417	Grenå	56'23.8676	10'42.8777	07-07-2020
1417	Grenå	56'24.4642	10'51.7019	07-07-2020
1504	Alling Å	56'25.1673	10'19.2832	06-07-2020
1504	Alling Å	56'23.7316	10'12.4178	06-07-2020
1504	Alling Å	56'27.8743	10'19.0773	06-07-2020
1626	Gerå	57'06.9700	10'09.9303	15-07-2020
1626	Gerå	57'07.1144	10'22.6141	15-07-2020
1626	Gerå	57'06.5788	10'16.7847	15-07-2020
1701	Voer Å	57'13.9757	10'22.9508	15-07-2020
1701	Voer Å	57'12.5028	10'26.2684	15-07-2020
1701	Voer Å	57'19.2878	10'16.1514	15-07-2020
1706	Sæby Å	57'20.0240	10'30.8075	16-07-2020
1706	Sæby Å	57'20.7776	10'20.2007	16-07-2020
1706	Sæby Å	57'19.9814	10'24.2543	16-07-2020
1713	Elling Å	57'24.3449	10'19.6914	16-07-2020
1713	Elling Å	57'28.4938	10'29.5565	16-07-2020
1713	Elling Å	57'28.5913	10'24.3347	16-07-2020
1731	Uggerby Å	57'26.9170	10'06.2123	17-07-2020
1731	Uggerby Å	57'34.1084	10'06.5807	17-07-2020
1731	Uggerby Å	57'28.2695	10'12.4911	17-07-2020
1736	Liver Å	57'31.0035	9'53.8668	18-07-2020
1736	Liver Å	57'27.2124	9'55.2490	18-07-2020
1736	Liver Å	57'30.9150	9'55.0858	18-07-2020
1803	Lindborg Å	56'49.9779	9'48.9132	26-07-2020
1803	Lindborg Å	56'59.8786	10'7.1041	26-07-2020
1803	Lindborg Å	56'54.2953	9'58.8250	26-07-2020
1809	Binderup Å	56'53.2333	9'39.8728	27-07-2020
1809	Binderup Å	56'56.2207	9'38.3290	27-07-2020
1809	Binderup Å	57'0.1715	9'40.3928	27-07-2020
1813	Rye Å	57'10.1372	9'42.9805	27-07-2020

Vandsystem nr.	Vandløb navn	Bredde grader/decimal-minutter	Længde grader/decimal-minutter	Dato
1813	Rye Å	57'12.7078	10'1.6487	27-07-2020
1813	Rye Å	57'15.6530	9'52.9724	27-07-2020
1817	Lindholm Å	57'6.8938	9'55.0102	28-07-2020
1817	Lindholm Å	57'12.9350	9'54.6736	28-07-2020
1817	Lindholm Å	57'9.6428	9'54.8862	28-07-2020
1913	Trend Å	56'50.2441	9'12.6757	09-08-2020
1913	Trend Å	56'49.2653	9'22.1257	09-08-2020
1913	Trend Å	56'49.1728	9'17.2682	09-08-2020
1916	Lerkenfeld Å	56'44.3081	9'31.9725	08-08-2020
1916	Lerkenfeld Å	56'44.1035	9'23.1045	08-08-2020
1916	Lerkenfeld Å	56'41.7179	9'19.2436	08-08-2020
2121	Hvidbjerg Å	56'53.3500	8'24.0976	17-08-2020
2121	Hvidbjerg Å	56'47.5798	8'17.4504	17-08-2020
2121	Hvidbjerg Å	56'50.3931	8'22.6027	17-08-2020
2204	Simested Å	56'40.3243	9'41.9965	06-08-2020
2204	Simested Å	56'40.7962	9'36.6511	06-08-2020
2204	Simested Å	56'35.8967	9'25.4819	06-08-2020
2205	Skals Å	56'32.4991	9'24.1450	06-08-2020
2205	Skals Å	56'35.0915	9'39.5756	06-08-2020
2205	Skals Å	56'29.5273	9'51.2835	06-08-2020
2208	Jordbro Å	56'33.1355	9'13.3954	07-08-2020
2208	Jordbro Å	56'29.1710	9'09.5185	07-08-2020
2208	Jordbro Å	56'26.1674	9'06.3425	07-08-2020
2303	Karup å	56'22.6687	9'04.4768	25-06-2020
2303	Karup å	56'24.4192	9'00.4698	25-06-2020
2303	Karup å	56'20.7871	9'06.3680	25-06-2020
2303	Karup å	56.32.2323	8'59.8407	25-06-2020
2303	Karup å	56'11.5504	9'15.8780	25-06-2020
2303	Karup å	56'14.8577	9'11.4484	25-06-2020
2303	Karup å	56'18.3724	9'09.3031	25-06-2020
2303	Karup å	56'27.7104	8.59.0684	25-06-2020
2303	Karup å	56'16.7818	9'11.5789	25-06-2020
2401	Storå	56'20.0983	8'20.7207	22-08-2020
2401	Storå	56'11.4472	8'58.2613	19-08-2020
2401	Storå	56'20.0981	8'46.2954	22-08-2020
2504	Flynder Å	56'28.0531	8'20.8488	22-08-2020
2504	Flynder Å	56'24.6387	8'18.5969	22-08-2020
2504	Flynder Å	56'29.7833	8'25.1120	22-08-2020
2506	Damhus Å	56'20.8397	8'18.2119	23-08-2020
2506	Damhus Å	56'26.1164	8'30.4985	23-08-2020
2506	Damhus Å	56'23.4154	8'25.6569	23-08-2020
2514	Tim Å	56'12.1043	8'15.8884	23-08-2020

Vandsystem nr.	Vandløb navn	Bredde grader/decimal-minutter	Længde grader/decimal-minutter	Dato
2514	Tim Å	56'12.1111	8'24.6680	23-08-2020
2517	Hover Å	56'8.1053	8'30.7273	24-08-2020
2517	Hover Å	56'8.0116	8'16.1272	24-08-2020
2517	Hover Å	56'8.5051	8'24.4513	24-08-2020
2611	Falen å	55'47.2735	8'27.2083	25-08-2020
2611	Falen å	55'48.8900	8'16.3792	25-08-2020
2611	Falen Å	55'47.6041	8'21.5386	25-08-2020
2613	Henne Å	55'43.4168	8'12.6201	25-08-2020
2613	Henne Å	55'43.2144	8'24.1413	25-08-2020
2613	Henne Å	55'40.8433	8'18.7331	25-08-2020
2701	Skjern Å	55'58.5439	8'53.9330	30-08-2020
2701	Skjern Å	55'54.4505	8'26.3212	30-08-2020
2701	Skjern Å	55'57.2828	9'10.9621	30-08-2020
2801	Varde Å	55'41.6792	8'40.1673	01-09-2020
2801	Varde Å	55'40.7837	8'52.0813	31-08-2020
2801	Varde Å	55'36.7297	8'27.5746	01-09-2020
2806	Sneum Å	55'33.2120	8'47.0590	01-09-2020
2806	Sneum Å	55'31.4599	8'43.3308	01-09-2020
2806	Sneum Å	55'26.4004	8'37.1966	01-09-2020
2808	Kongeå	55'26.3840	8'59.8331	02-09-2020
2808	Kongeå	55'29.4328	9'8.1892	02-09-2020
2808	Kongeå	55'23.7139	8'42.8032	02-09-2020
2902	Ribe Å	55'18.3124	8'57.8677	07-09-2020
2902	Ribe Å	55'19.9554	8'42.0946	07-09-2020
2902	Ribe Å	55'18.0900	9'14.5192	07-09-2020
2909	Brede Å	55'6.7612	8'43.8954	09-09-2020
2909	Brede Å	55'6.6738	9'2.0377	08-09-2020
2909	Brede Å	55'3.1778	8'54.1424	08-09-2020
3001	Vidå	54'57.2275	8'55.7998	09-09-2020
3001	Vidå	54'57.2819	8'41.5317	09-09-2020
3001	Vidå	55'3.6688	9'10.9991	09-09-2020

Danmarks
Tekniske
Universitet

DTU Aqua
Vejløsvej 39
8600 Silkeborg

www.aqua.dtu.dk