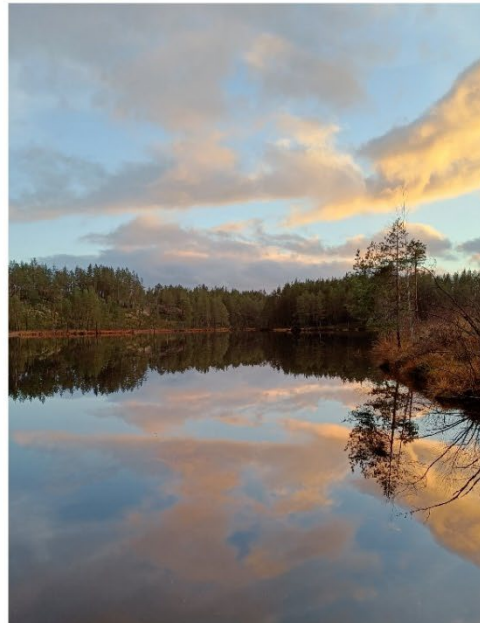


Bruk av historisk kunnskap og miljø-DNA for å undersøke mulig forekomst av bleke i Nidelva

- Framdriftsrapport per april 2023



Laboratorium for ferskvannøkologi og innlandsfiske (LFI)

Laboratorium for ferskvannsekologi og innlandsfiske (LFI)

NORCE Miljø

Nygårdsgaten 112

5008 Bergen

ISSN nr: ISSN-2535-6623

LFI-rapport nr: 480

Tittel: Bruk av historisk kunnskap og miljø-DNA for å undersøke mulig forekomst av bleke i Nidelva - Framdriftsrapport per april 2023

Dato: 04.04.2023

Forfattere: Bjørn T. Barlaup¹, Trond E. Isaksen¹, Dylan Shea¹, Kurt Johansen¹, Arild Håkedal² og Einar Kleiven³.

1) NORCE LFI, 2) Åmli historielag og mållag, 4865 Åmli, 3) pensjonist, 2680 Vågå

Bilder: Foto tatt av NORCE Miljø (LFI).

Oppdragsgiver: Biozin Holding AS

Kontaktperson hos oppdragsgiver: Åse-Lill Fossan Østli

Antall sider: 31

Sammendrag: Den relikte laksen bleke var tidligere en verdifull ressurs i Nidelva. På grunn av kraftige forsurening forsvant bleka fra fiskefangstene på 1970- og 1980-tallet, og den unike bestanden antas å være tapt for alltid. Imidlertid er det mulig at det fantes vannkjemiske refugier i vassdraget med bedre vannkvalitet, hvor en restbestand av bleke kan ha overlevd forsureningen. Lokale fiskere har verdifull kunnskap om hvor bleka tidligere fantes i vassdraget, og denne kunnskapen har blitt brukt til å velge ut stasjoner for analyser av miljø-DNA. Ni stasjoner ble undersøkt i november 2022, og DNA fra aure ble påvist på åtte. På fire av stasjonene ble det også funnet spor av DNA fra laks. Disse resultatene er interessante, men det kan ikke fastslås at DNA-et stammer fra bleka, da det kan ha kommet fra andre kilder i nedslagsfeltet som avrenning fra rensanlegg eller annen tilførsel. På denne bakgrunn er oppfølgende prøvetaking iverksatt for å identifisere kilden til lakse-DNA beskrevet i foreliggende framdriftsrapport.

Forord

NORCE LFI har i løpet av de siste 25 årene vært engasjert i arbeidet med å restaurere blekebestanden i Otravassdraget. Samtidig har det vært antatt at bleka i Nidelva ble utryddet som følge av forurening på 1970- og 1980-tallet. Til tross for at bleka i Nidelva har vært fraværende i fiskefangstene siden 1980-tallet, kan man ikke helt utelukke at det finnes en restbestand. Pågående prosjekt for bruk av miljø-DNA for å bestemme utbredelsen av bleke i Otravassdraget har derfor de siste årene blitt utvidet til også å undersøke mulig forekomst av bleke i Nidelva. Undersøkelsene i Nidelva ble startet opp i 2021 og har som mål å gi en oppdatering av historisk kunnskap og en sikrere status for bleka i Nidelva.

I 2022 fikk prosjektet økonomisk støtte fra Biozin Holding AS, som planlegger å bygge en biodrivstoffabrikk på Jordøya ved Nidelva i Åmli kommune, og som derfor ønsker mer kunnskap om bleka i Nidelva. Åse-Lill Fossan Østli har vært vår kontaktperson hos Biozin Holding AS, som også er oppdragsgiver for rapporten.

I prosjektet har vi hatt spesielt god kontakt med Einar Kleiven og Arild Håkedal, som begge har omfattende historisk kunnskap om bleka i Nidelva. Vi har også fått verdifull informasjon fra flere lokale fiskere om hvor det tidligere var vanlig å fiske bleke. Vi takker alle for et godt samarbeid i denne første fasen av prosjektet og ser frem til fortsettelsen.

Bergen, april 2023



Bjørn T. Barlaup
Prosjektleder
Laboratorium for ferskvannøkologi og innlandsfiske (LFI),
NORCE, Norwegian Research Centre

Innhold

Forord	3
1. Innledning.....	5
1.1 Bakgrunn og hensikt.....	5
1.2 Beskrivelse av vassdraget.....	6
1.3 Historisk kunnskap om forekomsten av bleke i Nidelva	7
2. Metoder.....	8
2.1 Prøvetakingstasjoner.....	8
2.2 Vannprøver.....	11
2.3 Miljø-DNA analyser.....	13
3. Resultat.....	14
4. Status og videre arbeid i prosjektet	18
Referanser	21

1. Innledning

1.1 Bakgrunn og hensikt

Relikt laks

I Otravassdraget i Setesdalen gjennomfører NORCE LFI det såkalte blekeprosjektet for å styrke den naturlige rekrutteringen til den relikte laksen kalt bleke. I Norge har vi tidligere hatt fire slike relikte laksestammer som er kjennetegnet ved at de fullfører hele livssyklusen i ferskvann. Den relikte Vänern-laksen som tidligere vandret opp i Trysilelva er gått tapt, og det samme gjelder høyst sannsynlig også den relikte laksen bleke i Nidelva som er en del av Arendalsvassdraget. De to gjenværende relikte laksestammene er den såkalte småblanken i Namsenvassdraget og bleka i Otravassdraget.

Miljø-DNA benyttes for å kartlegge utbredelsen av bleka i Otravassdraget. Disse undersøkelsene er de siste årene også utvidet til å omfatte Nidelva, der den relikte laksen tidligere fantes. I Nidelva har antall stasjoner for prøvetaking økt som følge av økonomisk støtte fra Biozin Holding AS. Selskapet planlegger å bygge en biodrivstoffabrikk på Jordøya ved Nidelva i Åmli kommune og ønsker derfor mer kunnskap om bleka som tidligere fantes i vassdraget.

Det antas at bleka i Nidelva ble utryddet på 1970- eller 1980-tallet som følge av forurengning. Imidlertid kan en ikke helt utelukke at en restbestand av bleke fortsatt eksisterer, da det kan ha vært såkalte vannkjemiske refugier i vassdraget med bedre vannkvalitet hvor en restbestand kan ha overlevd. Til sammenligning har bleka i Otravassdraget en mer sikker status og er under reetablering etter å ha blitt reddet fra utryddelse på begynnelsen av 1970-tallet. Årsaken til at bleka i Otravassdraget nær ble utryddet var trolig den kombinerte effekten av forurengning og vannkraftutbygging (Barlaup mfl. 2021).

Målsettingen for prosjektet er i første omgang å bestemme om det er mulig å påvise DNA fra laks i det tidligere utbredelsesområde for bleke i Nidelva. Deretter er målet å identifisere kilden til funnene og å få en forståelse av hvilke faktorer som påvirker tilstedeværelsen av DNA fra laks i vassdraget.

For å få mer kunnskap om hvor i Nidelva bleka fantes og hvor den sist ble registrert har vi fått lokal bistand fra Arild Håkedal i Åmli historielag og mållag som både har skrevet om bleka i Nidelva, og som har satt oss i kontakt med lokale fiskere som fisket bleke i Nidelva på 1970- og 1980-tallet. I tillegg har vi fått god hjelp fra Einar Kleiven som er pensjonert NIVA-forsker, og som har stor kunnskap om både bleka i Otra og bleka i Nidelva.

Miljø-DNA

DNA som kan påvises i miljøet utenfor verten kalles miljø-DNA. DNA (arvestoff) er til stede i alle celler, og levende organismer frigjør ulike celletyper til omgivelsene på en rekke ulike måter. Akvatiske dyr som fisk frigjør DNA til vann (miljøet) gjennom urin og avføring som inneholder celler og cellefragmenter, slim- og hud celler, blod (dersom skade, predasjon) og annet.

Miljø-DNA metoder har vist å være et effektivt og sensitivt verktøy for kartlegging av arters tilstedeværelse i akvatisk miljø, samt til beskrivelse av den relative mengden av en spesifikk art i forhold til andre arter i samme habitat. Miljø-DNA har derfor fått et økt fokus innen miljøforskning nasjonalt og internasjonalt de siste årene og bruk av miljø-DNA baserte metoder har i økende grad blitt tatt i bruk i forbindelse med fiskeriforvaltning. Dette inkluderer overvåking og kartlegging av både truede og fremmede fiskearter, eller andre akvatiske dyr i ulike typer vassdrag. Analyser av DNA spor i vannprøver (miljø-DNA) fra elver eller innsjøer kan vise hva slags fisk som lever i vassdraget og er et

spesielt nyttig verktøy for påvisning av sjeldne fiskearter som kan være vanskelig å detektere med bruk av konvensjonelle metoder (Jerde mfl. 2011; Rees mfl. 2014). Andre fordeler som ligger til grunn for denne økte bruken av miljø-DNA som en supplerende metode for konvensjonelle overvåkingsmetoder av fisk er kostnadseffektiviteten, stor geografisk dekning av leveområdet til spesifikke arter, mulighet for tidlig påvisning av fremmede arter, samt utforskning av ellers utilgjengelige habitater. Metoden er ikke minst harmløs for fisk da den ikke involvere noen form for håndtering eller fangst (Jerde 2019).

NORCE LFI har lang erfaring med overvåking og kartlegging av laksefisk bestander i en rekke ulike vassdrag i Norge. Metodikken har i hovedsak vært basert på konvensjonelle metoder som fiske med storruser, garn og elektro-fiske, men også kameraovervåking eller snorkling med direkte observasjon av fisk. I tillegg til å bruke slike konvensjonelle metoder har NORCE LFI utviklet et system med bruk av miljø-DNA for overvåking og kartlegging av blekebestanden i Otravassdraget. Dette arbeidet tar utgangspunkt i protokoller fra lignende undersøkelser og vil bli optimalisert og tilpasset aktuelle områder i vassdraget med hensyn til ulike vannkategorier (bekk, elv, innsjø). På denne måten vil NORCE bidra med kunnskap og metodeutvikling for fremtidig overvåking av både fremmede og truede fiskearter i ferskvann med bruk av miljø-DNA. Standardiserte miljø-DNA metoder har et stort bruksområde og kan på sikt bli et viktig og kostnadseffektivt verktøy for overvåking av fisk og andre målorganismer eller indikatorarter i det akvatiske miljø. Miljø-DNA metoder vil også være et nyttig verktøy for identifisering og avgrensning av områder i et vassdrag som bør prioriteres for videre undersøkelser med bruk av konvensjonelle metoder.

NORCE LFI har anvendt miljø-DNA metoder i kartlegging av bleke (laks, *Salmo salar*) og aure (*Salmo trutta*) i Otravassdraget i 2020, 2021 og 2022 (Isaksen mfl., 2021). Erfaringer fra disse undersøkelsene viser at forekomst av bleke og aure påvist med miljø-DNA i stor grad samsvarer med resultatene fra bruk av konvensjonelle metoder i de samme områdene. For å kartlegge utbredelsen av aure og eventuell tilstedeværelse av bleke i Nidelva i november 2022, ble det benyttet samme metoder som i Otravassdraget.

1.2 Beskrivelse av vassdraget

Arendalsvassdraget ligger i Telemark og Agder og har et nedbørfelt på 4012 km² med utspring i de to store innsjøene Nisser (76,4 km²) og Fyresvatne (49,7 km²) i nord. Samløpet fra Nisserelva og Fyresdalsåna nord for Åmli danner Nidelva, som renner ut i sjøen ved Arendal hvor den gjennomsnittlige vannføring er ca. 115 m³/s.

Vassdraget er kjennetegnet av vannkraftutbygging og har en rekke elvekraftverk og reguleringsmagasin. Nidelva ligger også i et av områdene i Norge som ble hardest rammet av sur nedbør på 1900-tallet (Hindar mfl. 1997). Dette førte til en vannkjemi med unaturlig lav pH og høye konsentrasjoner av aluminium som resulterte i reduksjon og tap av fiskebestander og flere kjente episoder med fiskedød (Kleiven mfl. 2005). For å motvirke forsureningen er det siden slutten av 1990-tallet iverksatt en rekke større kalkingstiltak deriblant innsjøkalking av Nisser og Fyresvatn, og fra 2005 også doseringskalking ved Bøylefoss nedstrøms Nelaug. Kalkingstiltakene og redusert sur nedbør har bedret vannkvaliteten i Nidelva og har lagt grunnlaget for reetablering av laks og andre forsuringfølsomme organismer.

Kleiven mfl. (2005) skriver følgende om forekomsten av ulike fiskearter i Nelaug deriblant bleke: «I Nelaug finst det aure (*Salmo trutta*), røye (*Salvelinus alpinus*), sik (*Coregonus lavaretus*), abbor (*Perca fluviatilis*) (Hansen 1986) og ål (*Anguilla anguilla*) (Hovind og Jensen 1968). Røya finst svært sparsamt i

innsjøen, og blir rekna for nesten utdødd (Matzow og Simonsen 1997). Dessutan fanst det tidlegare også relikte laks (Salmo salar), bleike, i innsjøen (Dahl 1929), som sannsynlegvis har gått ut i følge Matzow og Simonsen (1997) eller gått ut i følge Anonym (1999). Bleika fanst på strekninga Flatenfoss-Nelaug-Høgefoss (Dahl 1929). Skov (1987) skriv også at det er stingsild i Nelaug (Gasterosteus aculeatus), men det står ikkje oppført i Fylkesmannens artsliste.»

Utfra dette kan vi tolke at bleika i Nidelva trolig hadde sitt kjerneområde knyttet til innsjøen Nelaug (8,9 km²) i kommunene Åmli og Froland. Dette er en del av vassdraget som er kraftig påvirket av vassdragsregulering. Nelaug kraftverk, som ligger ved utløpet av innsjøen, regulerer vannstanden i innsjøen fra kote 137,3 til 140,3 moh. Vannføringen i Nidelva ovenfor Nelaug er kontrollert av produksjonen i Åmli kraftverk, som ligger ca. 15 kilometer oppstrøms Nelaug.

Det totale utbredelsesområde for bleika strakte seg sannsynligvis fra Flatenfoss i sør (ca 6 km nedstrøms Nelaug) til Høgefoss i nord (ca 45 km oppstrøms Nelaug) (Kleiven mfl. 2005, Dahl 1929). Men se etterfølgende tekst i kapittel 1.3 hvor Arild Håkedal skriver at det finnes kunnskap om at bleika også fantes oppstrøms Høgefoss og helt opp til Nisser.

1.3 Historisk kunnskap om forekomsten av bleike i Nidelva

For å belyse historisk kunnskap om bleika i Nidelva gjengir vi her artikkelen «Bleika i Nidelva» skrevet av Arild Håkedal. Artikkelen sto på trykk i hefte «Jol i Åmli» utgitt av Åmli historielag og mållag i 2021 (Håkedal 2021):

«I den seinare tid har det vore mykje - og velfortent – medieomtale av bleika i Byglandsfjorden/Otra. Det at me lenge hadde tilsvarande fisk i Nelaug/Nidelva blir det stadig færre som hugsar. Derfor vil eg skrive litt om «vår» bleike mens det ennå lever nokre tidsvitne. Eg sjølv er ein av dei og hugsar bleika som overraskande spreisk i høve til storleiken.

Men fyrst litt om sjølve fenomenet. Bleika blir av fagfolk kalla relikte laks, som tyder levning, rest av gamal laksestamme. Denne utviklinga finn ein mange stader på den nordlege halvkule. I Norge har me hatt fire: «Vår» bleike, i Trysilelva/Klaraelva/Väneren, i Namsen og i Byglandsfjorden, der bare dei to siste er levedyktige i dag. Forklaringa på denne utviklinga er den same overalt – slutten av siste istida. For om lag 12000 år sidan var havet så høgt (isen trykte ned landet) at kystlina i Aust-Agder låg 80 m høgare enn i dag. Det betyr at fossane var lågare (Flatenfoss, Bøylefoss, Evenstad og Rykene). Vanleg laks kunne gå ut og inn av havet lenger opp i landet enn i dag. Forklaringa på bleik fenomenet er då at det blei ein stamme som etterkvart blei innestengt og utvikla seg til dverglaks. Men vandre-/gytelysten blei verande. Sett på spissen blei Nelaug/Byglandsfjorden det nye havet (med mykje mindre mat) og Nidelva/Otra framleis gyteplassar der botn- og grustilhøva var gunstige. I Otra nord for Byglandsfjorden var gytinga så seint som i november. Det vandra enorme mengder med bleike. Fiskarane rodde ut på elva med lysande faklar og stakk fisken. Der var så mange at sett frå heia «såg det ut som ein lysande orm». Det fortel oss at kvaliteten på fisken var god. Eit tilleggsargument var at grunneigarane hadde retten på fiskevatna sine, mens elva var for alle. Det var visst mange husmenn blant blekefiskarane...Bleika blei boren heim i sekkar. Mykje blei salta og brukt som matauk om vinteren.

Mens setesdølane har rike munnlege og skriftlege minne frå blekefisket, er det veldig lite av slikt når det gjeld «vår» bleike. Etter å ha vandra i Nelaug/Nidelva i omlag titusen år, er det nå etter alle solemerke slutt. Forsøk viser at bleika er meir utsett for sur nedbør enn auren, og at dette blei denne fiskens bane. Den siste observasjonen av blekefangst har eg fått av Ole Tommy Flaten Moe (f. 1975). Han hugsar å ha fått ei bleike ved Flaten ved slutten av 1980-/starten på 1990-åra. I same tidsrommet

fortel ferskvassbiolog Einar Kleiven at det blei gjort eit omfattande prøvafiske etter bleke i Nelaug/Flaten. Utan resultat. Den same Einar Kleiven har gjort eit historisk djupdykk for å finne skriftlege nedteikningar om «vår» bleke. Han har funne ei brevveksling frå 1879(!)* mellom Jacob Sverdrup (seinare «bestyrer af Frolands Værk») og fiskeriinspektør Even Landmark, Christiania. Sverdrup har sendt inn eksemplar av bleke og spør om ikkje dette er ein eigen fiskeslag. Fiskeriinspektøren svarar arrogant at dette var ein fargevariant av aure(!). Me må heilt fram til 1928 for å få det vitskapelege «beviset». Professor Knut Dahl, som rett før hadde konstatert at Byglandsfjord-bleka var ein dverglaks, var i Åmli det året og drar same konklusjon om Nelaug-bleka. (Dei nedskrivne notater om «vår» bleke er komne bort...)

Likskapen mellom desse to «Agder-blekene» synes å vere stor når det gjeld utsjånad. Men med titusen års evolusjon er det ikkje sikkert at alt er heilt likt. T.d. kan gytebiologi vere noko ulik. Den enorme gytevandringa i november i Setesdal har eg ikkje funne nokon parallell til i Åmli. Tvert i mot fortel fleire kjelder frå Tveit om eit godt sommarfiske etter bleke i Vallekilen. Ole Svein Krakstad (f. 1950) fortel at han sommarstid på 1960-talet fekk mange bleker både ovanfor og nedanfor Åmfoss. Rekorden var på ca. 250 g. (På Syrtveit fiskeanlegg får ho oppdrettsfôr og kan bli mange kilo.)

Det at bleka vandra ovanfor Åmfoss har eg høyrte ein del tvil om. Men i mitt arbeid med denne artikkelen har eg fått fleire overraskande opplysingar. Ein skulle tru at om bleka klarte å kome opp Åmfoss, så måtte ho i alle fall bli stoppa ved Høgefoss. Men i «Gamalt og nytt frå Nissedal 2019» blir det fortalt at bleka vandra frå Kjørull til Nisser om hausten til godt ut på 1970-talet. Lokalt blei bleka der kalla skurfisk. Likeeins fortel John Dybdal, Tjønnefoss at han fekk bleke i Haukerhyl (v/snarvegen til Gautefall) på 1970-talet. Forklaringa på dette pussige fenomenet kan vere at bleka frå gamalt av har blitt sett på som så god matfisk at fisken er blitt utsett med menneskehjelp i Kjørull.

Kvaliteten på blekekjøtet blir omtala som svært godt. Frå Setesdal er det nedteikningar som fortel at mens auren kunne variere frå heilt bleik til mørk raud, var vaksen bleke jamnfarga lyseraud.

Namnet på denne fisken har òg blitt uttala bleike, særleg i eldre notater. Namnet blege, derimot, er eit lokalnamn bruka på sørlandskysten om saltvassfisken hvitting.

«Dette var litt laust og fast om ein fisk som har vore i vassdraget vårt lenge før menneska slo seg ned her. Eg er redd at denne artikkelen kan vise seg å bli ein nekrolog, men kanskje der ennå er ein djup hyl i vassdraget vårt der eit forelska blekepar kan overraske oss...»

*Kleiven, E. 1995. Brevveksling frå 1879 om den relikte dverglaksen "bleke" i Nelaug, Aust-Agder. Fauna 48: 177-181.

2. Metoder

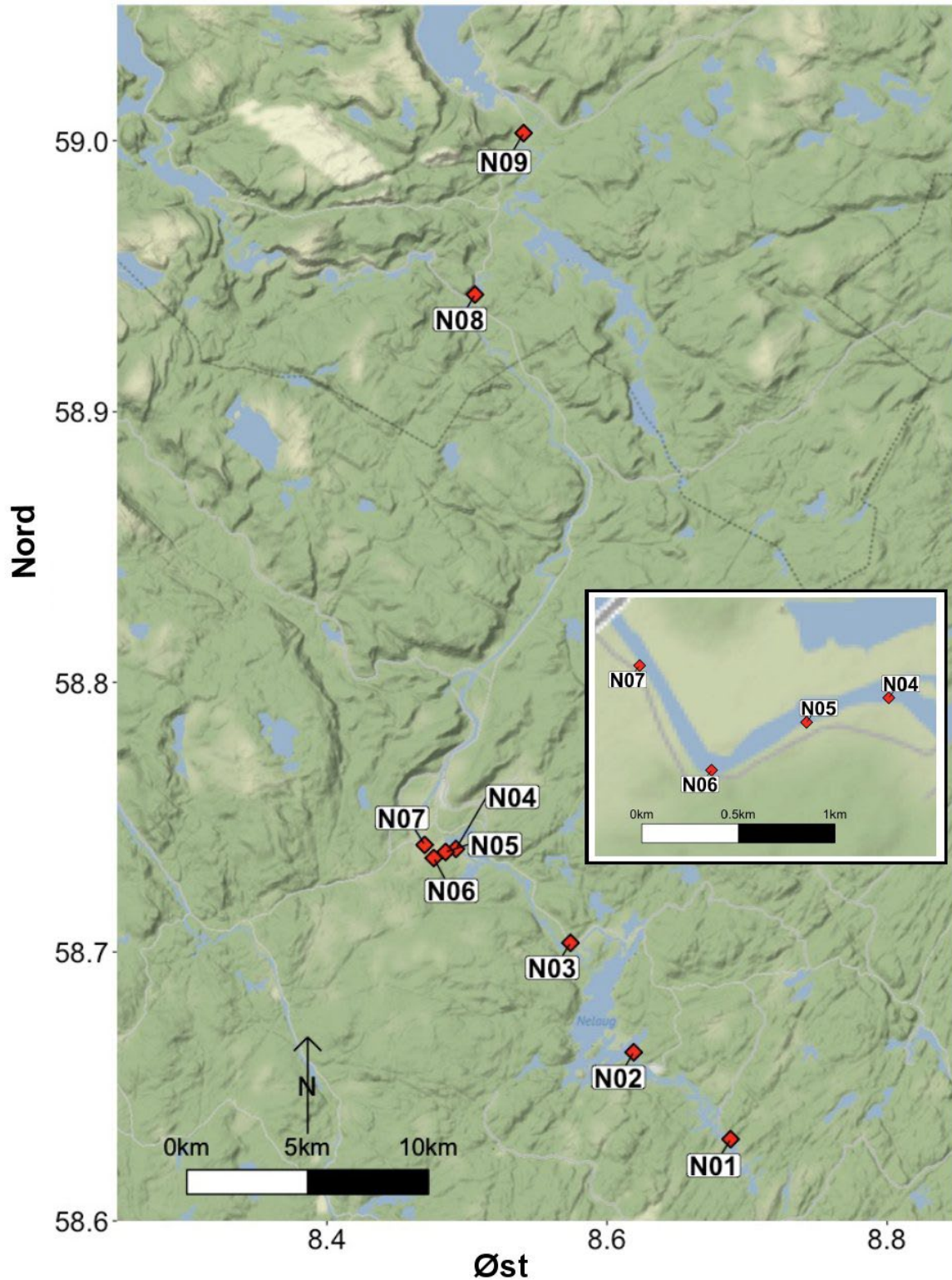
2.1 Prøvetakingstasjoner

Stasjonene for å søke etter mulig DNA fra laks i Nidelva ble valgt utfra den historiske kunnskapen om forekomst av bleke gitt av Arild Håkedal, Einar Kleiven og i samtaler med lokale fiskere som hadde fisket bleke på 1970- og 1980-tallet. Prøvetakingen fokuserte derfor på elvestrekningen rett nedstrøms og oppstrøms innsjøen Nelaug, dvs. to stasjoner ble lagt til hhv. Flatenfoss (st. N01) som ligger ca. 6 km nedstrøms utløpet av Nelaug, og en stasjon ved utløpet av Nelaug (st. N02), og fem stasjoner (st.N03-N07) ble lagt til den ca. 11 km lange elvestrekningen fra Nelaug og oppstrøms til Gjermundnes

bro. I tillegg ble det lagt to stasjoner oppstrøms og nedstrøms Høgefoss (ca. 45 km nord for Nelaug) hhv. ved Haugsjåsund bro (st.N08) og ved Haukerhyl (st.N09).

Totalt ble det da samlet inn vannprøver fra ni steder fordelt på prøvetakingsstasjonene N01-N09, langs Nidelva-vassdraget den 9. november 2022 (se **Figur 1**). På hver stasjon ble det notert kart koordinater og innsamlet 3 x 10 liter vann (triplikater) fra bredden. Alle vannprøvene ble oppbevart enkeltvis i svarte plastsekker og transportert til en base hvor prøvene ble filtrert. Alle prøvene ble filtrert og filtrere preservert innen 20 timer etter at prøvene ble tatt.

Det ble registrert ulike typer vannkategorier (elv eller innsjø) på de ulike prøvetakingsstasjonene. De fleste stasjonene var i relativt stillestående eller strømsvake områder. Unntakene er stasjon N03 (ved Bergene Holm), N06 (Evja) og N07 (nedstrøms Gjermundnes bro) som ble karakteriserte som mer strømrrike stasjoner. Foto fra prøvetakingsstedet til de ulike stasjonene er vist i **Vedlegg 1**.



Figur 1. Vannprøver i Nidelvas vassdrag. Prøvetaking gjennomført på stasjonene N01-N09 i november 2022. N01: Flatenfoss, N02: Nelaugfoss, N03: Oppstrøms Bergene Holm, N04: Sigridnes, N05: Oppstrøms Tjønnodane, N06: Evja, N07: Nedstrøms Gjermundnes bro, N08: Haugsjåsund bro, N09: Haukerhyl.

2.2 Vannprøver

Filtrering

Vannprøvene ble filtrert med bruk av peristaltisk pumpe (Masterflex 77916-20, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA). Det ble brukt innkapslede filter designet spesielt for miljø-DNA analyser av vannprøver (EZ-E-DNA™ hollow membrane filter cartridges; RKS laboratories, Qualicum Beach, BC, Canada). Filtreringsoppsett og filter er vist i Foto 2 og 3.



Foto 1. Filtreringsoppsett med bruk av peristaltiske pumper og innkapslede filter.

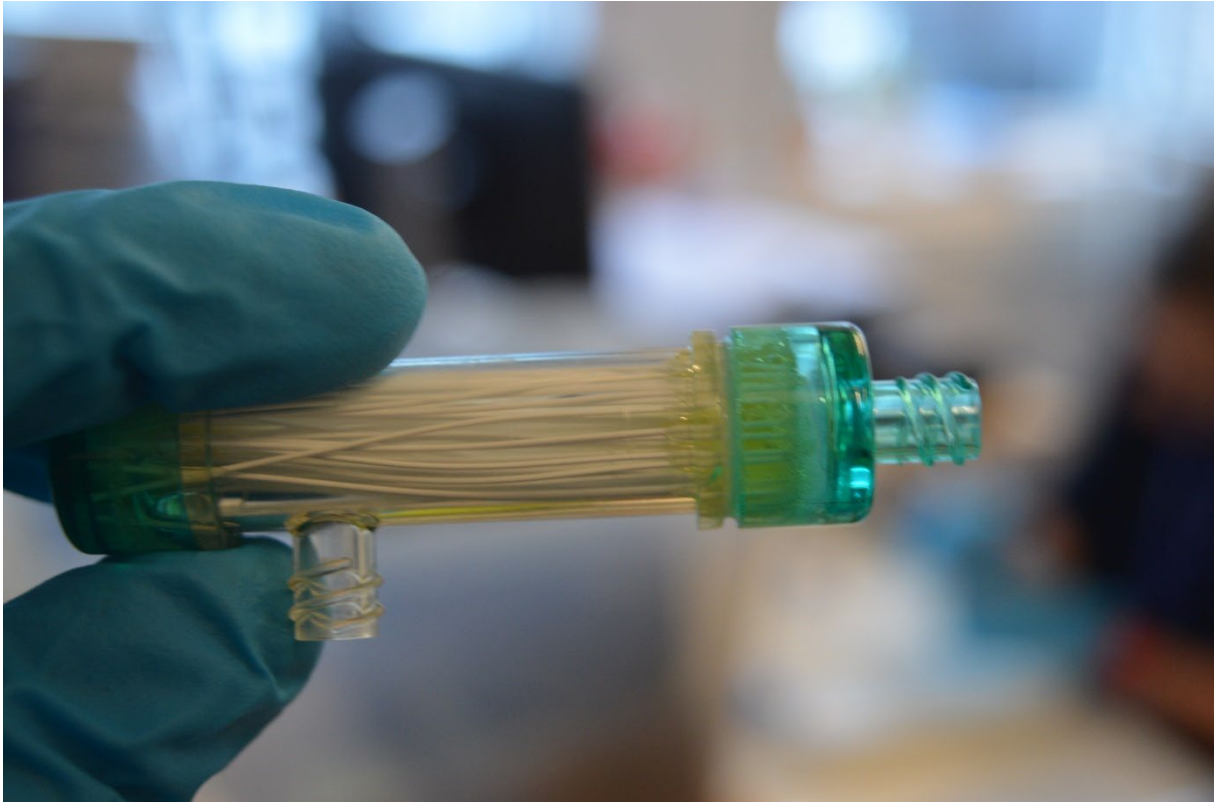


Foto 2. Filter brukt til å filtrere vannprøver fra Nidelvas vassdrag.

Det ble filtrert så mye vann som mulig fra hver 10-liters prøve. Filtreringen ble terminert når vannstrømmen gjennom filtrene ble redusert til drypping på grunn av klogging. Vannvolumet som ble filtrert ble målt og notert for alle prøvene. Filterkapslene ble tilsatt 2 ml RNAlater[®] og lagret mørkt og kjølig (4 °C) inntil videre arbeid med DNA ekstraksjon på NORCE sitt laboratorium i Bergen. RNAlater[®] er en løsning som hindrer eller reduserer nedbryting av nukleinsyrer (DNA, RNA) i et prøvemateriale.

Det ble filtrert triplikate prøver fra hver prøvetakingsstasjon per filtreringsrunde. Filtreringsoppsatsen mellom hver filtreringsrunde ble rensed ved å pumpe klorin-løsning (5%) gjennom systemet i 10 minutter mellom hver filtrering. Rensing med klorin-løsning ble etterfulgt med tilsvarende pumping av destillert vann for å fjerne rest av klorin. En negativ kontrollprøve med rent vann (Milli-Q rensed vann) ble filtrert før ny runde med triplikate prøver fra neste prøvetakingsstasjon. Disse kontrollprøvene ble testet på samme måte som de andre prøvene for å undersøke om det var noen grad av kontaminering i forbindelse med filtreringene.

2.3 Miljø-DNA analyser

Nukleinsyre (DNA/RNA) ekstraksjon

På laboratoriet ble RNAlater® fjernet fra filterkapslene. DNA ble ekstrahert med bruk av PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) med mindre modifikasjoner tilpasset filtrene som ble brukt i vår undersøkelse. Denne metoden har blitt validert i andre prosjekter som har vist at metoden er svært effektiv for utvinning av miljø-DNA fra akvatiske prøver.

Tabell 1. ddPCR reaksjon. Reagensblanding

Reagens	Per reaksjon
ddPCR SuperMix for Probe	11 µL
Forward Primer (10µM)	0.44 µL
Reverse Primer (10µM)	0.44 µL
Probe (10µM)	0.44 µL
Ultrarent vann	4.18 µL
DNA prøve	5.5 µL

Tabell 2. PCR oppsett for laks (*Salmo salar*)

95 °C – 10 minutter	40 sykluser
94 °C – 30 sekunder	
56.4 °C – 1 minutt	
98 °C – 10 minutter	

Tabell 3. PCR oppsett for aure (*Salmo trutta*)

95 °C – 10 minutter	40 sykluser
94 °C – 30 sekunder	
60 °C – 1 minutt	
98 °C – 10 minutter	

Droplet Digital PCR (ddPCR)

Det ble brukt ddPCR med artspesifikke tester for å vurdere den relative forekomsten av laks. Dette er en kvantitativ metode for å vurdere konsentrasjonen av spesifikke genfragmenter (mål-genet) som er basert på vann-olje emulsjonsdråpe teknologi. Hver ddPCR-prøve fraksjoneres i 20 000 dråper, og PCR amplifisering av mål-genet skjer i hver dråpe. Konsentrasjonen av mål-genet i hver prøve blir estimert basert på andelen av PCR-positive dråper. Alle ddPCR reaksjonene ble gjennomført i henhold til gjeldende protokoller optimalisert for påvisning av DNA fra hhv. laks og aure (**Tabell 1, 2 og 3**). Etter gjennomført PCR amplifisering ble fluorescens målt med QX200 Droplet Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) og analyser ble utført med bruk av QuantaSoft software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Antall genkopier per liter vann filtrert ble beregnet ved å bruke ddPCR-estimerer og de målte filtreringsvolumene for hver prøve.

Kontaminering under filtrering og analysearbeidet kan resultere i falske positive resultater av vannprøvene som ble testet for laks og aure miljø-DNA. Følgelig ble negative kontrollprøver inkludert i analysene og testet for både laks- og aure DNA. Dette er vannprøver uten DNA (Milli-Q® ultra rent vann). Positive utslag i test av negative kontrollprøver vil forekomme dersom prøvene har blitt kontaminert i forbindelse med filtrering eller annet.

Det ble også gjennomført positive kontrollprøver. Dette er prøver med kjent mengde laks og aure DNA, og test av slike positive kontrollprøver er nødvendig for å bekrefte at de artsspesifikke testene som ble brukt fungerer optimalt.

Analysene rettet mot laks (Atkinson mfl. 2018) og aure (Gustavson mfl. 2015) er publiserte TaqMan tester som er spesifikke til disse fiskeartene. Metodene har i tillegg blitt validert og optimalisert for vannprøver fra vassdrag som kan huse ulike arter laksefisker eller andre ferskvannsfisk (Lima mfl. 2020). Begge testene brukt i vår undersøkelse rettet mot hhv. laks (bleke) og aure er bekreftet å være artsspesifikke og vil ikke gi utsalg på andre fiskearter.

Det er kjent fra andre lignende studier at økt turbiditet på grunn av høyt organisk innhold (jordstoffer, plantematerialer) og vannløselige komponenter (humussyre, tanniner) i vannet kan gi redusert DNA utbytte og hemme PCR reaksjoner som dermed kan medføre falske negativer i påvisning av spesifikke arter fra miljø-DNA (Bessetti 2007; Harper mfl. 2019). Tilstedeværelse av slike PCR hemmere i prøvene kan enkelt testes ved å tilsette en kjent kontroll ('spike') til prøvene under DNA ekstraksjonen, og som det vil bli testet for i tillegg til påvisning av det spesifikke arts DNA'et (markører for hhv. laks og aure). I denne undersøkelsen ble det brukt DNA fra en arkebakterie *Halobacterium salomoninarum* som kontroll for å beskrive nivåer av PCR-hemmere i de ulike vannprøvene. Beskrivelse av testmetoden (SAL-assay) og PCR-oppsatt er gitt i Andersen mfl. (2010).

3. Resultat

Analyseresultatene påviste ingen spor av RNA/DNA fra laks eller ørret i kontrollprøvene, noe som indikerer at det ikke var kryss-kontaminering mellom prøvene fra de ulike prøvetakingsstasjonene.

Det ble påvist DNA spor fra aure i alle vannprøvene fra 8 (N01-N08) av de 9 prøvetakingsstasjonene. Størst forekomst av miljø-DNA fra aure ble påvist på stasjonen ved Sigridnes (N04) og Evja (N06) på strekningen mellom Åmli og Nelaug.

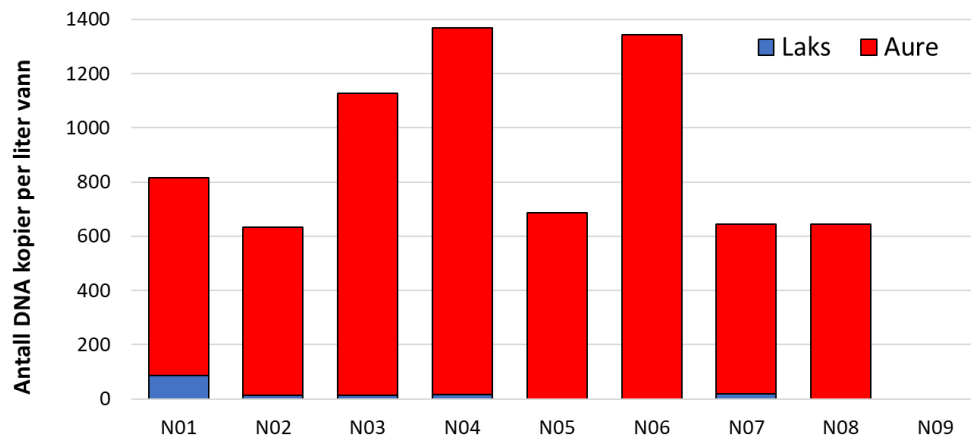
Det ble også påvist DNA spor fra laks i en eller flere replikater av vannprøver fra 5 stasjoner (N01, N02, N03, N04 og N07). Dette er stasjoner som ligger både oppstrøms og nedstrøms Nelaug. Særlig stasjon N01 ved Flatenfoss skiller seg ut med størst andel kopier av miljø-DNA fra laks. På denne stasjonen var også alle replikatene (3 av 3 prøver) positive for lakse-DNA.

Det ble ikke påvist miljø-DNA fra laks i den nordligste delen av det undersøkte området dvs. oppstrøms og nedstrøms Høgefoss, ved hhv. Haugsjåsund bro (N08) eller ved Haukerhyl (N09). På den ene stasjonene (N09) var det ingen spor etter miljø-DNA fra hverken laks eller aure. Kontrolltester av prøvene fra denne stasjonen viser at vannprøvene inneholdt komponenter som hemmet PCR reaksjonene.

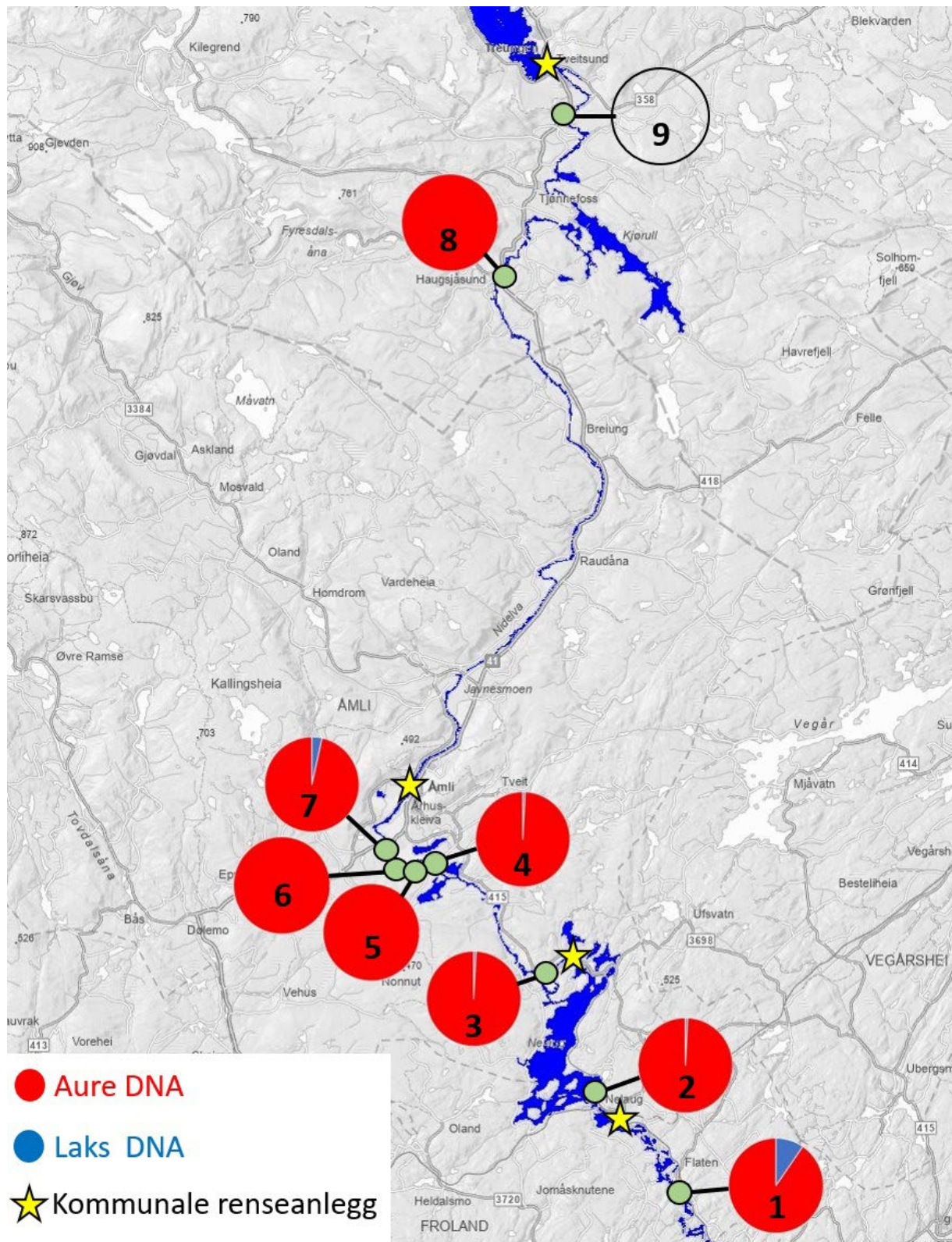
Det ble testet totalt 27 vannprøver fra 9 prøvetakingsstasjoner i vassdraget. **Tabell 4** oppsummerer resultatene fra analyser av vannprøvene. Relativ andel DNA kopier fra laks og aure er vist i **Figur 2** og **Figur 3**.

Tabell 4. Prøveresultater fra stasjonene N01-N09 i Nidelva vassdraget. Det ble tatt 3 x 10 liter vannprøver fra hver stasjon (replikater 1-3). Vannvolumet som ble filtrert fra prøvene er gitt i milliliter (mL). Antall DNA kopier fra laks og aure er basert ddPCR analyser og beregnet utfra filtrert vannvolum. Ingen påvist DNA spesifikk for laks eller aure er beskrevet som negativ. Lokalisering av prøvetakingsstasjonene er oppgitt med kartkoordinater (WGS84).

Stasjon	Replikater	Koordinater		Volum (mL)	Antall DNA kopier per liter	
		Nord	Øst		Laks	Aure
N 01	1			1250	86	730
N 01	2	58° 37.825	008° 41.291	9250	3	91
N 01	3			9600	2	30
N 02	1			1800	Negativ	547
N 02	2	58° 39.766	008° 37.142	850	Negativ	621
N 02	3			1100	13	310
N 03	1			9100	Negativ	90
N 03	2	58° 42.203	008° 34.433	1250	12	1114
N 03	3			2100	Negativ	537
N 04	1			950	15	531
N 04	2	58° 44.295	008° 29.528	1100	Negativ	1353
N 04	3			2200	Negativ	513
N 05	1			2100	Negativ	686
N 05	2	58° 44.227	008° 29.085	1750	Negativ	631
N 05	3			8500	Negativ	200
N 06	1			1000	Negativ	1344
N 06	2	58° 44.093	008° 28.575	1750	Negativ	946
N 06	3			8750	Negativ	121
N 07	1			1500	19	624
N 07	2	58° 44.385	008° 28.188	1700	10	579
N 07	3			8800	Negativ	55
N 08	1			2200	Negativ	644
N 08	2	58° 56.597	008° 30.341	3300	Negativ	560
N 08	3			2350	Negativ	398
N 09	1			5600	Negativ	Negativ
N 09	2	59° 00.166	008° 32.427	8800	Negativ	Negativ
N 09	3			5500	Negativ	Negativ



Figur 2. Antall DNA kopier av laks og aure påvist i vannprøver fra prøvetakingsstasjoner N01-N09. Verdiene er vist som maks registrerte antall DNA kopier (høyeste verdi) per triplikate prøver i ddPCR analyser fra stasjonene. Det ble ikke påvist miljø-DNA fra laks eller aure på stasjon N09.



Figur 3. Miljø-DNA fra vannprøver i Nidelvas vassdrag. Relativ andel DNA kopier fra laks (*Salmo salar*) og aure (*Salmo trutta*) i ulike deler av vassdraget. Andel DNA kopier er vist som gjennomsnitt av triplikate vannprøver på de ulike stasjonene. Det er tatt prøver fra 9 stasjoner i vassdraget (nummerert 1-9; grønne punkter i kartet). Utslippspunkter fra kommunale rensesanlegg er markert i kartet. Det ble ikke påvist DNA fra hverken laks eller aure på prøvetakingsstasjon 9.

4. Status og videre arbeid i prosjektet

Området fra Flatenfoss ved stasjon N01 til Høgefoss ved stasjon N08 er tidligere beskrevet som utbredelsesområdet til relikvt laks i Arendalsvassdraget (Dahl 1929, Kleiven mfl. 2005). I vår undersøkelse ble det påvist miljø-DNA fra laks i vannprøver fra den sørlige delen av denne strekningen, dvs. på strekningen fra Flatenfoss (N01) til stasjonen ved Gjermundnes bro (N07), dvs. på strekninger både opp- og nedstrøms for innsjøen Nelaug.

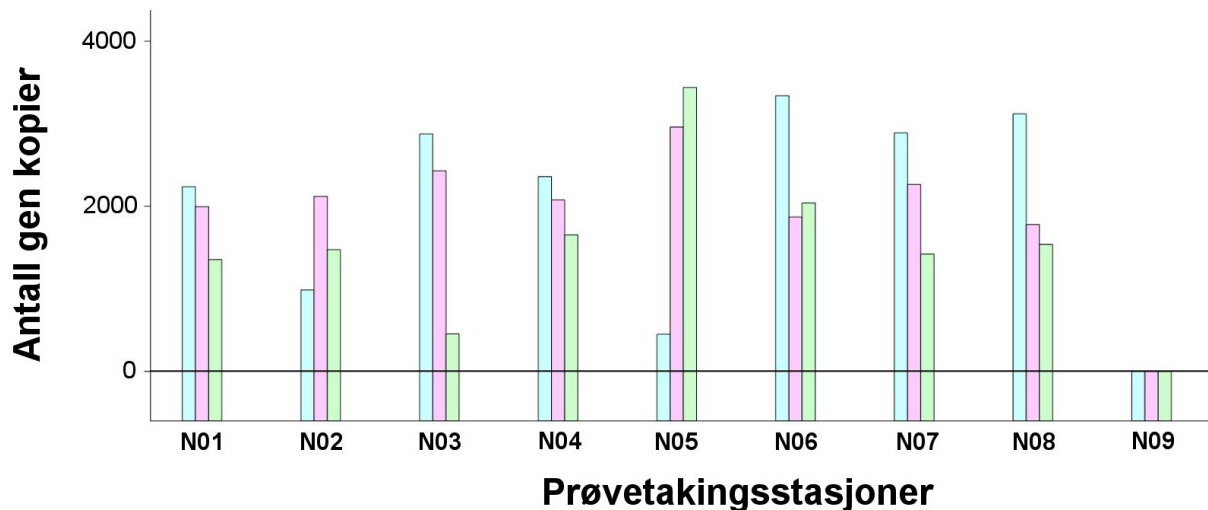
Det ble påvist til dels små mengder av miljø-DNA fra både laks og aure i vannprøvene som ble samlet fra vassdraget i november 2022 sammenlignet med lignende undersøkelser fra andre vassdrag (se Isaksen mfl. 2021). Slike lave konsentrasjoner av miljø-DNA er imidlertid forventet, og særlig når det gjelder DNA spor fra sjeldne fiskearter eller områder med svært små bestander av etablerte fiskearter.

Andre faktorer som spiller inn er vannkategorien (elv, innsjø). Fisk frigjør DNA spor til miljø (vann) gjennom urin, avføring, hud- og slim celler. Miljø-DNA er DNA spor fra utskilte celler eller cellefragmenter som er bundet til partikler eller løst i vann og kan spres over store områder fra den opprinnelige kilden. Dette gjør det mulig å påvise tilstedeværelse av en mål-art (f.eks. laks eller aure) i en stor omkrets (Rees mfl. 2014, Deutschmann mfl. 2019). Miljø-DNA kan imidlertid være ujevnt fordelt i vannforekomster, og spredning av miljø-DNA vil være mindre effektiv i stillestående vann (innsjøer) sammenlignet med rennende vann (elver). De fleste av vannprøvene fra våre undersøkelser ble tatt i områder med stillestående vann eller i strømsvake områder. Dette gjelder særlig prøvetakingsstasjonene N01, N02, N04, N05, N08 og N09. Til tross for at dette er strømsvake områder med både dype og brede partier, så ble det påvist større konsentrasjon av miljø-DNA fra laks på N01 (Flatenfoss) enn noen andre stasjoner. Det ble også påvist relativt store konsentrasjoner av miljø-DNA fra aure på N04 (Sigridnes) og N06 (Evja), noe som indikerer tettere forekomst av aure i dette området enn andre områder hvor det ble tatt prøver fra i vassdraget.

Det ble også påvist miljø-DNA fra laks på tre stasjoner oppstrøms Nelaug hhv. N03 (oppstrøms Bergene Holm), N04 (Sigridnes) og N07 (nedstrøms Gjermundnes bro), men i disse områdene var det kun registrert svært lave verdier. En kan imidlertid merke seg at to av stasjonene (N03 og N07) ble tatt fra mer strømrrike områder som kan være et mer egnet habitat for bleka sammenliknet med mer stillestående områder. Det bør gjennomføres nye prøveuttak omkring disse stasjonene under forhold med lavere vannføring enn november 2023.

Utfordringer med bruk av miljø-DNA metoder er at DNA spor fort tynnes ut i elver under perioder med mye nedbør og høy vannføring (Fossøy mfl. 2018). I slike tilfeller vil konsentrasjonen av miljø-DNA fra fisk variere mellom ulike steder langs en elv, men også fra dag til dag og til og med fra time til time (Tillotson mfl. 2018). Slike utfordrende forhold kan ha påvirket resultatene fra vår undersøkelse høsten 2022. Innsamlingen av vann ble gjennomført under en periode med generelt høy vannføring i vassdraget (se eksempel fra Tjønnodane vist i Foto 3). Slike perioder med høy vannføring bidrar til økt turbiditet (partikkeltetthet i vannet). Store mengder organisk og uorganisk materiale i vannprøvene kan derfor ha bidratt til klogging av filtre og gitt redusert utbytte av DNA. I tillegg kan høyt innhold av partikler bidra til at analysemetodene ble mindre effektivt i påvisning av miljø-DNA fra fisk. Redusert effektivitet skyldes i så tilfelle komponenter i de filtrerte vannprøvene som hemmer PCR reaksjoner (Fossøy mfl. 2018; Harper mfl. 2019). Analyseresultater av kontrollprøvene med bruk av kjent kontroll dvs. 'spike', bekrefter at PCR reaksjonene ble hemmet i undersøkelsen vår. Det var til dels store forskjeller mellom de ulike prøvestasjonene, men også mellom prøver tatt fra samme stasjon. Svake verdier i disse kontrollprøvene kan bety at analyseresultatene for testene rettet spesifikt mot laks- og aure DNA også er svekket. Det vil si at resultatene kan representere falske negativer eller for lave

konsentrasjoner av miljø-DNA fra fisk påvist i en del av vannprøvene. Tilstedeværelse av PCR-hemmere kan også forklare hvorfor prøver med størst vannvolum ofte inneholdt lavest konsentrasjoner med miljø-DNA fra laks og aure, da dette sannsynligvis skyldes tilstedeværelse av vannløselige PCR-hemmer som humussyre (Sidstedt mfl. 2015). Økt vannvolum vil dermed gi økt mengde med PCR-hemmere i prøven, og følgelig redusere effektiviteten til miljø-DNA testene.



Figur 4 Kontrollprøver. Konsentrasjon av kontrollmarkører ('spike'; Halobacterium salomoninarum) i triplikate prøver fra prøvetakingsstasjonene N01-N09. Alle prøvene fra N09 var negativ (0 kopier).

Resultatene fra vår undersøkelse forteller ikke hvor mange fisker det er i de ulike delene av vassdraget, men konsentrasjonen av miljø-DNA i vannprøvene viser at DNA spor etter aure er langt mer dominerende enn fra laks. Videre er det slik at kilden til påvist DNA spor fra aure og laks kan være fra både levende og død fisk. Dette betyr at både mennesker og predatorer (f.eks. oter, mink, fiskespisende fugl og fisk) kan bidra til å spre slike DNA spor.

Laks og særlig oppdrettslaks er vanlig matfisk i kostholdet til norske husholdninger. Det er derfor teoretisk mulig at DNA spor fra laks brukt som matfisk kan spres fra husholdninger via kommunale avløp og ut i vassdraget. Det er flere utslippspunkter fra kommunale avløpsanlegg langs vassdraget (vannmiljo.miljodirektoratet.no; se **Figur 2**). Nelaug renseanlegg (renseprinsipp kjemisk – biologisk) har utslippspunkt til elv 4 km oppstrøms N01. Jordøya renseanlegg (renseprinsipp ikke oppgitt) har utslipp nedstrøms N03, og vil ikke påvirke analyseresultatene til denne stasjonen. Åmli renseanlegg (renseprinsipp kjemisk) har utslipp til elv 3,3 km oppstrøms stasjon N07. Treungen renseanlegg (renseprinsipp kjemisk – biologisk) har utslipp til innsjø nær utos 3,1 km oppstrøms stasjon N09. Det ble ikke påvist miljø-DNA fra laks i prøver tatt fra denne nordlige delen av vassdraget (N08 og N09). Resultatene viser imidlertid at vannprøvene fra N09 inneholdt PCR-hemmere i den grad at ingen DNA spor fra hverken laks eller aure kunne påvises.

Frigjort DNA fra fisk til miljø vil bli nedbrutt over tid, og denne nedbrytningstiden vil avhenge av ulike faktorer som sollys, oksygen og pH. I tillegg vil det være en mikrobiell og enzymatisk nedbryting miljø-DNA (Barnes mfl. 2014). Det er vist at miljø-DNA fra laksefisk i elv kan både degraderes og fortynnes raskt i elv, og at miljø-DNA konsentrasjonen vil være betydelig redusert noen hundre meter nedstrøms kilden (Tillotson mfl. 2018). Dette betyr at det kan være vanskelig å påvise DNA spor fra laks dersom vannprøver tas mer enn 1 km nedstrøms kilden til frigjort DNA, som kan være levestedet til laksen i

elven eller eventuelt utslippspunkt for rensed kloakk fra husholdning. I vår undersøkelse ble det påvist DNA spor etter laks på stasjoner som ligger mer enn 3 km nedstrøms utslippspunkt til nærmeste rensesanlegg. På grunn av avstanden til utslippspunktet, samt nedbrytningstid på rensesanlegget synes det derfor mindre sannsynlig at kommunale avløp er kilde til dette DNA sporet, men dette kan ikke utelukkes. I tillegg kan avrenning fra nedslagsfeltet utenom rensanleggene for eksempel fra en grillplasser eller liknende, også ha vært mulige kilder for tilførsel av DNA spor fra laks. Utfra foreliggende resultat kan det derfor ikke fastslås at de påviste DNA sporene stammer fra bleka.

I området omkring stasjon N07 ble det påvist DNA fra laks i vannprøver tatt i både 2021 (NORCE LFI, ikke publisert) og 2022, hvilket viser at resultatene er reproducerbare fra et år til et annet. Hva som er kilden til dette signalet undersøkes nå nærmere i den oppfølgende prøvetakingen i prosjektet. Basert på erfaringene fra høsten 2022 vil kommende prøvetaking bli gjennomført i en periode med lavere vannføring og mindre turbiditet i løpet av vinteren/våren 2023. Dette vil gi mer informasjon om mulig forekomst av bleke i Nidelva.



Foto 3. Det var høy vannføring ved prøvetakingen i Nidelva i november 2022. Bildet er fra Tjønnodane (prøvestasjon N05).

Referanser

- Andersen, L., Hodneland, K. and Nylund, A. 2010. No influence of oxygen levels on pathogenesis and virus shedding in Salmonid alphavirus (SAV)-challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Virology Journal*, 7, 198. doi: 10.1186/1743-422x-7-198.
- Anonym 1999. Til laks åt alle kan ingen gjera? Om årsaker til nedgangen i de norske villaks bestandene og forslag til strategier og tiltak for å bedre situasjonen Norges offentlige utredninger NOU 1999: 9. Utredning fra et utvalg oppnevnt ved kongelig resolusjon av 18. juli 1997. Avgitt til Miljøverndepartementet 12. mars 1999. 157 s. + 12 vedlegg.
- Atkinson, S., Carlsson, J. E. L., Ball, B., Egan, D., Kelly-Quinn, M., Whelan, K. and Carlsson, J. 2018. A quantitative PCR-based environmental DNA assay for detecting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28, 1238-1243. doi: 10.1002/aqc.2931.
- Barlaup, B. T. (redaktør) 2021. Bleka i Byglandsfjorden 2018-2021 -Status, trusler og anbefalte tiltak. *LFI-Laboratorium for ferskvannøkologi og innlandsfiske. LFI-Rapport nr. 421*.
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L. and Lodge, D. M. 2014. Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. *Environmental Science & Technology*, 48, 1819-1827. doi: 10.1021/es404734p
- Bessetti, J. 2007. An Introduction to PCR Inhibitors. *PCR Inhibition - Profiles in DNA. Promega*, 2.
- Dahl, K. 1929. Fiskeriinspektøren for Ferskvandsfiskeriene. S. 12-13 i: Fiskeriinspektørens indberetning 1928. Landbruksdepartementet. 28 s.
- Hindar, A., Walseng, B., Lindstrøm, E.A., Brandrud, T.E., Larsen, B.M. & Skiple, A. 1997. Arendalsvassdraget. Kalking i vann og vassdrag. Overvåking av større prosjekter 1996. DN-Notat 1997. 1: 28-41.
- Deutschmann, B., Müller, A.-K., Hollert, H. and Brinkmann, M. 2019. Assessing the fate of brown trout (*Salmo trutta*) environmental DNA in a natural stream using a sensitive and specific dual-labelled probe. *Science of the Total Environment*, 655, 321-327. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.247>
- Fossøy, F., Thaulow, J., Anglès d'Auriac, M., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., Mo, T. A., Sandlund, O. T. and T., H. 2018. Bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy for overvåkning og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk. *NINA Rapport 1586*, 56 s.
- Gustavson, M. S., Collins, P. C., Finarelli, J. A., Egan, D., Conchúir, R. Ó., Wightman, G. D., King, J. J., Gauthier, D. T., Whelan, K., Carlsson, J. E. L. and Carlsson, J. 2015. An eDNA assay for Irish *Petromyzon marinus* and *Salmo trutta* and field validation in running water. *Journal of Fish Biology*, 87, 1254-1262. doi: 10.1111/jfb.12781.
- Håkedal, A. 2021. "Jol i Åmli". Hefte utgitt av Åmli historielag og mållag.
- Harper, L. R., Buxton, A. S., Rees, H. C., Bruce, K., Brys, R., Halfmaerten, D., Read, D. S., Watson, H. V., Sayer, C. D., Jones, E. P., Priestley, V., Machler, E., Murria, C., Garces-Pastor, S., Medupin, C., Burgess, K., Benson, G., Boonham, N., Griffiths, R. A., Handley, L. L. and Haenfling, B. 2019. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia*, 826, 25-41. doi: 10.1007/s10750-018-3750-5
- Isaksen, T.E., J.L. Ray, R.Lima & B.T. Barlaup. 2021. Bruk av miljø-DNA metoder for kartlegging av bleke. I: Barlaup, B. T. (red.). Bleka i Byglandsfjorden 2018-2021 -Status, trusler og anbefalte tiltak. *LFI-Laboratorium for ferskvannøkologi og innlandsfiske. LFI-Rapport nr. 421*.
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L. and Lodge, D. M. 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4, 150-157. doi: 10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x.
- Jerde, C. L. 2019. Can we manage fisheries with the inherent uncertainty from eDNA? *Journal of Fish Biology*, 98, 341-353
- Kleiven, E., Håvardstun, J. and Barlaup, B.T. 2005. Prøvefiske i Nelaug, Aust-Agder, i 2004. *NIVA-rapport, nr. 5028-2005*.
- Lima, R., Isaksen, T. E., Skaar, K. S., Müller, O., Larsen, A. and Ray, J. L. 2020. In vitro optimization of a quantitative molecular assay for detection of extracellular DNA (eDNA) from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *bioCEED, Centre for Excellence in Biology Education. University of Bergen, Norway*.
- Matzow, D. og Simonsen, J.H. 1997. Kultiveringsplan for innlandsfisk, laks og sjøaure i Aust-Agder. Høringsutgave 1997. Fylkesmannen i Aust-Agder, Miljøvernavdelingen. 58 s. + 5 vedlegg.

- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M. and Gough, K. C. 2014. Review. The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51, 1450-1459. doi: 10.1111/1365-2664.12306.
- Sidstedt, M., Jansson, L., Nilsson, E., Noppa, L., Forsman, M., Rådström, P. and Hedman, J. 2015. Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 487, 30-37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.07.002>.
- Skov, A., Vikse, P. og Matzow, D. 1990. Kalkingsplan for Aust-Agder 1990-1993. Fylkesmannen i Aust-Agder, miljøvernavdelingen, rapport nr. 11-1990. 242 s.
- Tillotson, M. D., Kelly, R. P., Duda, J. J., Hoy, M., Kralj, J. and Quinn, T. P. 2018. Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation*, 220, 1-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.01.030>

Vedlegg 1. Bilder tatt av de ni prøvetakingsstasjonene for Miljø-DNA i Nidelva høsten 2022.



Stasjon N01. Flatenfoss ca 6 km nedstrøms utløpet av Nelaug.



Stasjon N02. Nelaugfoss ved utløpet av innsjøen Nelaug.



Stasjon N03. Bergene Holm mellom Fjellsol og Raknesodden.



Stasjon N04. Sigridnes



Stasjon N05. Tjønnodane



Stasjon N06. Evja



Stasjon N07. Nedstrøms Gjermundnes bro



Stasjon N08. Haugsjåsund bro



Stasjon N09. Haukerhyl