

Kan vi finde løgfrø med eDNA?

Løgfrøen er omfattet af Habitatdirektivets særlige artsbeskyttelse. Det betyder at myndighederne ikke må give tilladelse til aktiviteter, som kan skade artens yngle- og rasteområder. Arten er imidlertid vanskelig at finde i naturen, da den lever nedgravet i jorden det meste af tiden. Hannerne kvækker om foråret under vand, og kan derfor kun vanskeligt høres. Normalt kræves der trænede specialister for at dokumentere artens forekomst. Selv specialister kan i nogle tilfælde vanskeligt finde arten, og det er ofte umuligt at vurdere den kvantitative forekomst, når forskellige ynglesteder skal sammenlignes. I denne undersøgelse har vi brugt eDNA-teknik til at spore løgfrø og til at vurdere artens kvantitative forekomst i fire forskellige søer.

MARTIN HESSELSØE, SØREN NØHR
THOMSEN, STEEN W. KNUDSEN,
PETER RASK MØLLER &
LARS DYHRBERG BRUUN

Indledning

Lübker Golf Resort ligger i Syddjurs Kommune ved Nimtofte på Djursland. Området huser flere beskyttede padder (stor vandsalamander, spidssnudet frø og løgfrø). Det er den største bestand af løgfrø på Djursland, som findes i og omkring området (Se Figur 1 og Boks 1). Bestanden er sandsynligvis en af de største i hele landet.

Siden de første idéer om etablering af Lübker Golf Resort i 2004, har der været særlig opmærksomhed på løgfrøen i området. Aarhus Amt og senere Syddjurs Kommune har løbende haft stor fokus på at sikre artens fortsatte forekomst i området under og efter etablering af golfbaner og bebyggelse. Der er således i 2005 udarbejdet en omfattende plejeplan i forbindelse med miljøvurdering af planerne for Lübker Golf Resort /1/. Plejeplanen har blandt andet sikret etablering af en række nye ynglesteder til løgfrø, for at afværge

og minimere påvirkningen fra det planlagte anlægsprojekt.

Nye levesteder til løgfrø

I forbindelse med anlæg af golfbanen blev der på baggrund af plejeplanen etableret et stort antal nye vandhuller, som blev specifikt planlagt og udført af hensyn til løgfrø. Udover

disse vandhuller blev der anlagt enkelte større tekniske søer, som skulle modtage og opmagasinere drænvand fra golfbanen til vanding.

Det ene af de tekniske søer (teknisk sø B) blev anlagt med flad bredhældning i den ene side. Dette blev udført med henblik på at sikre de bedst mulige forhold for de beskyttede padder. Formålet med den tekniske sø var



Figur 1: Løgfrø fotograferet mens den fouragerer på land om natten (Foto: Martin Hesselsøe).

dog primært, at opmagasinere vand til vanding af golfbanen.

I dag ved vi at løgfrøerne har klaret sig gennem anlægsperioden og at arten fortsat findes vidt udbredt i området ved Lübker Golf. Vi ved også at arten har koloniseret mange af de nye vandhuller, herunder den tekniske sø. En opsummering af overvågningsresultaterne med konventionelle metoder over en periode på 10 år fremgår af Figur 2.

De seneste undersøgelser af artens udbredelse er udført af Syddjurs Kommune, ved at lytte efter de kvækkende løgfrøer om foråret. I det undersøgte område (se tabel 1) er løgfrø hørt kvække regelmæssigt i alle de 4 lokaliteter.

Det er konstateret at en betydelig del af de kvækkende hanner er hørt i den store tekniske sø B. Det har dog ikke været muligt at fange haletudser af løgfrø i denne sø.

Dette kan have to meget forskellige forklaringer:

- De voksne løgfrøer prøver at yngle i den tekniske sø, men æg og/eller haletudser overlever ikke, fx på grund af vandkvaliteten.
- Der er mange løgfrøhaletudser i den tekniske sø, men det er ikke umiddelbart muligt at observere og/eller fange dem i den store og relativt dybe tekniske sø B.

Ved at anvende eDNA-analyser (se Boks 2) forventer vi at kunne afgøre, hvilke af de to mulige forklaringer, som passer bedst med virkeligheden.

Indsamling og analyse af prøver til eDNA analyse

Vandprøverne til eDNA analyse blev taget i juni 2018, hvor haletudserne af løgfrø stadig var i søerne. Metoden til indsamling af eDNA er simpel og kan udføres af alle der har fået en grundig introduktion til metode og udstyr.

Selv om prøvetagningen er simpel, så kan meget også gå galt. Omhu ved prøvetagning og transport er derfor helt afgørende for analyseresultatet.

Vandprøven til eDNA-analyse skal filtreres og filtret sendes til analyse. Den filtrerede mængde vand måles og filteret fryses eller fikseres frem til analysen kan udføres. En filtrering tager cirka 30 minutter.

I denne undersøgelse er anvendt et prøvetagningskit med engangsudstyr, der minimerer risikoen for kontaminering. Kittet indeholder alt det som er nødvendigt for at udføre prøvetagningen (filter, sprøjter, prøvepose, rekvisition, nummerlabel, handsker mm). Vi har filtreret prøven ved hjælp af trykassisteret filtrering (Se Figur 3). Ved trykassisteret filtrering

BOKS 1: Løgfrø og habitatdirektivets artsbeskyttelse:

Løgfrøen (*Pelobates fuscus*) forekommer spredt i Danmark i Jylland, på Sjælland, Lolland og enkelte andre øer. Arten er fx ikke kendt fra Fyn. Generelt er kendskabet til artens udbredelse dog meget begrænset. Det er dog helt sikkert, at arten er gået meget tilbage de seneste 50 år. Arten lever skjult. Således kvækker hannerne under vandet, og det er derfor meget vanskeligt at høre dem. Om dagen uden for yngletiden er løgfrøerne skjult på land, nedgravet i jorden. Ofte bliver de fundet fx i forbindelse med havearbejde. Løgfrøens haletudser bliver meget store (helt op til 20 cm) før de forlader vandet i juli måned. Ingen andre frøer i Danmark har så store haletudser.

EU's Habitatdirektiv beskytter en række dyre- og plantearter overalt i unionen. Disse arter er opført på direktivets bilag IV og kaldes ofte "Bilag IV-arter". Beskyttelsen betyder blandt andet, at yngle- og rasteområder for de beskyttede arter ikke må beskadiges. Beskyttelsen af bilag IV-arterne gælder også uden for de særligt beskyttede Habitatområder. Løgfrøen er omfattet af denne beskyttelse. Derfor er Syddjurs Kommune forpligtiget til at sikre beskyttelse af løgfrøen i forbindelse med kommunens planlægning og øvrig forvaltning.

ring kan filtreringen udføres mens prøvetageren udfører andre opgaver, og udstyret sikrer at filtret trykbelastes svarende til leverandørens anbefalinger. De lokaliteter som er undersøgt i denne opgave fremgår af tabel 1.

Ved analysen er anvendt to forskellige arts-specifikke eDNA-detektionssystemer, som begge er rettet mod løgfrø. Begge systemer er udviklet og testet i samarbejde med Københavns Universitet. Sammen med prøverne er analyseret en standarddrække med en kendt fortynding af DNA fra løgfrø. Baseret på denne standard, er det muligt forsigtigt at sammenligne de enkelte prøver kvantitativt, hvis eDNA mængden i prøverne er tilstrækkelig høj.

Baseret på den målte koncentration af artsspecifik eDNA i prøven i forhold til den analyserede standarddrække kan resultaterne opdeles i følgende hovedgrupper:

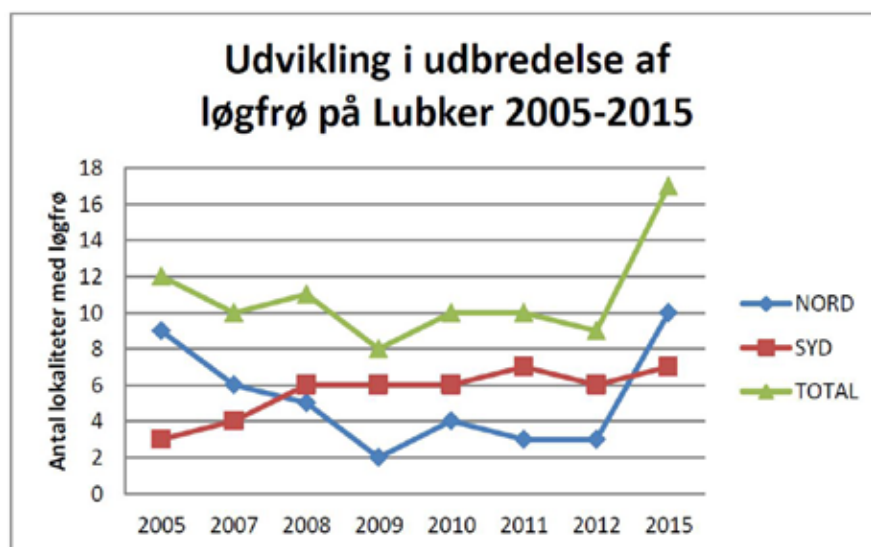
- Positiv (kvantificering muligt)
- Positiv (kvantificering ikke mulig)
- Måske positiv
- Negativ

"Måske positive" resultater skal tolkes med stor forsigtighed:

eDNA-resultater

Tabel 1 viser hovedkonklusionerne på eDNA-analyserne i dette studie. Alle de undersøgte lokaliteter var positive for løgfrø.

Vi ved at de voksne løgfrøer kun opholder sig i vandhullerne om foråret for at lægge æg. Der er således ikke voksne løgfrøer i vandhullerne ved prøvetagningen i juni. Vi ved også, at eDNA forsvinder i løbet af kort tid, hvis de dyr som udskiller eDNA til omgivelserne, ikke længere findes i vandet. Resultatet peger således tydeligt på, at der i juni måned er løgfrøhaletudser i alle fire undersøgte vandhuller.



Figur 2: Udviklingen i antal lokaliteter med løgfrø på Lübker Golf Resort i perioden 2005-2015. Resultatet er baseret på konventionelle undersøgelser. Antallet af lokaliteter er fordelt på den nordlige og den sydlige del af området. Den aktuelle undersøgelse omfatter fire lokaliteter beliggende i den sydlige del af området.

Tabel 1: Vurdering af eDNA resultater fra Lübker Golf Resort i Syddjurs Kommune i 2018. Høje positive eDNA signaler blev observeret i de fire undersøgte lokaliteter. På den baggrund er resultaterne tolket kvantitativt. Den relative fordeling af eDNA mellem de fire undersøgte lokaliteter fremgår af den sidste kolonne (se også teksten).

	eDNA analyse	Filtrering	Søareal	Fordeling af eDNA
	Kvalitativ	Vol (ml)	(m ²)	(%)
Teknisk sø B	Positiv	700	8458	60-70%
Lübker 42	Positiv	200	179	1-2%
Lübker 34	Positiv	150	326	13-15%
Lübker 35	Positiv	200	529	15-23%

For tre ud af fire lokaliteter var koncentrationen tilstrækkelig høj til at kvantificering var mulig. Den fjerde lokalitet var meget tæt på grænsen for mulig kvantificering (Lokalitet 42). På den baggrund har vi forsøgt at vurdere resultaterne kvantitativt. Det må understreges, at kvantitative vurderinger baseret på eDNA målinger altid skal udføres med stor forsigtighed. Der er mange kendte og ukendte faktorer, som kan påvirke mængden af eDNA i en konkret prøve. Det er dog sandsynligt, at der er en vis sammenhæng mellem biomassen og antallet af den art som eftersøges, og koncentrationen af eDNA i vandet.

De målte koncentrationer af eDNA fra løgfrø er i tabel 1 korrigeret for fysiske forhold. Først korrigeres for størrelse af den vandprøve, der er filtreret. Derefter korrigeres for størrelsen af den sø, hvor prøven er taget fra. Det antages at søens areal er omtrent proportional med søens volumen. På det grundlag har vi lavet en relativ sammenligning af eDNA mængden i de fire undersøgte søer.

Resultatet tyder på, at 60-70% af den

samlende eDNA mængde fra løgfrø i området, findes i den store sø (teknisk sø B). Hvis det antages, at der er proportional sammenhæng mellem eDNA koncentrationen og tætheden af haletudser i søerne, så tyder resultatet på, at hovedparten af løgfrøernes haletudser i undersøgelsesområdet i 2018 findes i den tekniske sø B.

Det største antal løgfrøer er hørt kvække om foråret netop i den tekniske sø B. Det har dog aldrig været muligt at fange løgfrøhaletudser i denne sø. Fysiske forhold i søen som dybde og bredhældning gør det vanskeligt at fange haletudserne med de konventionelle metoder. eDNA metoden har nu påvist, at denne nyetablerede lokalitet efter alt sandsynlighed er blandt de vigtigste ynglesteder for løgfrø på Lübker Golf resort.

Konklusion

eDNA metoder kan bruges til detektion og kortlægning af beskyttede dyrearter. I denne undersøgelse har vi vist hvordan teknologien kan bruges til kortlægning af løgfrø. Den nye

BOKS 2: eDNA:

Alle organismer afsætter DNA-spor i miljøet. Rester af DNA i miljøet kaldes ofte environmental-DNA, eDNA eller på dansk miljø-DNA. eDNA stammer fra døde eller døende celler, der frigives fx gennem tarmsystemet, huden eller andre slimhinder. Analyse efter artsspecifik eDNA kan således påvise spor af vandlevende arter, fx sjældne arter som løgfrø. Der er i dag udviklet og afprøvet artsspecifikke eDNA detektionssystemer til de fleste vandlevende arter, som er omfattet af habitatdirektivets artsbeskyttelse.

teknologi er således et brugbart værktøj som supplement til eller erstatning for de konventionelle undersøgelsesmetoder.

Vi har yderligere afprøvet eDNA metodens kvantitative potentiale. Hvis de målte eDNA koncentrationer er tilstrækkeligt høje, så kan prøverne sammenlignes kvantitativt. I denne sag har vi således klarlagt, at 70-80% af eDNA mængden fra løgfrø findes i én af de fire undersøgte søer. I denne sø (teknisk sø B) er der aldrig tidligere er observeret haletudser fra løgfrø.

Vi kan således konkludere, at mange løgfrøhaletudser sandsynligvis findes i den tekniske sø, men at disse ikke umiddelbart er mulige at observere og/eller fange i den store og relativt dybe lokalitet. Dette tyder på, at den tekniske sø, som primært er etableret af hensyn til drift og pleje af golfbanen, i 2018 var blandt de vigtigste ynglesteder for løgfrø på Lübker Golf Resort. Dette er en væsentlig konklusion for Syddjurs Kommunes forvaltning og administration af den særligt beskyttede løgfrø.

REFERENCER:

/1/ Hesselsoe m.fl (2005): Plejeplan for flora og fauna i projektområdet for Lübker Golf Resort. Amphibian Consult for Lübker Golf Resort

MARTIN HESSELSØE, ph.d. (MHES@niras.dk), Markedschef for natur og miljøteknologi i NIRAS A/S. MHES har siden 2011 arbejdet udvikling og anvendelse af eDNA metoder til undersøgelser af biodiversitet.

SØREN THOMSEN, biolog, Konsulent hos NIRAS A/S

PETER RASK MØLLER, Lektor og kurator for fisk, krybdyr og padder på Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet.

STEEN W. KNUDSEN, post-doc, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet.

LARS DYHRBERG BRUUN, Biolog i Syddjurs Kommune.



FIGUR 3: Udstyr til trykassisteret filtrering af vandprøver til eDNA-analyse (Foto: Martin Hesselsoe).