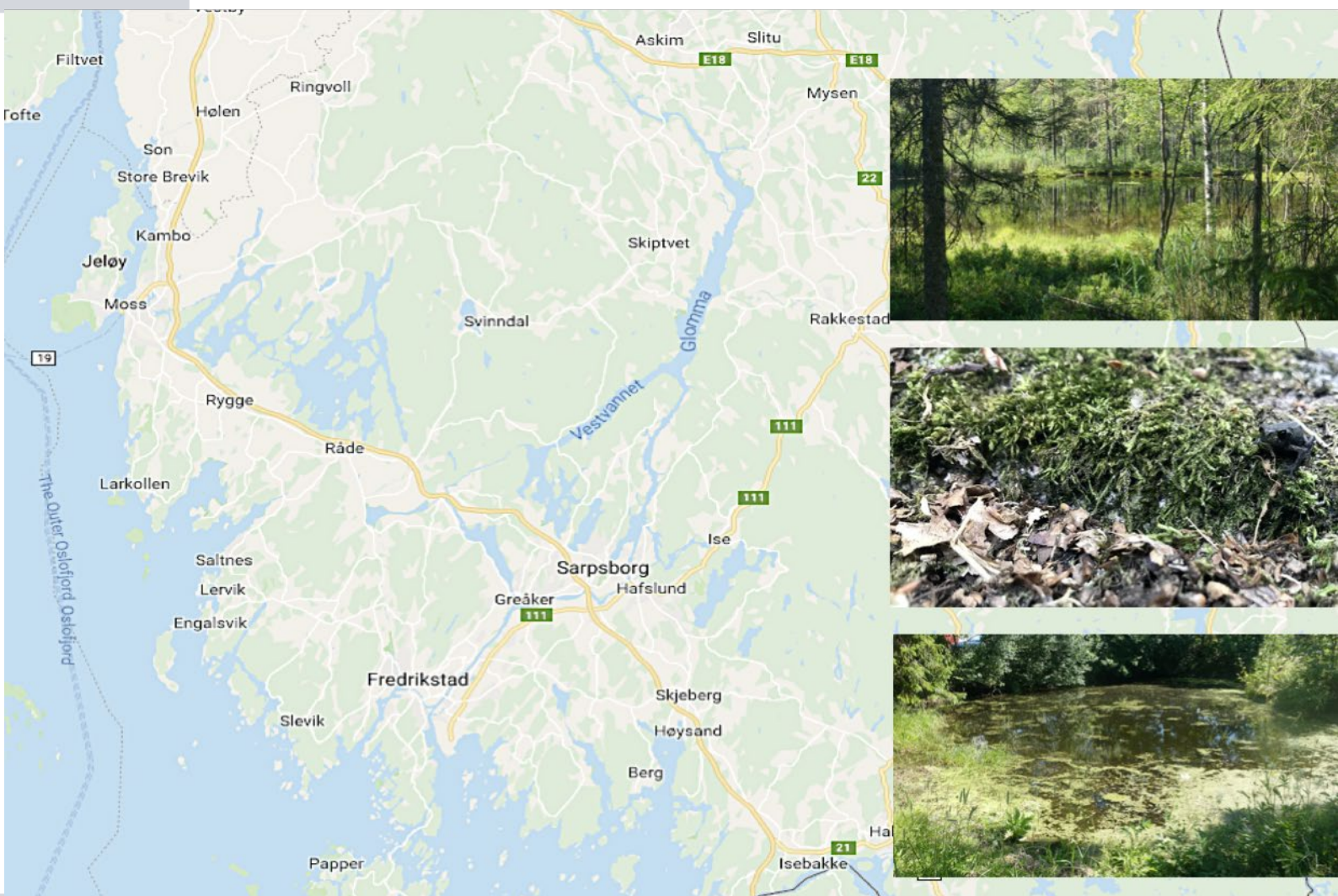


1564

NINA Rapport

## Analysér av miljø-DNA for påvisning av soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Østfold

Annette Taugbøl, Børre K. Dervo, Hege Brandsegg og Frode Fossøy



## **NINAs publikasjoner**

### **NINA Rapport**

Dette er NINAs ordinære rapportering til oppdragsgiver etter gjennomført forsknings-, overvåkings- eller utredningsarbeid. I tillegg vil serien favne mye av instituttets øvrige rapportering, for eksempel fra seminarer og konferanser, resultater av eget forsknings- og utredningsarbeid og litteraturstudier. NINA Rapport kan også utgis på annet språk når det er hensiktsmessig..

### **NINA Temahefte**

Som navnet angir behandler temaheftene spesielle emner. Heftene utarbeides etter behov og serien favner svært vidt; fra systematiske bestemmelsesnøkler til informasjon om viktige problemstillinger i samfunnet. NINA Temahefte gis vanligvis en populærvitenskapelig form med mer vekt på illustrasjoner enn NINA Rapport.

### **NINA Fakta**

Faktaarkene har som mål å gjøre NINAs forskningsresultater raskt og enkelt tilgjengelig for et større publikum. Faktaarkene gir en kort framstilling av noen av våre viktigste forskningstema.

### **Annen publisering**

I tillegg til rapporteringen i NINAs egne serier publiserer instituttets ansatte en stor del av sine vitenskapelige resultater i internasjonale journaler, populærfaglige bøker og tidsskrifter.

# Analyser av miljø-DNA for påvisning av soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Østfold

Annette Taugbøl  
Børre K. Dervo  
Hege Brandsegg  
Frode Fossøy

Taugbøl, A., Dervo, B.K., Brandsegg, H., Fossøy, F. 2018.  
Analyser av miljø-DNA for påvisning av soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Østfold. NINA Rapport 1564, Norsk institutt for naturforskning.

Lillehammer, November 2018

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-3303-3

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

Åpen

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

KVALITETSSIKRET AV

Kjetil Olstad

ANSVARLIG SIGNATUR

Forskningssjef Jon Museth (sign.)

OPPDRAKSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Fylkesmannen i Oslo og Akershus

OPPDRAKSGIVERS REFERANSE

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Catrine Curle

FORSIDEBILDE

Annette Taugbøl

NØKKEWORD

- Norge, østfold
- *Triturus cristatus*
- *Lissotriton vulgaris*
- Amfibier
- Artspåvisning
- Kartlegging
- Miljø-DNA

KEY WORDS

- Norway
- Great crested newt
- Smooth newt
- e-DNA
- Surveillance
- Amphibians

#### KONTAKTOPPLYSNINGER

**NINA hovedkontor**

Postboks 5685 Torgarden  
7485 Trondheim  
Tlf: 73 80 14 00

**NINA Oslo**

Gaustadalléen 21  
0349 Oslo  
Tlf: 73 80 14 00

**NINA Tromsø**

Postboks 6606 Langnes  
9296 Tromsø  
Tlf: 77 75 04 00

**NINA Lillehammer**

Vormstuguvegen 40  
2624 Lillehammer  
Tlf: 73 80 14 00

**NINA Bergen**

Thormøhlensgate 55  
5006 Bergen  
Tlf: 73 80 14 00

[www.nina.no](http://www.nina.no)

## Sammendrag

Taugbøl, A., Dervo, B.K., Brandsegg, H., Fossøy, F. 2018. Analyser av miljø-DNA for påvisning av soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Østfold. NINA Rapport 1564, Norsk institutt for naturforskning.

Analyser av miljø-DNA er en forholdsvis ny metode for overvåking av arter og økosystemer der innsamling av prøver ikke er avhengig av langvarig innsats eller taksonomisk ekspertise i felt. Denne metoden har vist seg å være svært effektiv med tanke på overvåking av truede arter og arter som det er vanskelig å oppdage visuelt i felt. En slik art er soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), som parasitterer huden til amfibier og som kan gi utfall i infeksjonssykdommen chytridiomykose. Denne soppen ble påvist i vannprøver fra fem lokaliteter i Akershus i 2017 og det var ønskelig å kartlegge et større område for å se på utbredelse av Bd. Det ble derfor samlet inn vannprøver fra 25 lokaliteter i Østfold, der prøvene ble testet for tilstedeværelse av Bd, storsalamander og småsalamander. Samtlige prøver var negative for Bd, 16 dammer var positive for storsalamander og 21 dammer var positive for småsalamander. Gjennomsnittlig antall DNA kopier per mL med standardavvik for storsalamander var  $5,397 \pm 14,11$ , mens det for småsalamander var  $2,884 \pm 4,66$ . Positive prøver er generelt pålitelige med metoden vi har brukt i denne analysen, og vår erfaring tilsier at falske positiver (påvisning av en art selv om det ikke finnes i lokaliteten) er svært sjeldne. Usikkerheten rundt en negativ prøve er derimot mer uviss, og det at Bd ikke ble påvist i noen av dammene kan skyldes flere årsaker, som for eksempel vannkvalitet i lokaliteten, temperatur, tetthet av arten, prøvevolumet som ble innsamlet samt behandling og analysering av prøven på lab. En negativ miljø-DNA-prøve bør derfor ikke sees på som et endelig bevis for at arten ikke finnes i lokaliteten. Med tanke på de spesielt varme temperaturforholdene sommeren 2018 og en noe manglende kunnskap om livssyklusen til Bd i våre nordlige dammer, er det gode grunner til å tro at vi enten kan ha hentet inn prøver fra dammene på et ugunstig tidspunkt, at en forhøyet vanntemperatur har ført til atferdsendringer hos vertedyrene slik at vi ikke fanger opp sporstoffer fra huden i like stor grad som i 2017, eller at syke dyr i mindre grad oppholder seg i dammene utover sommeren. Vi kan med andre ord ikke utelukke falske negative resultater for Bd og anbefaler en ny, utvidet kartlegging i 2019.

Forfattere:

- **Annette Taugbøl<sup>1</sup>, Annette.Taugbol@nina.no**
- Børre K. Dervo<sup>1</sup>, Borre.Dervo@nina.no
- Hege Brandsegg<sup>2</sup>, Hege.Bransegg@nina.no
- Frode Fossøy<sup>2</sup>, Frode.Fossoy@nina.no

<sup>1)</sup> NINA Lillehammer, Fakkeltgården, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer

<sup>2)</sup> NINA Trondheim, Postboks 5685, Sluppen, 7485 Trondheim

## Abstract

Taugbøl, A., Dervo, B.K., Brandsegg, H., Fossøy, F. 2018. Analyser av miljø-DNA for påvisning av soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Østfold. NINA Report 1564. Norwegian Institute for Nature Research.

Analyses of environmental DNA (e-DNA) is a promising method for surveying species and ecosystems, as the method is cheap and there is no demand of taxonomic expertise in the field. Further, examining environmental samples for DNA has proven efficient with concern to the detection of threatened species and species that are hard to detect in the field. One such species is the invasive fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) that parasitizes the skin of many amphibian species, often resulting in a lethal infections disease called chytridiomycosis. Bd was detected in Norway for the first time in five localities 2017 (25% of the investigated ponds in Akershus), and there was a need to extend the sampling area to further improve our knowledge of where Bd was present in Norway. As part of a research project financed by the County Governor, NINA has collected water samples from 25 different ponds in Østfold County for analysis of environmental DNA (eDNA) on Bd, where the results are summarized in this report. All samples were negative for Bd, 16 ponds were positive for northern crested newt (*Triturus cristatus*) and 21 ponds were positive for common newt (*Triturus vulgaris*). The average number of DNA-copies per mL with standard error for the northern crested newt was  $5,397 \pm 14,11$ , while the same numbers for common newt was  $2,884 \pm 4,66$ . That Bd was not detected in any of the ponds could be caused by false negative samples. Several sampling factors could lead to false negative samples, such as the time of sampling in the season and in the day, a potentially changed behaviour of infected animals, temperature in the pond, the amount of DNA leaking from the targeted species and the amount of water that was collected and filtered. Further, as each pond were only sampled once, we should therefore not treat the negative results as final. Also, with the especially warm summer of 2018, our low knowledge of how Bd's life cycle is enacting in our northern ponds and our for the most part negative results from the infected ponds from 2017 (unpublished), we believe that some of the ponds indeed are false negatives and suggest a new, extended sampling effort in the same region in 2019.

### Authors:

- **Annette Taugbøl<sup>1</sup>, Annette.Taugbol@nina.no**
- Børre K. Dervo<sup>1</sup>, Borre.Dervo@nina.no
- Hege Brandsegg<sup>2</sup>, Hege.Bransegg@nina.no
- Frode Fossøy<sup>2</sup>, Frode.Fossoy@nina.no

<sup>1)</sup> NINA Lillehammer, Fakkeltgården, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer

<sup>2)</sup> NINA Trondheim, Postboks 5685, Sluppen, 7485 Trondheim

# Innhold

<b>Sammendrag .....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>4</b>
<b>Innhold .....</b>	<b>5</b>
<b>Forord .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Innledning.....</b>	<b>7</b>
1.1 Miljø-DNA.....	7
1.2 Bakgrunn for prosjektet .....	7
1.3 Problemstilling .....	8
<b>2 Materialer og metoder .....</b>	<b>9</b>
2.1 Utvalgelse av dammer .....	9
2.2 Innsamling av vannprøver .....	10
2.3 DNA ekstraksjon og ddPCR .....	10
<b>3 Resultater .....</b>	<b>11</b>
3.1 Påvisning av arter .....	11
3.2 Resultater fra enkeltdammer .....	11
<b>4 Diskusjon.....</b>	<b>17</b>
4.1 Påvisning av arter i lokalitetene.....	17
4.2 Oppsummering og videre anbefalinger .....	17
<b>5 Referanser.....</b>	<b>18</b>
<b>6 Vedlegg.....</b>	<b>19</b>

## Forord

Soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) ble for første gang påvist i Norge i 2017, og Norge hadde dermed en ny svartelistet art i landet. For å informere om funnet ble det skrevet en egen rapport (Taugbøl et al. 2017) og det ble også utgitt informasjonsmateriell for å hindre ytterligere spredning ved annet arbeid i amfibiedammer våren 2018. Denne informasjonen ligger som vedlegg til denne rapporten og har tittelen "Unngå spredning av farlige amfibiesykdommer".

Denne rapporten oppsummerer resultater fra vannprøver samlet inn fra 24 dammer i Østfold for å eventuelt påvise forekomsten av soppen Bd. Prøvene ble også kjørt på markører for storsalamander og småsalamander. Det ble også samlet inn vannprøver i Akershus, men disse resultatene vil bli oppsummert i en egen rapport.

Prosjektet har vært finansiert av Fylkesmannen i Oslo og Akershus og ledet av undertegnede med gode innspill fra Børre Dervo. Frode Fossøy har tilrettelagt for innsamlingen av vannet og vært pådrivere for metodeuttesting og DNA- analysene er utført av Hege Brandsegg ved NINAs genetikklab i Trondheim. Vi ønsker å takke Catrine Curle hos Fylkesmannen for god tilrettelegging av prosjektet.

Lillehammer, November 2018

Annette Taugbøl  
Prosjektleder



# 1 Innledning

## 1.1 Miljø-DNA

En arts tilstedeværelse i et økosystem kan måles på mange ulike måter, der rapporteringene kan svinge fra kun påvisning av positive funn (tilstedeværelse av en art) til faktiske populasjonsdata. For mange arter kan det være krevende å dokumentere tilstedeværelse med tanke på arbeidsinnsats og økonomi. Dette kan også gjelde for vannlevende dyr, der estimerer og påvisning av arter kan avvike fra faktiske forhold på grunn av lav fangbarhet eller sesongbetonte adferdsvariasjoner. Det er viktig å vite arters utbredelse, slik man bedre forstår artenes økologiske krav og hva endringer i økologiske forhold kan forårsake over tid.

Miljø-DNA, fra det engelske *environmental* DNA (eDNA), brukes i denne rapporten om alt DNA isolert fra jord, vann og luft. Dette er en kompleks blanding av DNA-fragmenter fra ulike organismer i det gitte miljøet (Thomsen et al. 2012). Miljø-DNA representerer ideelt sett alle arter i et bestemt økosystem, der det isolerte DNAet kan avleses med arts-spesifikke genetiske markører om arten er tilstede i miljøet, og DNAet fra denne er fanget opp i prøven. Påvisning av arter er den metoden som er mest brukt i dag. Mengde DNA fra artene kan også brukes til å estimere antall individer eller biomasse av arten i lokaliteten, men dette er i mindre grad testet ut i naturlige systemer. Siden mengde DNA for en art i praksis avhenger av individenes kroppsstørrelse, "DNA-lekkasje", aktivitetsnivå, habitatvalg og temperatur kan ulike prøver tatt ved ulike tidspunkt igjennom sesongen eller ved ulike steder innen habitatet gi svært variable resultater med hensyn til populasjonsberegninger. For de fleste akvatiske dyr har man funnet ut at mengde miljø-DNA øker ved høyere tetthet, temperatur og aktivitet. Samtidig blir miljø-DNAet brutt ned av sollys (UV-lys), extracellulære enzymer og ulike kjemikalier, og vil også sedimenteres fra vannsøylen.

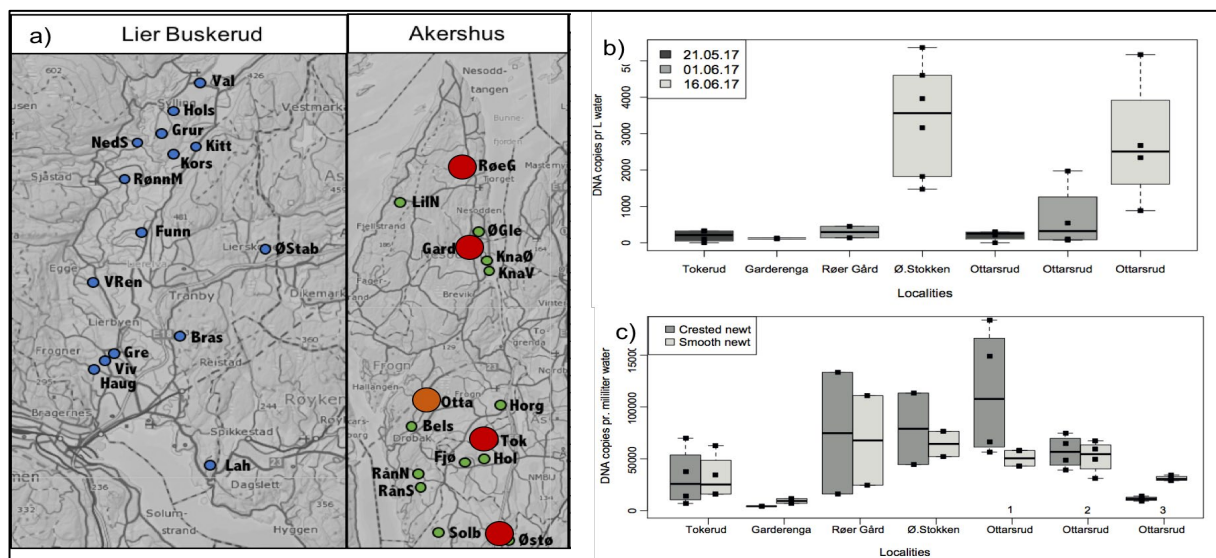
NINA har i løpet av de siste årene utviklet både prøvetakingsutstyr og molekylære verktøy for analyser av miljø-DNA og har verifiserte protokoller for mange akvatiske organismer (Fossøy et al. 2017, Taugbøl et al. 2017, Taugbøl et al. 2018).

## 1.2 Bakgrunn for prosjektet

Salamandere, og amfibier generelt, har blitt redusert i antall arter, populasjoner og individer verden over siden i hvert fall 1950-tallet. Spredning av fremmede arter som følge av menneskelig aktivitet er et globalt problem, og er sammen med klimaforandringer, blant de største truslene vi har mot biologisk mangfold i dag. For å sikre god forvaltning er det viktig å vite hva slags arter man har i bestemte miljø, samt vite noe om antall individer per art. Dette kan i seg selv være krevende, og da spesielt i akvatiske miljøer der visuell deteksjon kan være vanskelig, og omfattende fangsttinnsetser over lengre perioder er nødvendig for å kartlegge naturlig tilstand. I tillegg kan forekomster av nylig spredte fremmede arter være spesielt vanskelig å detektere på kort tid.

Patogenet *Batrachochytrium dendrobatidis*, heretter omtalt som Bd, ble for første gang påvist i Norge i 2017 ved positive funn av miljø-DNA i fem lokaliteter i Akershus (Taugbøl et al. 2017). Bd påfører amfibier infeksjonssykdommen chytridiomykose via soppens zoo-sporer da amfibier fungerer som verter for Bd og blir bærere av zoosporangier. Selve soppen ble først beskrevet i 1998 (Berger et al. 1998, Longcore et al. 1999) etter at det ble påvist at chytridiomykose var årsaken til massive nedganger av froskepopulasjoner i fjellområder i Australia på 1970-tallet (over 90% nedgang av antall eller total utryddelse av arter) (Berger et al. 1998, Laurance et al. 1996, Longcore et al. 1999, Mendelson et al. 2006). Lokalitetene i Akershus hvor det ble påvist Bd ligger relativt spredt og representerer dammer av ulike størrelser. De positive prø-

vene hadde forholdsvis lave konsentrasjoner av Bd, men ettersom resultatene var konsistente mellom ulike replikate prøver fra dammene, er det liten tvil om at soppen fantes der. En av lokalitetene (Ottarsrud) ble prøvetatt ved tre ulike tidspunkter, der 13 av 14 enkeltprøver gav positivt utslag for Bd (Taugbøl et al. 2017). Den ene negative prøven var tatt i den første innsamlingsrunden i Akershus og er trolig et resultat av lav infeksjon i dammene tidlig på året. Dette var gjeldene for alle dammene, da det var signifikant økning av Bd med tidspunkt for innsamling senere i sesongen, noe som også var forventet gitt økt temperatur og aktivitet på dyrene. Dyrene vi fanget i 2017 viste ingen tegn til infeksjon, men det kan være svært vanskelig å identifisere Bd-infiserte individer visuelt.



**Figur 1:** a) viser hvilke dammer som ble samlet inn og testet for Bd i 2017 med de fem infiserte dammene merket i oransje og rødt. b) viser miljø-DNA konsentrasjonen til Bd i de fem dammene, Ottarsrud (merket i oransje) ble samlet inn ved tre ulike tidspunkt der Bd har en økende trend gjennom sesongen. c) viser miljø-DNA konsentrasjonen for storsalamander (mørk grå) og småsalamander (lys grå) for de samme dammene og tidene som i b) der miljø-DNAet til både storsalamander og småsalamander har en negativ trend gjennom sesongen i Ottarsrud. Figuren er gjengitt med data fra Taugbøl et al. (2017) og Taugbøl et al. (2018).

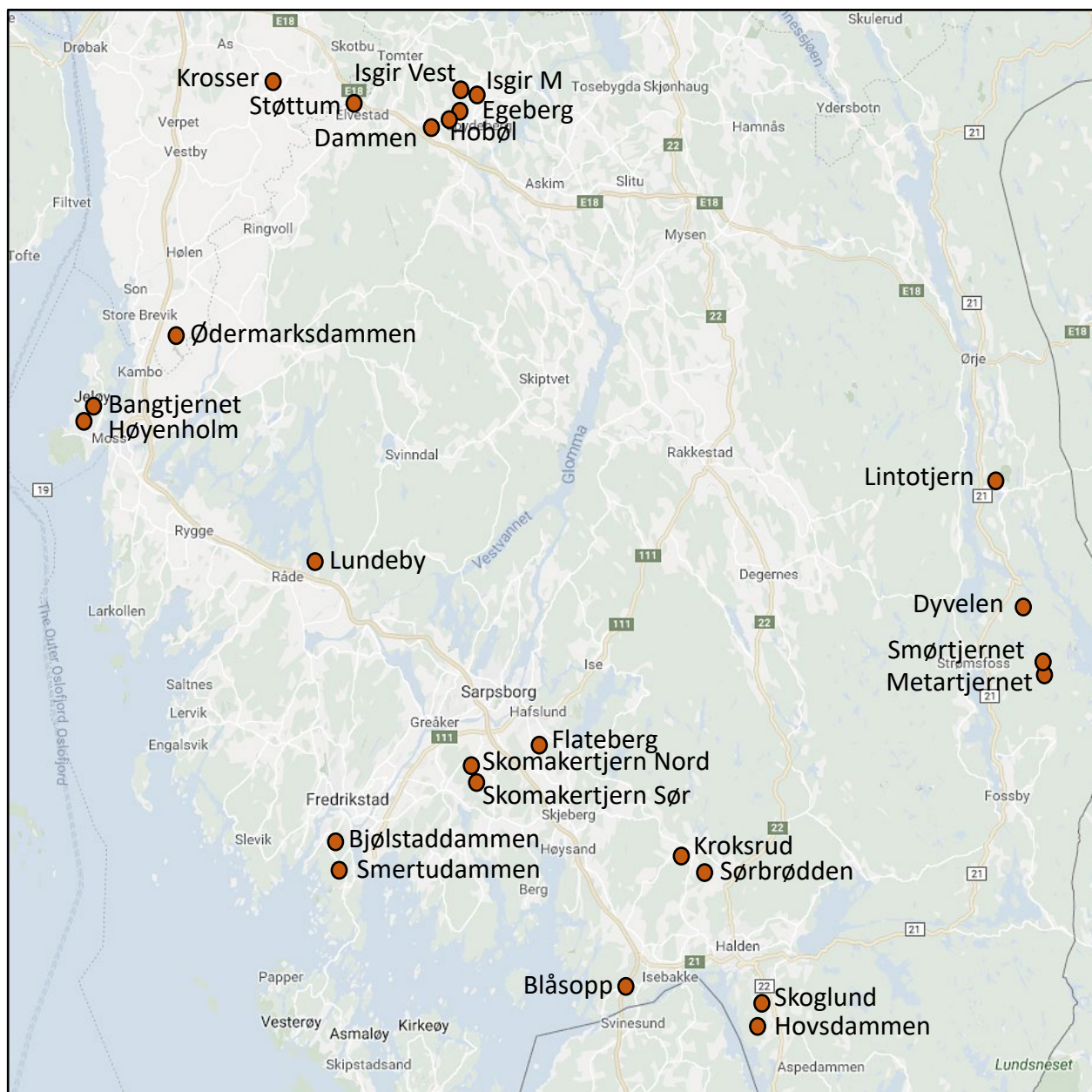
### 1.3 Problemstilling

Vi vet per i dag ikke hvor utbredt Bd er i Norge, men den geografiske spredningen i Akershus tyder på at det kan finnes flere infiserte lokaliteter. Dette kan både være lokaliteter som ikke ble prøvetatt i 2017, samt prøvetatte lokaliteter som har gitt falskt negativt resultat. Falske negative resultater kan forekomme når smittenivået er lavt; når hovedkilden til smitten forekommer i andre deler av dammene enn den vi har prøvetatt eller når prøvene har blitt samlet inn på ugunstige tider i forhold til zoospore-aktiviteten. Det kan med andre ord ikke utelukkes at flere av dammene vi undersøkte faktisk har en lav eller begynnende smitte av Bd. Det kan f.eks. tenkes at det beste innsamlingstidspunktet for å fange opp Bd i dammene er forholdsvis sent i sesongen, når soppen har gått igjennom mange smittesykluser og trolig er mer spredt i vannmassene, slik som illustrert fra Ottarsrud. Hovedfokuset frem til i dag har også vært dammer med kjente populasjoner av salamandere, mens frosk og padde trolig er hovedverter for Bd. Det er derfor ønskelig å øke det geografiske området for overvåking av Bd for å få en bedre oversikt over omfanget av smitte, og også inkludere typiske frosk og padde-dammer. Denne rapporten sammenfatter resultater fra vannprøver samlet inn i Østfold. Området ned mot svenskegrensen fra de smittede dammene i Akershus ble valgt da vi forventet et økt smitteomfang sydover, siden dette trolig er den mest sannsynlige inngangsporten for Bd opp mot Akershus. En annen mulig spredningsrisiko er utsetting av kjæledyr eller utslipp av vann fra terrarier med smittede dyr.

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Utvelgelse av dammer

På bakgrunn av informasjon fra Artsdatabanken ble det valgt ut 24 dammer for innsamling av vannprøver. De utvalgte dammene dekker et bredt geografisk område i Østfold og ble samlet inn i tidsrommet 2-13 Juli, et tidsrom som skulle egne seg bra for påvisning av Bd (Taugbøl et al. 2017).



*Figur 2.1. Kart over lokalitetene i Østfold. Posisjonene til lokalitetene er kun skissert.*

## 2.2 Innsamling av vannprøver

Innsamlingsmetoden for samtlige dammer samlet inn for denne rapporten er som følger:

- Det ble samlet inn 0,2 L vann fra 5-15 stasjoner til en oppsamlingskanne. Mange av lokalitetene var svært gjengrodde slik at det ikke alltid var mulig å spre innsamlingspunktene på flere enn 5 fornuftige steder. Ved færre innsamlingssteder ble det samlet inn mer vann per innsamlingspunkt (opp mot 1 L).
- Grunnen til at det samles inn vann fra flere stasjoner er å øke sannsynligheten for å kunne påvise DNA fra Bd samt å forsøksvis redusere naturlig variasjon mellom prøver (Taugbøl et al. 2018, Taugbøl et al. 2018).
- Fra oppsamlingskannen ble vannet filtrert ved hjelp av en batteridrevet peristaltisk pumpe som trykket vannet gjennom et 2.0 µm glassfiberfilter som fanger opp miljø-DNA.
- Filtrene ble lagret i 4 ml rør fylt opp med ATL buffer, rørene ble individuelt merket.

## 2.3 DNA ekstraksjon og ddPCR

DNAet oppsamlet i 2 µl filtrene ble isolert ved hjelp av FastDNA™ SPIN kit (MP Biomedicals). Dette er isoleringskit som tidligere har vist seg å gi god DNA-kvalitet og kvantitet fra vannprøver (Fossøy et al. 2017). For å detektere, samt kvantifisere stor og liten salamander ble det kjørt ddPCR på artsspesifikke primere. ddPCR er en PCR metode som gir en absolutt måling av DNA molekyler i prøven. I motsetning til qPCR (kvantitativ PCR) der prøven kjøres i en reaksjon og konsentrasjonen av DNA-innputtet måles ved avlesning av økt PCR-produkt på en kurve, vil prøven i ddPCR deles opp i inntil 20 000 små oljedråper der det i hver oljedråpe foregår en PCR-reaksjon. Etter endt PCR-reaksjon blir hver dråpe avlest som et positiv (1) eller negativt (0) resultat (ingen DNA molekyler i dråpen).

Det er flere fordeler med en ddPCR analyse, både at resultatene er lite påvirket av effektiviteten til PCR-reaksjonen og de genetiske markørene og at flere PCR-reaksjoner kan slås sammen slik at man kan få bedre avleste prøver mhp totalkonsentrasjon av originalt DNA-innputt. Ved å kombinere flere kjøringer vil man anta at antall DNA-kopier per dråpe vil danne en Poisson fordeling gitt ved:

$$\text{Ligning 1)} \quad [DNA] = \frac{\log(\text{antall negative dråper})}{\frac{\text{totalt antall dråper}}{\text{dråpevolum}}}$$

Videre, for å kunne kontrollere for filtrert vannvolum og mengde DNA-ekstrakt brukt i hver analyse har vi laget et mål på antall DNA kopier per liter gitt ved:

$$\text{Ligning 2)} \quad \text{DNA kopier pr L vann} = \frac{[DNA]/(\text{ddPCR volum} * \text{DNA ekstrakt volum})}{\text{mengde vann}}$$

Ved å bruke ligning 2) oppnås et standardisert mål på DNA-mengde i prøve kontrollert for filtrert vannvolum, samt ulike volumendringer og fortynninger i lab. Det er spesielt viktig å kontrollere for mengde vann filtrert for prøver samlet inn i salamanderdammer da dette ofte er vann med variabelt innhold av partikler. Vi bruker derfor dette målet gjennomgående i denne rapporten for å gjøre tolkningen av dataene lettere. For å unngå falske positive signaler, har vi satt en grense på minst fire positive dråper i analysen. Alle prøver med 1-3 positive dråper er altså antatt negative i våre analyser. Dette er en grense som har blitt satt ut i fra tidligere erfaringer fra negative kontroller på laben der det har vist seg at disse noen ganger kan ha en eller i sjeldne tilfeller to positive dråper.

## 3 Resultater

### 3.1 Påvisning av arter

Ingen av dammene undersøkt i dette studiet slo ut positivt for Bd. De fleste dammene slo ut positivt for storsalamander og småsalamander, men to av dammene i Moss (Høyenholm og Bangtjernet), samt to dammer i Aremark (Metartjern og Smørtjernet), slo ikke ut på noen av de testede artene. Av de 16 prøvene som slo ut positivt på storsalamander varierte DNA mengden mellom 0,007-55,701 DNA kopier per mL (gjennomsnitt= 5,39, standardavvik= 14,11, standardfeil= 3,52), mens det for småsalamander varierte mellom 0,007-19,378 (gjennomsnitt= 2,884, standardavvik= standardfeil= 1,01) for de 21 dammene småsalamander ble påvist.

### 3.2 Resultater fra enkeltdammer

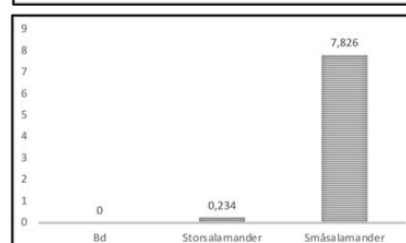
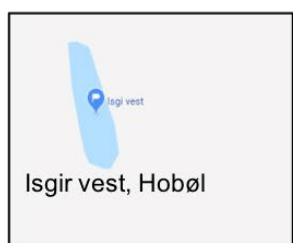
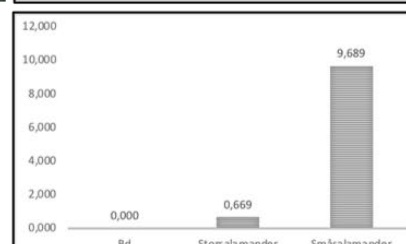
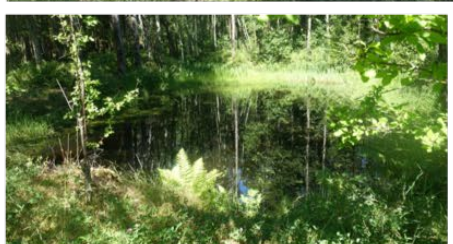
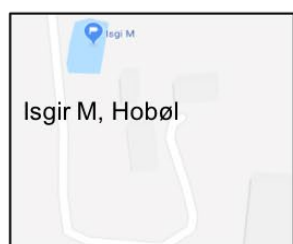
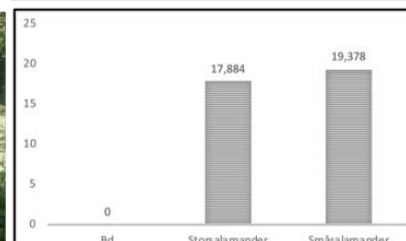
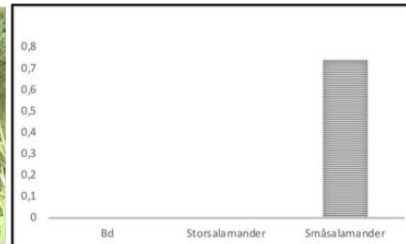
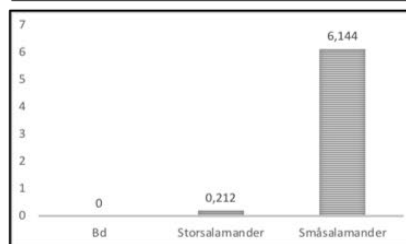
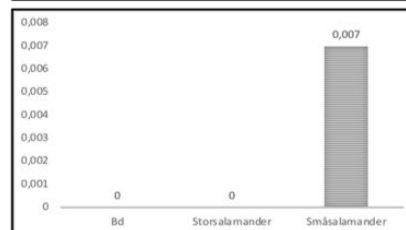
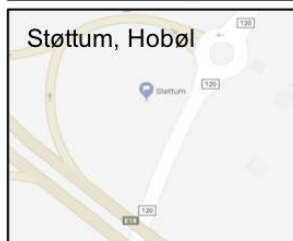
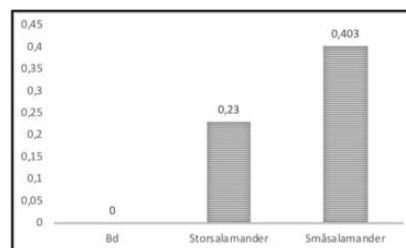
Nedenfor er resultatene oppsummert i **Tabell 3.1.** og er i tillegg gjengitt i sammen med et kartutsnitt, et bilde og et histogram for de tre artene som vannprøvene ble testet på, for hver lokalitet i **Figur 3.1.**

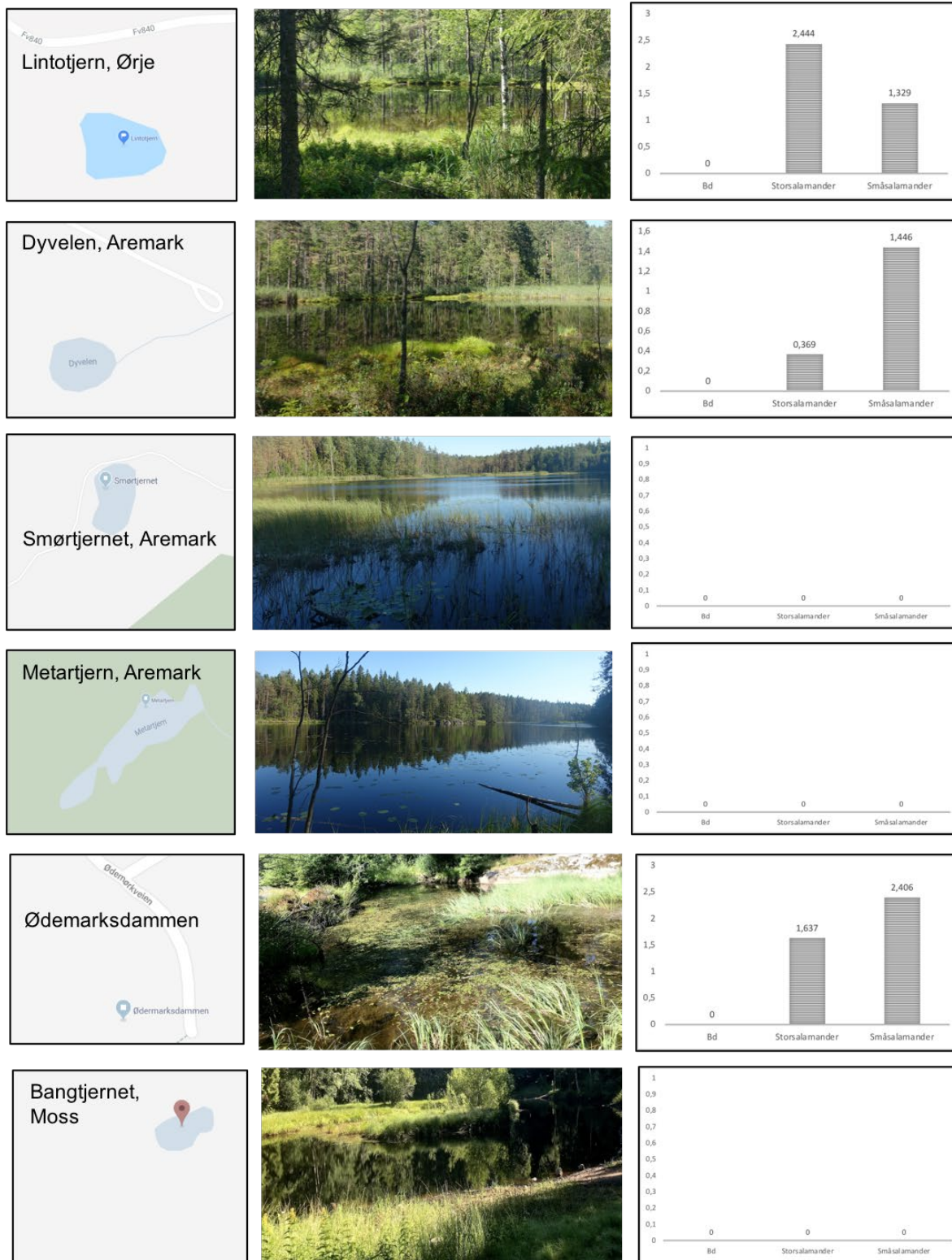
*Tabell 3.1. Informasjon om lokalitet, innsamlingsdato, vannvolum som ble filtrert, hvilken arter prøven er kjørt på og mengde DNA-kopier for arten per mL.*

Lokalitet	Innsamlings-dato	Vann-volum	Art	DNA/mL
Bangtjernet	13/07/2018	2000	Bd	0
Bangtjernet	13/07/2018	2000	Storsalamander	0
Bangtjernet	13/07/2018	2000	Småsalamander	0
Bjølstaddammen	12/07/2108	4000	Bd	0,000
Bjølstaddammen	12/07/2108	4000	Storsalamander	0,008
Bjølstaddammen	12/07/2108	4000	Småsalamander	0,453
Blåsopp	12/07/2018	2000	Bd	0
Blåsopp	12/07/2018	2000	Storsalamander	0,106
Blåsopp	12/07/2018	2000	Småsalamander	0,186
Dammen	02/07/2018	1500	Bd	0
Dammen	02/07/2018	1500	Storsalamander	0,212
Dammen	02/07/2018	1500	Småsalamander	6,144
Dyvelen	02/07/2018	2500	Bd	0
Dyvelen	02/07/2018	2500	Storsalamander	0,369
Dyvelen	02/07/2018	2500	Småsalamander	1,446
Egeberg	02/07/2018	2000	Bd	0
Egeberg	02/07/2018	2000	Storsalamander	17,884
Egeberg	02/07/2018	2000	Småsalamander	19,378
Flateberg	12/07/2018	2000	Bd	0
Flateberg	12/07/2018	2000	Storsalamander	0,196
Flateberg	12/07/2018	2000	Småsalamander	1,266
Hobøl	02/07/2018	1500	Bd	0
Hobøl	02/07/2018	1500	Storsalamander	0
Hobøl	02/07/2018	1500	Småsalamander	0,743
Hovsdammen	12/07/2018	4000	Bd	0
Hovsdammen	12/07/2018	4000	Storsalamander	0
Hovsdammen	12/07/2018	4000	Småsalamander	0,437

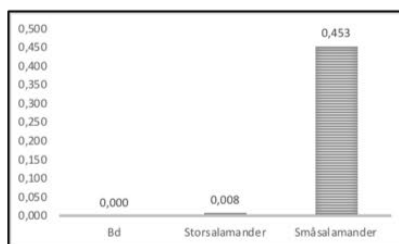
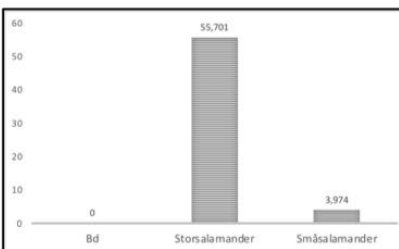
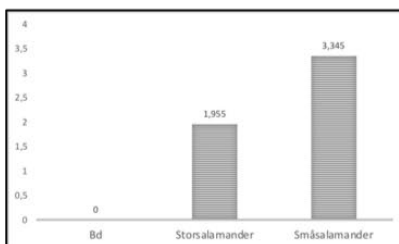
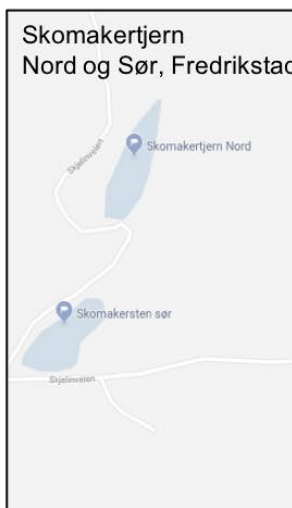
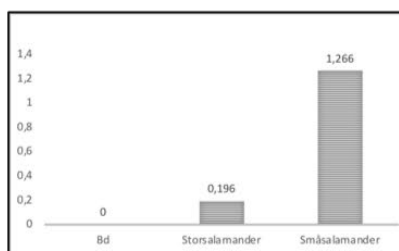
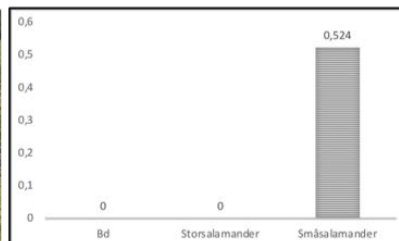
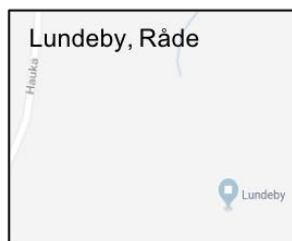
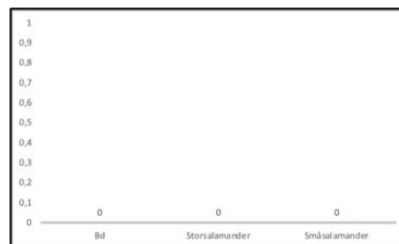
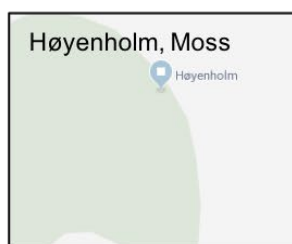
Høyenholm	13/07/2018	3000	Bd	0
Høyenholm	13/07/2018	3000	Storsalamander	0
Høyenholm	13/07/2018	3000	Småsalamander	0
Isgir liten	02/07/2018	4000	Bd	0,000
Isgir liten	02/07/2018	4000	Storsalamander	0,669
Isgir liten	02/07/2018	4000	Småsalamander	9,689
Isgir stor	02/07/2018	4000	Bd	0
Isgir stor	02/07/2018	4000	Storsalamander	0,234
Isgir stor	02/07/2018	4000	Småsalamander	7,826
Kroksrud	12/07/2018	1000	Bd	0
Kroksrud	12/07/2018	1000	Storsalamander	0
Kroksrud	12/07/2018	1000	Småsalamander	0,597
Krosser	02/07/2018	3000	Bd	0
Krosser	02/07/2018	3000	Storsalamander	0,23
Krosser	02/07/2018	3000	Småsalamander	0,403
Lintotjern	02/07/2018	4000	Bd	0
Lintotjern	02/07/2018	4000	Storsalamander	2,444
Lintotjern	02/07/2018	4000	Småsalamander	1,329
Lundeby	12/07/2018	1000	Bd	0
Lundeby	12/07/2018	1000	Storsalamander	0
Lundeby	12/07/2018	1000	Småsalamander	0,524
Metartjern	02/07/2018	1000	Bd	0
Metartjern	02/07/2018	1000	Storsalamander	0
Metartjern	02/07/2018	1000	Småsalamander	0
Skoglund	12/07/2018	4000	Bd	0
Skoglund	12/07/2018	4000	Storsalamander	4,291
Skoglund	12/07/2018	4000	Småsalamander	0,224
Skomakersten Nord	12/07/2018	3000	Bd	0
Skomakersten Nord	12/07/2018	3000	Storsalamander	1,955
Skomakersten Nord	12/07/2018	3000	Småsalamander	3,345
Skomakersten Sør	12/07/2108	4000	Bd	0
Skomakersten Sør	12/07/2108	4000	Storsalamander	55,701
Skomakersten Sør	12/07/2108	4000	Småsalamander	3,974
Smertudammen	12/07/2018	4000	Bd	0
Smertudammen	12/07/2018	4000	Storsalamander	0,007
Smertudammen	12/07/2018	4000	Småsalamander	0,014
Smørtjernet	02/07/2018	3000	Bd	0
Smørtjernet	02/07/2018	3000	Storsalamander	0
Smørtjernet	02/07/2018	3000	Småsalamander	0
Støttum	02/07/2018	4000	Bd	0
Støttum	02/07/2018	4000	Storsalamander	0
Støttum	02/07/2018	4000	Småsalamander	0,007
Sørbrøden	12/07/2018	2000	Bd	0
Sørbrøden	12/07/2018	2000	Storsalamander	0,402
Sørbrøden	12/07/2018	2000	Småsalamander	0,164
Ødemarksdammen	13/07/2018	1500	Bd	0
Ødemarksdammen	13/07/2018	1500	Storsalamander	1,637
Ødemarksdammen	13/07/2018	1500	Småsalamander	2,406

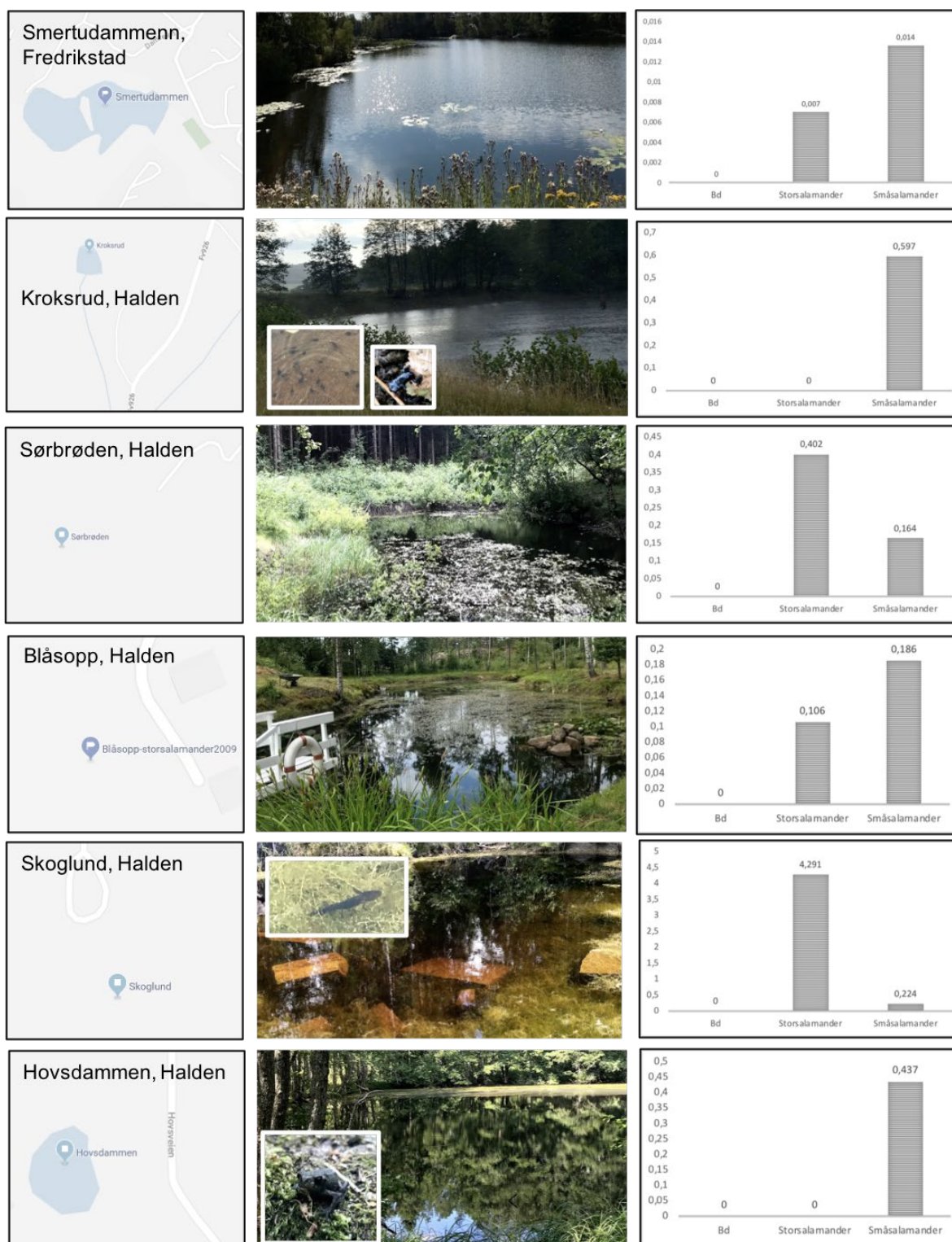












Figur 3.1. Hver lokalitet er oppsummert over en linje med kartutsnitt, bilde av dammen og et bardiagram av resultatene fra miljø-DNA prøven for *Bd*, storsalamander og småsalamander.

## 4 Diskusjon

### 4.1 Påvisning av arter i lokalitetene

I denne undersøkelsen ble storsalamander og småsalamander funnet i henholdsvis 16 og 21 av 25 prøver, mens Bd ikke ble påvist i noen av prøvene. En av utfordringene med å samle inn vannprøver er å få tatt en prøve som representerer kilden det er tatt fra, men mengden DNA per liter vann i denne analysen vil til en viss grad reflektere tettheten av dyr i lokaliteten. Tidligere testing viste at punktprøver tatt på samme tid og sted kunne være svært variable med hensyn på miljø-DNA-konsentrasjonen for de to salamanderartene (Taugbøl et al. 2018). Ved å samle inn vann fra flere punktprøver i en oppsamlingskanne har vi tidligere påvist en klar reduksjon av variasjonen mellom prøver, og resultatene blir dermed mer pålitelige.

Positive prøver er generelt pålitelige med metoden vi har brukt i denne analysen, og vår erfaring tilsier at falske positiver (påvisning av en art selv om det ikke finnes i lokaliteten) er svært sjeldne. Usikkerheten rundt en negativ prøve er derimot mer uvisst. At en art ikke blir påvist kan skyldes flere årsaker, som for eksempel vannkvalitet i lokaliteten, temperatur, tetthet av arten, prøvevolumet som ble innsamlet samt behandling og analysering av prøven på lab. En negativ miljø-DNA-prøve bør derfor ikke sees på som et endelig bevis for arten ikke finnes i lokaliteten.

Sommeren 2018 var en over gjennomsnittlig varm sommer, der vi også fikk mange negative prøveresultater på Bd fra vannprøver samlet inn fra de fem kjente infiserte dammene fra 2017 (upubliserte resultater). Vannprøvene ble samlet inn i tidsrommet 2.-13. juli, noe som etter den varme våren og forsommeren kan ha gitt dam-temperaturer som overstiger optimumet til Bd som ligger på ca. 17-25° C (Piotrowski et al. 2004). En annen mer sannsynlig årsak kan være at dyrene kan ha samlet seg mer ned mot bunnen og kjøligere vannmasser, slik at kantsonene, der vannprøvene ble samlet inn har blitt mindre eksponert for amfibie-DNA, og dermed også DNA fra Bd. I tillegg vil også den solrike sommeren ha gitt økt UV-innstråling til dammene, som igjen bryter ned miljø-DNA og reduserer oppholdstiden til miljø-DNAet (Rees et al. 2014). Tidligere studier har også vist at amerikanske oksefrosker hadde en høyere infeksjonsgrad av Bd i april (med gjennomsnittstemperatur på 8.5° C) enn juli (gjennomsnittstemperatur på 15° C) (Tinsley et al. 2015), så det kan virke som andre miljøfaktorer og/eller langvarig dvale av allerede infiserte individer, kan være fordelaktig for Bd i naturlig miljø.

### 4.2 Oppsummering og videre anbefalinger

I denne rapporten har vi samlet inn vannprøver fra 25 lokaliteter i Østfold som senere ble analysert for den patogene soppen Bd, storsalamander og småsalamander. Påvisning av Bd fra vannprøver er en relativ ny metode og vi har per i dag for liten kunnskap om livsløpet til Bd i våre skandinaviske lokaliteter. Når vi sammenligner resultatene i Akershus for 2017 og 2018 med hensyn på Bd (upubliserte resultater) ser vi også at det er stor variasjon mellom prøvetidsrommene, og langt flere negative resultater enn det som trolig er tilfelle basert på DNA analyser gjort på DNA-strykeprøver fra selve dyrene (upubliserte resultater). Hva dette kommer av er per i dag uvisst, men vi kan ikke si at Bd kun finnes i fem dammer i Akershus. Totalt sett må vi derfor anta at alle resultatene i denne rapporten er underestimater på de faktiske forholdene i dammene. Samtlige dammer burde derfor samles inn på nytt for å utelukke falske negativer, og da helst samles inn ved to eller flere tidspunkt, slik at vi kan få bedre kunnskaper om når det optimale innsamlings tidspunktet er, basert på sesong, temperatur og hvilke arter av vertsdyr som opptrer i dammen.

## 5 Referanser

- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G. & Parkes, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(15): 9031-9036.
- Fossøy, F., Dahle, S., Eriksen, L.B., Spets, M.H., Karlsson, S. & Hesthagen, T. 2017. Bruk av miljø-DNA for overvåking av fremmede fiskearter. Utvikling av artsspesifikke markører for gjedde, mort og ørekyt. NINA-Rapport 1299. Norsk Institutt for Naturforskning.
- Laurance, W.F., McDonald, K.R. & Speare, R. 1996. Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conservation Biology* 10(2): 406-413.
- Longcore, J.E., Pessier, A.P. & Nichols, D.K. 1999. *Batrachochytrium Dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. *Mycologia* 91(2): 219-227.
- Mendelson, J.R., Lips, K.R., Gagliardo, R.W., Rabb, G.B., Collins, J.P., Diffendorfer, J.E., Daszak, P., Ibanez, R., Zippel, K.C., Lawson, D.P., Wright, K.M., Stuart, S.N., Gascon, C., da Silva, H.R., Burrowes, P.A., Joglar, R.L., La Marca, E., Lotters, S., du Preez, L.H., Weldon, C., Hyatt, A., Rodriguez-Mahecha, J.V., Hunt, S., Robertson, H., Lock, B., Raxworthy, C.J., Frost, D.R., Lacy, R.C., Alford, R.A., Campbell, J.A., Parra-Olea, G., Bolanos, F., Domingo, J.J.C., Halliday, T., Murphy, J.B., Wake, M.H., Coloma, L.A., Kuzmin, S.L., Price, M.S., Howell, K.M., Lau, M., Pethiyagoda, R., Boone, M., Lannoo, M.J., Blaustein, A.R., Dobson, A., Griffiths, R.A., Crump, M.L., Wake, D.B. & Brodie, E.D. 2006. Biodiversity - Confronting amphibian declines and extinctions. *Science* 313(5783): 48-48.
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L. & Longcore, J.E. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96.
- Rees, H.C., Maddison, B.C., Middleditch, D.J., Patmore, J.R.M. & 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(5): 1450-1459.
- Taugbøl, A., Fossøy, F. & Dervo, B.K. 2018. Bruk av miljø-DNA for deteksjon av arter. Vann(01-2018).
- Taugbøl, A., Dervo, B.K., Sivertsgård, R., Brandsegg, H. & Fossøy, F. 2018. Bruk av miljø-DNA til overvåking av små- og storsalamander. NINA-Rapport 1476. Norsk Institutt for Naturforskning.
- Taugbøl, A., Dervo, B.K., Bærum, K.M., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., Ytrehus, B., Miller, A. & Fossøy, F. 2017. Første påvisning av den patogene soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge. Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter. NINA-Rapport 1399. Norsk Institutt for Naturforskning.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M. & Willerslev, E. 2012. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE* 7.
- Tinsley, R.C., Coxhead, P.G., Stott, L.C., Tinsley, M.C., Piccinni, M.Z. & Guille, M.J. 2015. Chytrid fungus infections in laboratory and introduced *Xenopus laevis* populations: assessing the risks for U.K. native amphibians. *Biological Conservation* 184: 380-388.

## **6 Vedlegg**

Vedlegg 1: Informasjonsmateriell: Unngå spredning av farlige amfibiesykdommer.





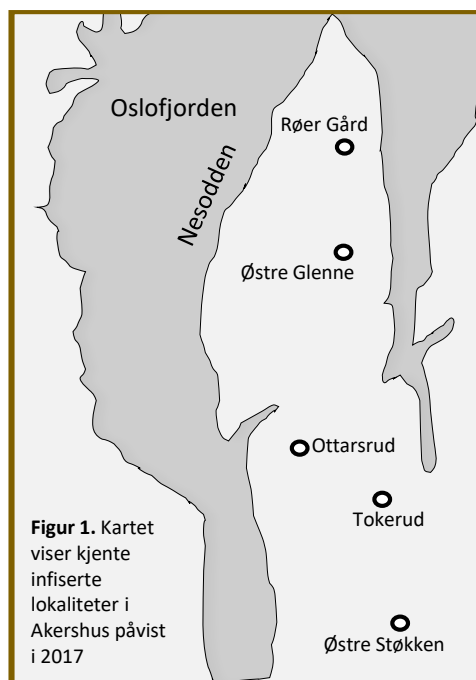
# Unngå spredning av farlige amfibiesykdommer

**Sykdommen chytridiomykose i Norge.** Chytridiomykose er en infeksjonssykdom i huden av amfibier som forårsakes av enten *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) eller *Batrachochytrium salmandriovaranans* (Bsal), to algesopparter som har amfibier som verter. Av de to soppene er det per i dag kun Bd som er påvist i Norge og det er spesielt frosk som rammes av denne. Soppen Bd ble påvist i fem lokaliteter i Akershus i 2017 (**Figur 1**). Det er derfor viktig at soppen ikke spres til flere dammer. For å unngå dette skal derfor alt av utstyr som brukes desinfiseres når flere dammer oppsøkes på samme dag, også i dammer eller områder som per i dag ikke er klassifisert som infiserte.

Lokalitetene hvor Bd er påvist ligger relativt spredt i dammer av ulike størrelser og økologi, med fellestrekk at de innehar storsalamander (**Figur 2**). Den geografiske spredningen av disse dammene tyder på at soppen kan finnes i flere lokaliteter. Mange dammer er enda ikke undersøkt for soppen, og noen lokaliteter som er prøvetatt kan også ha gitt negativt svar pga. lite sopp eller at prøven er tatt på ugunstige tider i forhold til zoosporeaktivitet (spredning av soppen i vannet).

**Sykdomsforløp:** Smittede dyr påvirkes ulikt. Mange arter kan leve med soppinfeksjonen og disse vil fungere som smittebærere i vannholdige miljø. Noen arter blir veldig påvirket og det er påvist svært hurtige hendelsesforløp fra smitte til total utryddelse av mange amfibie-arter i Australia og Sør-Amerika.

Det er vanskelig å påvise infiserte individer i felt, men deformerte munndeler hos larver og avmagrede og/eller apatisk oppførsel hos individer kan være tegn på sykdom. Metoder for å påvise chytridiomykose inkluderer histologi av vev (da må dyret være dødt), avskrapning av DNA fra soppen fra dyrenes overflate og via DNA fra soppen som filtreres direkte fra vannet (miljø-DNA).



**Figur 1.** Kartet viser kjente infiserte lokaliteter i Akershus påvist i 2017



**Figur 2.** Storsalamander hann og hunn. Børre K. Dervo©

**Amfibier i nedgang.** Amfibier generelt har blitt redusert i antall arter, populasjoner og individer verden over siden 1950-tallet. Det er mange grunner til at det står dårlig til med dagens amfibier, men en av drivkreftene som gir spesielt negativt utslag er spredning av fremmede arter som i mange tilfeller gir sykdom og død for mange av artene.

Utarbeidet av Annette Taugbøl i Norsk Institutt for Naturforskning (NINA) på oppdrag av Fylkesmannen i Oslo og Akershus i samråd med Mattilsynet og Miljødirektoratet

Les mer: Taugbøl et al. 2017. Første påvisning av den patogene soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge-Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter. NINA Rapport 1399.

## Rutiner vedrørende feltarbeid i to eller flere amfibiedammer på en dag

Det er viktig å unngå spredning av smittestoffer som sopp og andre mikroorganismer som kan være skadelig for amfibeartene våre. Det er derfor svært viktig å desinfisere alt utstyr som har vært i kontakt med vann når man forflytter seg mellom dammer, og ved feltarbeidets slutt.

Alt utstyr som har vært i kontakt med vann må desinfiseres ved en av metodene beskrevet i **tabell 1**:

Metode	Kons. eller temp.	Minimum behandlingstid
Virkon (anbefalt)	1%	7 minutter
NaCl (vanlig salt)	10%	2 minutter
NaCl (vanlig salt)	5%	5 minutter
Etanol	70%	1 minutt
Klorin	4%	1 minutt
Uttørking		100% tørt
Varme (luft eller vann)	37 C eller mer	4 timer
Varme (luft eller vann)	60 grader eller mer	5 minutter

### Anbefalte forsiktighetsregler for å unngå spredning:

- Områder av høy verdi eller høy populasjonstetthet bør besøkes først på dagen. Det er også anbefalt å ha eget utstyr som kan brukes i sårbare lokaliteter.
- Menneskelig hud innehar et naturlig forsvarssystem mot sopp. Det er allikevel bedre å holde hendene tørre enn å vaske de mellom hver lokalitet for å beholde det naturlige forsvarssystemet. Alternativt kan man bruke våtservietter med etanol som kan fås kjøpt på f.eks. apotek.
- Det skal brukes puddefrie hansker ved berøring av dyr. Hanskene skal skiftes ut eller desinfiseres jamfør tabell 1 mellom hvert dyr ved berøring. Hvis mulig bør en unngå direkte kontakt med dyrene.
- Grovrengjør utstyret på lokaliteten med f.eks. en oppvaskbørste. Ha en egnet bøtte til støvler som fylles med løsning fra **Tabell 1** for desinfisering av skosåler og en annen balje til enkel desinfisering av annet diverse utstyr. Løsningene kan gjenbrukes så sant det ikke tilføres mye væske fra utstyret for hver lokalitet. Utstyr kan også sprayes godt med 1% Virkon og tørkes i sollys.
- Legg opp en plan for desinfisering av utstyr før felt-oppstart.
- Varsle Fylkesmannen dersom det oppdages mange døde dyr i en lokalitet.

## Rutiner vedrørende feltarbeid i kun en amfibiedam på en dag

Det er viktig å unngå spredning av smittestoffer som sopp og andre mikroorganismer som kan være skadelig for amfibiartene våre. Det er derfor svært viktig å desinfisere alt utstyr som har vært i kontakt med vann ved feltarbeidets slutt.

Alt utstyr som har vært i kontakt med vann må desinfiseres ved en av metodene beskrevet i **tabell 1**:

Metode	Kons. eller temp.	Minimum behandlingstid
Virkon (anbefalt)	1%	7 minutter
NaCl (vanlig salt)	10%	2 minutter
NaCl (vanlig salt)	5%	5 minutter
Etanol	70%	1 minutt
Klorin	4%	1 minutt
Uttørking		100% tørt
Varme (luft eller vann)	37 C eller mer	4 timer
Varme (luft eller vann)	60 grader eller mer	5 minutter

### Anbefalte forsiktighetsregler for å unngå spredning:

- Det skal brukes hansker ved berøring av dyr. Hanskene skal skiftes ut eller desinfiseres jamfør tabell 1 mellom hvert dyr ved berøring. Hvis mulig bør en unngå direkte kontakt med dyrene.
- Grovrengjør sko og diverse utstyr på lokaliteten med f.eks. en oppvaskbørste. Spray gjerne ned sko og annet utstyr med en av løsningene beskrevet i tabell 1 før avreise fra lokaliteten.
- Ved innsamling av egg, planter, trevirke eller annet organisk materiale for bruk i undervisning skal dette tas med tilbake til lokaliteten eller desinfiseres før kast. Ved innsamling av egg til undervisning må alt vann som skiftes ut tilsettes en av virkemidlene i Tabell 1 før dette helles ut. Rumpetrollene må settes tilbake i dammen der de ble samlet inn fra ved undervisningens slutt.
- Varsle Fylkesmannen dersom det oppdages mange døde dyr i lokaliteten.



# Blandingsforhold av kjemikalier til desinfeksjon

Metode	Konsentrasjon	Blandeforhold
Virkon	1%	10 g til 1 L temperert vann
NaCl	10%	100 g salt tilsett vann til 1 L
NaCl	5%	50 g salt tilsett vann til 1 L
Etanol	70%	Brukes direkte
Klorin	4%	Sjekk innholdsfortegnelsen (se under)

## Ingen av produktene skal helles ut i naturen!

- **Virkon** - Fås kjøpt i ulike forretninger som bl.a. Felleskjøpet og Staples.
  - Bruk hansker ved utblanding av pulveret, les vedlegget nøye.
  - Ferdig utblandet løsning er holdbar i opptil 5 dager eller til synlig tap av rosa farge. Løsningen bør skjermes for sollys for best holdbarhet.
  - Ikke sensitiv til organisk materiale på utstyret (opp til en viss mengde).
  - Rester av 1% Virkon kan skylles ut i avløp, ubrukt pulver **må leveres inn** som farlig avfall ved bensinstasjoner eller gjenbruksstasjoner (ref. Datablad som følger produktet ved innkjøp).
- **NaCl** - (natriumsklorid) er hovedbestandene i vanlig bordsalt og kan kjøpes i matvarebutikk eller ulike dyrebutikker som selger saltvannsfisker.
  - Konsentrasjonen vil reduseres ved bruk og bør fornyes jevnlig.
  - Rester av produktet skylles ut i avløp.
- **Etanol** - Fås kjøpt på Apotek som «antibac» som inneholder 95% etanol som bør fortynnes ned til ca 70% ved blandeforholdet 6:4 eller 7:3 (ca 60%).
  - Rester av produktet blandes ned til 20% og skylles ut i avløp.
- **Klorin** - (Natriumhypokloritt) fås kjøpt i de fleste dagligvareforretninger.
  - Konsentrasjonen av klorin i produkter kjøpt i butikk er typisk på <5% og kan blandes med forholdene 1:2. Ved høyere konsentrasjon av klorin kan blandeforholdet med vann økes. Bruk høyere dosering eller lengre behandlingstid ved tvil om utblandingsforholdene.
  - Utstyret må grovrengjøres da klorin ikke er like effektiv ved tilførsel av organisk materiale i løsningen.
  - Det bør lages en ny klorløsning for hver dag.
  - Kan bleke klær og utstyr og løsninger <5% er irriterende for hud.
  - Rester av produktet tas med og leveres som farlig avfall ved bensinstasjoner eller gjenbruksstasjoner.
- Giftnformasjonens telefonnummer er **22 59 13 00**- døgnåpen telefon.

# Eksempel på protokoll for å hindre spredning

Dette eksempelet baserer seg på bruk av Virkon da dette totalt sett har en lavere biologisk påvirkning på miljøet etter bruk og er effektivt på et bredt utvalg av bakterier, sopp og virus. Det er også det billigste alternativet.

Andre løsninger i **Tabell 1** kan også brukes på lik linje med Virkon.

**Før oppstart og bruk av utstyr i dam skal alt utstyr være desinfisert.**

## Utstysliste:

- Børste.
- Minimum to par sko - ett til bruk i lokalitetene og et par som brukes mellom lokalitetene.
- Virkon.
- Beholdere for virkonløsning tilpasset størrelsen på utstyr som skal behandles. (Vi anbefaler egen beholder egnet for kun sko).
- Spraybeholder hvis utstyr skal sprayes og beholder til å spraye ned utstyret over eller i, slik at overskuddsløsning kan samles opp og gjenbrukes/ skylles ut i avløp.
- Egnede plastikkposer og lagringsbeholdere.
- Eventuelt puddefrie engangshansker.
- Oppsamlingskanne og trakt for Virkonløsning slik at den enkelt kan gjenbrukes i de ulike lokalitetene og senere enkelt helles ut i avløp.

## Alternativ fremgangsmåte:

- 1) Bland ut en 1% Virkon løsning (10g/L) med vann fra ledningsnett eller vann fra lokaliteten du besøker. Avhengig av hva slags utstyr som skal fraktes og brukes mellom lokaliteter vil du trenge ulike størrelser på egnede beholdere.
- 2) Skrubbe eller børst av gjørme, planterester og andre løse fragmenter med en børste.
- 3) Legg utstyret i Virkon-løsningen slik at det dekkes helt i minimum 7 minutter. Eventuelt kan utstyret også sprayes godt med Virkon-løsning mot en oppsamlingsbeholder som samler inn overskuddsløsningen og deretter gjennomtørkes i sollys.
- 4) Utstyr som ikke skal brukes igjen samme dag kan lagres i egnede plastikkposer for desinfisering senere. Det anbefales også å legge posene i egnede beholdere slik at de holdes helt separat fra rent utstyr.

**1)** Bland ut 1% Virkonløsning i egnet beholder. Kan brukes til den er medium rosa (bør blandes fersk hver dag).



**2)** Børst av utstyret best mulig. Husk at børsten også må desinfiseres mellom hver lokalitet



**3)** Bløtgjør utstyret helt med Virkonløsningen. Hvis utstyret sprayes må det sprayes helt ned eller gjennomtørkes før bruk.



**4)** Oppbevar desinfisert utstyr fra eventuelt skittent utstyr. Skittent utstyr som ikke skal brukes igjen kan desinfiseres ved endt arbeid.



*Norsk institutt for naturforskning, NINA,  
er en uavhengig stiftelse som forsker på natur og  
samspillet natur–samfunn.*

*NINA ble etablert i 1988. Hovedkontoret er i  
Trondheim, med avdelingskontorer i Tromsø,  
Lillehammer, Bergen og Oslo. I tillegg driver NINA  
Sæterfjellet avlsstasjon for fjellrev på Oppdal,  
og forskningsstasjonen for vill laksefisk på lms i  
Rogaland.*

*NINAs virksomhet omfatter både fors–kning  
og utredning, miljøovervåking, rådgivning og  
evaluering. NINA har stor bredde i kompetanse og  
erfaring med både naturvitere og sam–funnsvitere  
i staben. Vi har kunnskap om artene, naturtypene,  
samfunnets bruk av naturen og sammenhenger  
med de store drivkreftene i naturen.*

ISSN:1504-3312  
ISBN: 978-82-426-3303-3

## Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim

Besøks-/leveringsadresse: Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim

Telefon: 73 80 14 00, Telefaks: 73 80 14 01

E-post: [firmapost@nina.no](mailto:firmapost@nina.no)

Organisasjonsnummer 9500 37 687

<http://www.nina.no>



Samarbeid og kunnskap for framtidens miljøløsninger