

TEXTE

147/2024

Abschlussbericht

eDNA-basierte Verfahren in der behördlichen Praxis

GeDNA-Projekt

von:

Till-Hendrik Macher, Arne J. Beermann, Daniel Hering, Florian Leese
Universität Duisburg-Essen, Essen

Jonas Zimmermann
Botanischer Garten und Botanisches Museum, Freie Universität Berlin, Berlin

Herausgeber:
Umweltbundesamt

TEXTE 147/2024

REFOPLAN des Bundesministeriums Umwelt,
Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz

Forschungskennzahl 3719 23 204 0
FB001506

Abschlussbericht

eDNA-basierte Verfahren in der behördlichen Praxis

GeDNA-Projekt

von

Till-Hendrik Macher, Arne J. Beermann, Daniel Hering,
Florian Leese

Universität Duisburg-Essen, Essen

Jonas Zimmermann

Botanischer Garten und Botanisches Museum, Freie
Universität Berlin, Berlin

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber

Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel: +49 340-2103-0
Fax: +49 340-2103-2285
buergerservice@uba.de
Internet: www.umweltbundesamt.de

Durchführung der Studie:

Universität Duisburg-Essen, Aquatische Ökosystemforschung
Universitätsstraße 5
45141 Essen

Abschlussdatum:

November 2023

Redaktion:

Fachgebiet II 2.4 Binnengewässer
Jan Koschorreck, Jens Arle

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen>

ISSN 1862-4804

Dessau-Roßlau, Oktober 2024

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen*Autoren.

Kurzbeschreibung: eDNA-basierte Verfahren in der behördlichen Praxis

Mit dem Projekt „eDNA-basierte Verfahren in der behördlichen Praxis“ soll eine Flächenstudie an Fließgewässern durchgeführt werden, um das Potenzial genetischer Methoden (DNA-Metabarcoding) zur Beurteilung des ökologischen Zustands für die in der Bewertungspraxis der EG-Wasserrahmenrichtlinie genutzten (verbindlichen) Biologischen Qualitätselemente (BQEs) zu testen. Probenahme- und Laborprotokolle sollen für die drei BQEs Makrozoobenthos, Diatomeen als 'Proxies' für Phytobenthos (im Folgenden aber weiter als Diatomeen bezeichnet) und Fische bis zur Anwendungsreife im behördlichen Alltag entwickelt werden. Darüber hinaus soll geprüft werden, inwiefern neue Informationen über Organismen aus den genetischen Daten abgeleitet werden können, die genauer über den Erfolg von Renaturierungsmaßnahmen informieren und zusätzliche Informationen zur Kausalanalyse des Gewässerzustandes liefern.

Die Projektziele sind: 1) Die Validierung von DNA-Metabarcoding als Methode zur Beurteilung des ökologischen Zustands von Fließgewässern anhand einer großen Anzahl von Probestellen der vier häufigsten Fließgewässertypen und drei BQEs (Makrozoobenthos, Diatomeen, Fische) über einen Gradienten von Zustandsklassen. 2) Das Ableiten von Korrekturfaktoren, um DNA-basierte Methoden in die vorhandenen Bewertungssysteme integrieren zu können (Plausibilisierung). 3) Die Prüfung der Eignung von DNA-Metabarcoding für den Einsatz in der behördlichen Praxis inkl. Kosten-Nutzen-Bilanzierung im Vergleich zu konventionellen Bewertungsansätzen. 4) Das Entwickeln neuer Indikatoren, um biologische Prozesse nach Renaturierungen umfassender und aussagekräftiger zu beurteilen (Einbezug weiterer BQEs, kryptischer Arten etc.) und die Kausalanalyse der Daten zum ökologischen Zustand zu unterstützen.

Abstract: eDNA-based methods in regulatory monitoring

The project, "(e)DNA-based methods in regulatory context" aims to conduct a comprehensive study of river ecosystems, exploring the potential of genetic methods for assessing the ecological status of water bodies as required by the legally binding Biological Quality Elements (BQEs) specified in the European Commission's Water Framework Directive. The project will involve the development of robust sampling and laboratory protocols specifically tailored to three key BQEs: macroinvertebrates, diatoms as proxy for phyto-benthos (further referred to as diatoms), and fish, with the goal of making these methods applicable within the routine regulatory monitoring. Additionally, the project seeks to evaluate how genetic data can improve our understanding of aquatic organisms, offering more precise insights into the success of ecological restoration efforts and providing supplementary information ecological status classes.

The primary objectives of this project are as follows: 1) Validation of DNA metabarcoding as a method for assessing the ecological status of streams. This will involve collecting data from a substantial number of sampling sites representing the four most common stream types. DNA-based assessments will be conducted for three BQEs (macroinvertebrates, diatoms, fish) spanning a gradient of sites with covering all five ecological status classes. 2) Development of correction factors to facilitate the seamless integration of DNA-based methods into the existing assessment systems. These correction factors will serve as a plausibility check to ensure the reliability and consistency of genetic assessments. 3) Assessment of the suitability of DNA metabarcoding for practical regulatory applications, including a comprehensive cost-benefit analysis in comparison to conventional assessment approaches. 4) Innovation in the development of new indicators that enable a more thorough and meaningful assessment of biological processes post-restoration. This will involve considering additional BQEs, the inclusion of cryptic species, and other factors that can enhance the causal analysis of ecological status data.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	16
1.1	Biologisches Gewässermonitoring.....	16
1.2	DNA-basierte Monitoringmethoden.....	17
1.3	Implementierungsmöglichkeiten von DNA-basierten Methoden in der WRRL.....	17
1.4	Zielsetzung des GeDNA-Projektes.....	18
2	Publikationen im Rahmen des GeDNA-Projektes.....	20
2.1	TaxonTableTools: A comprehensive, platform-independent graphical user interface software to explore and visualise DNA metabarcoding data.	20
2.2	Standardized high-throughput biomonitoring using DNA metabarcoding: Strategies for the adoption of automated liquid handlers.....	20
2.3	Beyond fish eDNA metabarcoding: Field replicates disproportionately improve the detection of stream associated vertebrate species.	21
2.4	APSCALE: advanced pipeline for simple yet comprehensive analyses of DNA metabarcoding data.....	22
2.5	It's raining species: Rainwash eDNA metabarcoding as a minimally invasive method to assess tree canopy invertebrate diversity.	22
2.6	Umwelt-DNA-basiertes Monitoring an der Fischtreppe Dessau-Roßlau: Ein Vergleich mit fischereilichen Methoden.	23
2.7	Evaluating five primer pairs for environmental DNA metabarcoding of Central European fish species based on mock communities.....	23
2.8	Is it worth the extra mile? Comparing environmental DNA and RNA metabarcoding for vertebrate and invertebrate biodiversity surveys in a lowland stream.....	24
2.9	Highly resolved temporal sampling showcases the potential of environmental DNA metabarcoding for holistic biodiversity monitoring of seasonal dynamics.	25
2.10	Evaluating the state of DNA metabarcoding for ecological status class assessments of benthic invertebrates and diatoms under the Water Framework Directive.	25
3	Biologische Qualitätselemente.....	27
3.1	Makrozoobenthos.....	27
3.1.1	Material und Methoden	27
3.1.2	Ergebnisse	29
3.2	Diatomeen.....	32
3.2.1	Material und Methoden	32
3.2.2	Ergebnisse	33
4	Bewertung der Methode für den Einsatz in der behördlichen Praxis.....	38

4.1	Verifizierung, Standardisierung und Automatisierung von DNA-Metabarcoding-Arbeitsabläufen.....	38
4.1.1	Arbeitsabläufe im Labor.....	39
4.1.2	Bioinformatische Auswertung	41
4.2	Rahmenbedingungen des (e)DNA-Metabarcoding.....	41
4.2.1	Anwendbarkeit der aktuellen Probenahmemethoden und Verfügbarkeit alternativer Methoden zur Gewinnung biologischen Materials für die DNA-basierte Identifikation.....	42
4.2.2	Fehler beim DNA-basierten Artnachweis und Ähnlichkeit von DNA-basierten und konventionellen Taxa-Listen	43
4.2.3	Standardisierung und Interkalibrierung.....	43
4.2.4	Notwendigkeit der Bewertung der Abundanz und der Genauigkeit der Abundanzschätzungen mit DNA-basierten Methoden.....	47
4.2.5	Fähigkeit von DNA-basierten Methoden zur Erfassung sensibler Taxa	48
4.2.6	Nicht zugeordnete Sequenzen.....	49
4.2.7	Kosten und Verarbeitungsgeschwindigkeit im Vergleich zu traditionellen Methoden....	49
4.2.8	Wohl der Tiere, Gesundheit und Sicherheit, Umweltauswirkungen	50
4.3	Umwelt-DNA-Metabarcoding zeigt das Potenzial für die routinemäßige und langfristige Monitoring der biologischen Vielfalt auf	50
4.3.1	eDNA-Pilot-Studie an der Mulde	51
4.3.2	Umwelt-RNA-Metabarcoding	53
4.3.3	Anwendungsbeispiel für hochauflösendes Monitoring mittels eDNA-Metabarcoding.....	54
4.4	Entwicklung neuer Indices: Maschinelles Lernen	55
5	Abschlusstreffen in Berlin	59
6	Nächste Schritte	60
7	Ausblick	62
8	Quellenverzeichnis	63
A	Probenahme-Leitfäden.....	70
A.1	Makrozoobenthos.....	70
A.2	Diatomeen.....	72
A.3	Vergleich von Abundanz und Presence- / Absence-Daten	74
A.4	Agenda des Abschlusstreffens	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersicht über Individuen-basierten und Umwelt-DNA-basiertes Metabarcoding.....	18
Abbildung 2:	Workflow des GeDNA-Projektes und die jeweils zugehörigen Publikationen für die fünf Hauptaspekte Probenahme, Laborarbeit, Bioinformatik und Methoden-Vergleich.....	19
Abbildung 3:	Makrozoobenthos-Analyse der Proben, die im Rahmen des GeDNA-Projekts gesammelt wurden.....	27
Abbildung 4:	Anzahl der Arten (Venn-Diagramme) und Taxa (Balkendiagramme) vor und nach der Konvertierung in das Perloides-Format (Makrozoobenthos) für beide Datensätze. ...	29
Abbildung 5:	Paarweiser Vergleich der ökologischen Zustandsklassen zwischen den beiden Methoden. Übereinstimmende Zustandsklassen liegen auf der Diagonalen. Zusätzlich ist der Anteil der Proben pro Zustandsklasse als Balkendiagramme angegeben.	30
Abbildung 6:	Boxplots der einzelnen Metrics für die Fließgewässertypen 5 und 14. Wilcoxon-Tests wurden zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden durchgeführt. Die Farben repräsentieren die Statusklassen.	31
Abbildung 7:	Diatomeen-Analyse der Proben, die im Rahmen des GeDNA-Projekts gesammelt wurden.....	32
Abbildung 8:	Anzahl der Arten (Venn-Diagramme) und Taxa (Balkendiagramme) vor und nach der Konvertierung in das Perloides-Format (Makrozoobenthos) für beide Datensätze. ...	34
Abbildung 9:	Paarweiser Vergleich der ökologischen Zustandsklassen zwischen den beiden Methoden, mit allen Phylib-Taxa (links) und nach Taxa der diat.barcode Datenbank gefiltert (rechts). Übereinstimmende Zustandsklassen liegen auf der Diagonalen. Zusätzlich ist der Anteil der Proben pro Zustandsklasse als Balkendiagramme angegeben.....	35
Abbildung 10:	Boxplots der einzelnen Metrics für die Fließgewässertypen 5 und 14. Wilcoxon-Tests wurden zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden durchgeführt. Die Farben repräsentieren die Statusklassen.	36
Abbildung 11:	Boxplots und Punktdiagramme verschiedener internationaler Diatomeen-Indices für alle Proben des Diatomeen-Datensatzes. Wilcoxon- und Spearman-Tests wurden zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden durchgeführt. Die Farben repräsentieren die Statusklassen.	37

Abbildung 12:	DNA-Metabarcoding-Workflow, der für die Standardisierung und Hochskalierung im Labor optimiert wurde. Die Materialkosten der jeweiligen Laborschritte wurden berechnet, welche seit der Veröffentlichung weiter gesenkt werden konnten.	38
Abbildung 13:	Evaluierung von fünf Fisch-spezifischen Primern zur Detektion von Mitteleuropäischen Fischarten auf Basis eine künstlich zusammengestellte Probe. Der zurzeit am besten geeignete Primer ist der tele02-Primer, da er die wenigsten Anteile an falsch-positiven und falsch-negativen und den größten Anteil an positiven Nachweisen erbringt.....	39
Abbildung 14:	Vorgeschlagene Ebenen zur möglichen Standardisierung DNA-basierter Biodiversitätsanalysen im behördlichen Natur- und Umweltschutz.	44
Abbildung 15:	Durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert der normalisierten Metrics, welche für die ÖZK-Bewertung in Perioden für die Fließgewässertypen 5, 9, 14 und 15 relevant sind. Positive Abweichungen (blau) beschreiben eine bessere Bewertung mittels DNA-Metabarcoding, während negative Abweichungen (grün) eine schlechtere Bewertung mittels morpho-taxonomischer Bestimmung zeigen.	46
Abbildung 16:	Umwelt-DNA-Metabarcoding birgt enormes Potential für ein holistisches Biodiversitätsmonitoring von aquatischen und terrestrischen Lebensräumen und deren Schnittstellen („Blue-Green ecosystem monitoring“) durch die Analyse von Wasserproben aus Gewässern, von Regenwasser und Bodenproben.....	51
Abbildung 17:	Integration der eDNA-Metabarcoding-Verfahren in die behördliche Gewässerbewertung für den komplementären Einsatz zu fischereilichen Methoden.....	52
Abbildung 18:	Venn-Diagramme, welche die drei Datensätze am Muldewehr vergleichen. Die DNA-Metabarcoding-Daten wurden einmal herkömmlich (A) und einmal konservativ (B) ausgewertet, da nicht immer alle OTUs eindeutigen Arten zugewiesen werden können.....	53
Abbildung 19:	Schematischer Arbeitsablauf zur Veranschaulichung der Entwicklung neuer Indizes auf der Grundlage von eDNA-Proben, die parallel zur WRRL-Fischbewertung zusätzlich zu den Daten aus der chemischen Überwachung der WRRL und der Fernerkundung gesammelt wurden. Durch die Kombination von Umweltparametern und eDNA-Metabarcoding können neue Indizes entwickelt werden.....	55

Abbildung 20:	Boxplots, die die Genauigkeit des Random-Forest-Modells bei der Vorhersage der ökologischen Zustandsklasse (ÖZK), des Flusstyps und der Ökoregion auf der Grundlage von Familie, Gattung, Art und OTUs (Makrozoobenthos) und ESVs (Diatomeen) zeigen.	56
Abbildung 21:	Heatmaps, die die Abweichung von den vorhergesagten Statusklassen von Random-Forest-Modellen zeigen, die die ökologische Statusklasse (ESC) auf der Grundlage von Familie, Gattung, Art und OTUs (Makrozoobenthos) und ESVs (Diatomeen) vorhersagen.....	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Beispiele für verfügbare und validierte Primer für die drei Biologischen Qualitätselemente „benthische wirbellose Fauna“, „benthische Diatomeen“ und „Fischfauna“	40
Tabelle 2:	Analyse der Vollständigkeit von Referenz-Datenbanken und Vergleich der verfügbaren Taxa zu den Bewertungsmodulen (Perlodes, Phylib und fiBS), die im GeDNA-Projekt für die taxonomische Zuordnung genutzt wurden.	49

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
EPT	Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera
EPTCBO	Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, Coleoptera, Bivalvia, Odonata
ESC	Exact Sequence Variant
OTU	Operational Taxonomic Unit
ÖZK	Ökologische Zustandsklasse
WRRL	Wasserrahmenrichtlinie

Zusammenfassung

Mit dem durch das Umweltbundesamt geförderten Projekt „GeDNA“ sollte das Potenzial genetischer Methoden, insbesondere das DNA-Metabarcoding, für die Bewertung des ökologischen Zustands von Flüssen und Bächen evaluiert werden. Flüsse und Bäche haben in den letzten Jahrzehnten erheblich an biologischer Vielfalt und Funktionalität verloren. Die Auswirkungen zahlreicher Stressoren erfordern dringend Aufmerksamkeit und gemeinsame Anstrengungen zur Erhaltung und Wiederherstellung dieser Ökosysteme. Um diesen Herausforderungen zu begegnen, werden weltweit viele aquatische Ökosysteme in regelmäßigen Abständen untersucht. In Europa zielen die Bemühungen des behördlichen Gewässermonitorings und nachgeordnete Maßnahmen in erster Linie darauf ab, die in der Wasserrahmenrichtlinie der Europäischen Union (WRRL, 2000/60/EG) festgelegten Ziele eines guten ökologischen Zustands zu erfüllen. Hierbei stellt die Erhebung der Daten eine große Herausforderung dar, da für viele zehntausende berichtspflichtiger Gewässer regelmäßig Proben analysiert werden müssen. Die oft langen Bearbeitungszeiten klassischer Erhebungen sowie teils geringe taxonomische Auflösung sind Hauptgründe für die Suche nach komplementären Ansätzen. Da Budgets für die Umweltbeobachtung limitiert sind, ist eine wichtige Anforderung an komplementäre oder alternative Methoden zur Datenerhebung, dass es dabei zu keiner Beeinträchtigung der Vergleichbarkeit, Qualität und Zuverlässigkeit kommt. Derzeit werden für das biologische Gewässermonitoring einige neue Methoden in Betracht gezogen, insbesondere Fernerkundung, und molekulare Ansätze. In den vergangenen Jahren wurden v.a. DNA-basierte Methoden, wie z.B. DNA-Metabarcoding, als geeignete ergänzende Ansätze für die Gewässerbewertung innerhalb der WRRL vorgeschlagen. Vor einer möglichen rechtskonformen Implementierung in die WRRL-Bewertung müssen DNA-basierte Methoden jedoch einer Validierung und Interkalibrierung mit morpho-taxonomischen Methoden unterzogen werden und internationale methodische Standards erfüllen.

Vor diesem Hintergrund war das konkrete Ziel des GeDNA-Projektes, DNA-Metabarcoding als ergänzende Methode für die WRRL-Bewertung zu evaluieren und konkrete Empfehlungen für zukünftige Umsetzungsstrategien zu geben. Aspekte des gesamten DNA- und Umwelt-DNA-Metabarcoding-Workflows wurden untersucht und in insgesamt 10 peer-review Studien veröffentlicht. In einer ersten Studie wurden Einblicke in die Standardisierung und die Hochskalierung von Laborprotokollen gegeben, um den anstehenden Bedarf an Probenverarbeitung bei potenziellen DNA-basierten WRRL-Bewertungen zu decken. Hier wurden Ansätze zur Etablierung robuster und effizienter Arbeitsabläufe im Labor präsentiert, und es wurden Protokolle zur Erhöhung der Effizienz der Laborverfahren bei gleichzeitiger Gewährleistung einer zuverlässigen Verarbeitung einer großen Anzahl von Proben gegeben. Neben diesen generellen Laboraspekten spielt die Wahl der Primer zur Vervielfältigung der gewünschten Zielsequenzen („Barcodes“) eine zentrale Rolle in DNA-Metabarcoding-Analysen und hat somit einen erheblichen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Methode. Für wirbellose Organismen gibt es bereits gute Validierungsstudien. Daher wurden in der zweiten Studie Primerpaare für das eDNA-Metabarcoding von Fischen auf der Grundlage einer künstlichen Gemeinschaft von Fischarten aus Mitteleuropa bewertet. Anhand dieser Studie konnten wertvolle Erkenntnisse über die Sensitivität und Zuverlässigkeit der getesteten Primer bei der Identifizierung von Fischarten gewonnen werden. Mit den neusten Fortschritten bei den Arbeitsabläufen im Labor können DNA-Metabarcoding-Analysen jetzt auf Hunderte Proben pro Woche hochskaliert werden. Diese Zunahme des Datenvolumens bringt jedoch Herausforderungen in Bezug auf die bioinformatische Verarbeitung und Interpretation der generierten Daten mit sich. Daher wurden im Rahmen des GeDNA-Projektes zwei neu entwickelte bioinformatische Programme veröffentlicht: APSCALE und TaxonTableTools. Diese

umfassenden Programme, die sowohl für Bioinformatik-Expert:innen als auch für Anfänger:innen oder Mitarbeiter:innen in Behörden geeignet sind, bieten effiziente Lösungen zur Prozessierung und Auswertung von DNA-Metabarcoding-Datensätzen. Diese Programme können helfen, den mit der möglichen Einbeziehung von DNA-Metabarcoding-Workflows in die WRRL-Bewertung entstandenen Bedarf an Auswertungsprogrammen zu erfüllen. Der Hauptaspekt des GeDNA-Projektes war die Evaluierung von DNA-Metabarcoding als Methode für WRRL-Bewertungsroutinen. Dazu wurden im Rahmen der deutschen WRRL-Bewertung Proben von benthischen Wirbellosen und Kieselalgen entnommen. Diese Proben wurden parallel sowohl mit morpho-taxonomischen Methoden als auch mit DNA-Metabarcoding analysiert. Die Ergebnisse dieser vergleichenden Analysen lieferten wertvolle Erkenntnisse über wesentliche Kriterien für die Implementierung von DNA-basierten Methoden in den Bewertungsprozess der WRRL. Diese Erkenntnisse betrafen kritische Aspekte wie die Anwendbarkeit der derzeitigen Probenahmeverfahren, methodenspezifische Herausforderungen und die Vergleichbarkeit der beiden Ansätze. Durch die systematische Untersuchung dieser Schlüsselkriterien kann ein Grundstein für eine fundiertere und umfassendere Integration des DNA-Metabarcodings in die WRRL gelegt werden. Weitere Studien konnten das große Potenzial von Umwelt-DNA-Metabarcoding als minimalinvasive und effiziente Methode zur Bewertung der biologischen Vielfalt in Fließgewässern demonstrieren. Gerade vor dem Hintergrund zu erwartender Berichtspflichten mit Bezug auf die biologische Vielfalt (Biodiversitätsstrategie, Global Biodiversity Framework etc.) erscheint die taxonomisch hochauflösende Methode hier vielversprechend. Eine erste Studie demonstrierte die Empfindlichkeit von Umwelt-DNA-Metabarcoding für Fische durch die Analyse von Wasserproben, die an einem einzigen Tag gesammelt wurden. Die Daten wurden mit fischereilichen Methoden verglichen, die sich über mehrere Monate erstreckten. Bemerkenswerterweise lieferte der Umwelt-Metabarcoding-Ansatz genaue und umfassende Informationen über Fischarten und bewies die schnelle und effiziente Bewertung der biologischen Vielfalt von Fischen mittels Umwelt-DNA. Eine zweite Studie, die auf den gleichen Proben aufbaute, zeigte die Stärke des Umwelt-Metabarcodings, nicht nur Fischarten zu untersuchen, sondern auch Säugetiere und Vögel in einer einzigen Analyse zu bewerten. Diese Multitaxa-Ansätze eröffnen neue Wege für eine umfassende Monitoring der biologischen Vielfalt, ohne dass separate, zeitaufwändige Untersuchungen erforderlich sind. Darüber hinaus wurde in einer dritten Studie das Potenzial des Umwelt-RNA-Metabarcodings (eRNA) im Vergleich zum etablierteren Umwelt-DNA-Metabarcoding untersucht. Durch die Verwendung von eRNA kann die aktive Gemeinschaft mit Fokus auf lokalere Signale bewertet werden. Mit Hilfe dieser neuen Erkenntnisse ist es an der Zeit, den nächsten entscheidenden Schritt zu vollziehen: die aktive Planung der Einführung von (Umwelt-)DNA-Metabarcoding in das routinemäßige Fließgewässermonitoring. Durch die Integration des (Umwelt-)DNA-Metabarcodings in das Routinemonitoring kann die Genauigkeit, die Effizienz und der Umfang der ökologischen Bewertungen erheblich verbessert werden. Dieser Einsatz neuer Technologien verspricht das Verständnis der biologischen Vielfalt und der Gesundheit von Süßwasserökosystemen erheblich zu verbessern und zusätzliche Berichtspflichten zu vereinfachen.

Summary

Freshwater ecosystems have significantly lost biodiversity and functionality in recent decades. The cumulative impacts of numerous stressors require urgent attention and collaborative efforts to conserve and restore these ecosystems. To address these challenges, aquatic ecosystems worldwide are regularly examined to assess their ecological status. In Europe, the primary aim is to achieve the goals of a good ecological status outlined in the European Union's Water Framework Directive (WFD, 2000/60/EC). Despite processing hundreds of thousands of samples over the past two decades, these goals have not been met. One reason is the time and cost-intensive nature of traditional monitoring methods. Given frequently limited budgets, there is a growing need for improved data while maintaining comparability, quality, and reliability. Currently, various novel methods, such as remote sensing, imaging, and molecular approaches, are being considered. DNA-based methods, especially DNA metabarcoding, have been proposed as suitable complementary approaches for assessing water bodies within the WFD. However, before implementing DNA-based methods into WFD assessments, they must undergo validation and intercalibration with morpho-taxonomic methods while meeting international methodological standards.

The aim of the GeDNA project was to evaluate DNA metabarcoding as a complementary method for WFD assessments and provide concrete recommendations for future implementation strategies. This dissertation covered aspects of the entire DNA and environmental DNA (eDNA) metabarcoding workflow and comprised four chapters and ten studies. In the first study of the first chapter, insights were provided into standardizing and upscaling laboratory protocols to meet the anticipated demand for sample processing in potential DNA-based WFD assessments. Robust and efficient laboratory workflow approaches were presented, along with protocols to enhance the efficiency of laboratory procedures while ensuring the reliable processing of a large number of samples. The choice of primers plays a crucial role in DNA metabarcoding analyses and significantly affects the method's sensitivity. Therefore, in the second study, primer pairs for eDNA metabarcoding of fish, based on an artificial community of Central European fish species, were evaluated. This study yielded valuable insights into the sensitivity and reliability of the tested primers in species identification. With recent advancements in laboratory workflows, DNA metabarcoding analyses can now be upscaled to hundreds of samples per week. However, this increase in data volume brings challenges regarding the bioinformatic processing and interpretation of generated data. Therefore, in the GeDNA project, two newly developed bioinformatic programs were released: APSCALE and TaxonTableTools. These comprehensive programs, suitable for bioinformatics experts, beginners, and employees in government agencies offer efficient tools for processing and analyzing DNA metabarcoding datasets. These programs can help meet the demand for analysis tools that can efficiently process, manage, and analyze the generated data when incorporating DNA metabarcoding workflows into WFD assessments. The primary focus of the GeDNA project was the validation and evaluation of DNA metabarcoding as a method for WFD assessment routines. For this purpose, samples of benthic invertebrates and diatoms were collected as part of the German WFD assessment. These samples were analyzed in parallel using both morpho-taxonomic methods and DNA metabarcoding. The results of these comparative analyses provided valuable insights into critical aspects, such as the applicability of current sampling procedures, method-specific challenges, and the comparability of the two approaches. Through the systematic investigation of these key criteria, the study presented in this chapter laid the foundation for a more informed and comprehensive integration of DNA

metabarcoding into the Water Framework Directive. Other studies demonstrated the significant potential of environmental DNA (eDNA) metabarcoding as a minimally invasive and efficient method for assessing the biodiversity of freshwater ecosystems. One study showcased the sensitivity of eDNA metabarcoding for fish by analyzing water samples collected in a single day. The data were compared with fisheries-based methods that extended over several months. Remarkably, the eDNA metabarcoding approach provided accurate and comprehensive information about fish species, demonstrating the rapid and efficient assessment of fish biodiversity using eDNA. Another study, building upon the same samples, highlighted the strength of eDNA metabarcoding in assessing not only fish species but also mammals and birds in a single analysis. These multi-taxa approaches open new avenues for comprehensive biodiversity monitoring without the need for separate, time-consuming investigations. In a third study in this chapter, the potential of environmental RNA (eRNA) metabarcoding was examined in comparison to the more established environmental DNA (eDNA) metabarcoding. By using eRNA, it is possible to assess the active community with a focus on local signals. With these new findings, it is time to take the next crucial step: actively planning the introduction of (environmental) DNA metabarcoding into routine freshwater ecosystem monitoring. By integrating (environmental) DNA metabarcoding into routine monitoring, the accuracy, efficiency, and scope of ecological assessments can be significantly enhanced. This use of new technologies promises to greatly improve our understanding of freshwater ecosystem biodiversity and health.

1 Einleitung

1.1 Biologisches Gewässermonitoring

Süßwasserlebensräume sind lebenswichtig für die menschliche Gesellschaft. Trotz ihrer erheblichen Bedeutung stehen sie vor enormen Bedrohungen und Herausforderungen und zählen zu den gefährdetsten Ökosystemen der Erde (WWF 2018). In den letzten Jahrzehnten haben diese Lebensräume einen erheblichen Rückgang der biologischen Vielfalt erfahren, was direkte Auswirkungen auf den Menschen hat (Loh und Wackernagel 2004). Grund dafür ist, dass Gewässerökosysteme einer Vielzahl schädlicher Einflüsse ausgesetzt sind, darunter die Veränderung, Fragmentierung und Zerstörung von Lebensräumen (Dudgeon et al. 2006). Die Einführung und Ausbreitung invasiver Arten verändern die natürlichen Lebensgemeinschaften vieler Ökosysteme (Francis 2012). Überfischung erschöpft wertvolle aquatische Ressourcen (Allan et al. 2005), während Verschmutzungen aus verschiedenen Quellen wie Mikroplastik, Metalle und Metalloide, Abwasser und Abwässer, Sedimente und Nährstoffe die Wasserqualität weiter verschlechtern und den Zustand der Süßwasserökosysteme beeinträchtigen (Dris et al. 2015, Amoatey and Baawain 2019). Die Auswirkungen des Klimawandels, wie steigende Temperaturen und veränderte Niederschläge, sind weitere Bedrohungen für Süßwasserlebensräume (Dudgeon et al. 2006, Schneider 2011). Die kumulativen Effekte dieser vielfältigen Stressoren erfordern dringende Aufmerksamkeit und gemeinsame Anstrengungen zum Schutz und zur Erhaltung von Süßwasserökosystemen, um das Leben und das Wohlergehen von Natur und Mensch sicherzustellen.

Um diesen Herausforderungen und den kumulativen Auswirkungen auf diese essenziellen Lebensräume zu begegnen, werden weltweit viele aquatische Ökosysteme routinemäßig untersucht, um ihren ökologischen Zustand zu bewerten. In Europa zielen die Bemühungen in erster Linie darauf ab, die Anforderungen der Wasserrahmenrichtlinie der Europäischen Union (WRRL, 2000/60/EG) zu erfüllen, die im Jahr 2000 in Kraft trat. Das Hauptziel der WRRL besteht darin, bis zum Jahr 2027 einen guten ökologischen Zustand der Gewässer in der gesamten Europäischen Union zu erreichen und aufrechtzuerhalten. Dieses Routine-Monitoring der Europäischen Oberflächengewässer zielt darauf ab, sowohl den ökologischen als auch den chemischen Zustand der Süßwasserlebensräume zu bewerten. Die ökologische Überwachung konzentriert sich auf spezifische Indikatorgruppen, die als Stellvertreter für den ökologische Zustand dienen. Im Rahmen der WRRL werden mehrere Organismengruppen, die als Biologische Qualitätselemente (BQEs) bezeichnet werden, untersucht (EEA 2012, 2018). Diese BQEs umfassen unter anderem "Phytoplankton", "Aquatische Flora" („Makrophyten“ und „Phytobenthos“), "Benthische Wirbellose" und "Fische". Die Untersuchung dieser biologischen Indikatoren ermöglicht ein umfassendes Verständnis des ökologischen Zustands der Gewässer. Die ökologischen Zustandsklassen (ÖZK), die aus den Bewertungen resultieren, reichen von "sehr gut" (1) über "gut" (2), "mäßig" (3), "unbefriedigend" (4) bis hin zu "schlecht" (5). Der Gesamtstatus wird berechnet, indem der schlechteste Status aller beprobten BQEs identifiziert wird (EEA 2018).

Die Methoden zur Bewertung des ökologischen Zustands wurden ursprünglich auf bereits vorhandenen Methoden aufgebaut, wurden jedoch angepasst, um die Kompatibilität mit dem für die WRRL erforderlichen Klassifikationssystem für den ökologischen Zustand sicherzustellen. Da viele Mitgliedsstaaten bereits eigenen Methoden entwickelt und etabliert hatten, war die einheitliche Umsetzung der Bewertung des ökologischen Zustands in die WRRL erst nach einer gegenseitigen Kalibrierung möglich, um die Vergleichbarkeit der erzielten ökologischen Zustandsklassen sicherzustellen (Birk et al. 2012, Poikane et al. 2014). Dieser über ein Jahrzehnt dauernde Prozess, durchgeführt von Expert:innen der ECOSTAT-Gruppe, führte dazu, dass über

430 Methoden auf ihre grundsätzliche Vergleichbarkeit hin interkalibriert wurden. Bislang wurden die BQEs durch die morpho-taxonomische Identifikation von Proben sowie die Schätzung der Abundanz bewertet, wobei etablierte Methoden für die jeweiligen BQEs angewendet wurden.

In vielen Mitgliedsländern zeigt sich allerdings, dass die klassischen Monitoringmethoden, zeitaufwändig und dadurch kostenintensiv sind, da sie auf die Expertise taxonomischer Spezialist:innen zur Identifikation und Zählung angewiesen sind. Diese Spezialisten werden zunehmend seltener, was die Dauer von Probenahme bis zum vorliegenden Ergebnis oft erhöht. Angesichts von Budgetbeschränkungen besteht zudem ein wachsender Bedarf an Methodenoptimierung, um Kosten zu reduzieren und die Effizienz zu steigern, ohne die Vergleichbarkeit, Qualität und Zuverlässigkeit zu beeinträchtigen (Hering et al. 2018). Hierbei wurden genetische Methoden, wie DNA-Metabarcoding, als geeignete ergänzende Ansätze für die WRRL-Bewertung vorgeschlagen (Hering et al. 2018, Pont et al. 2021).

1.2 DNA-basierte Monitoringmethoden

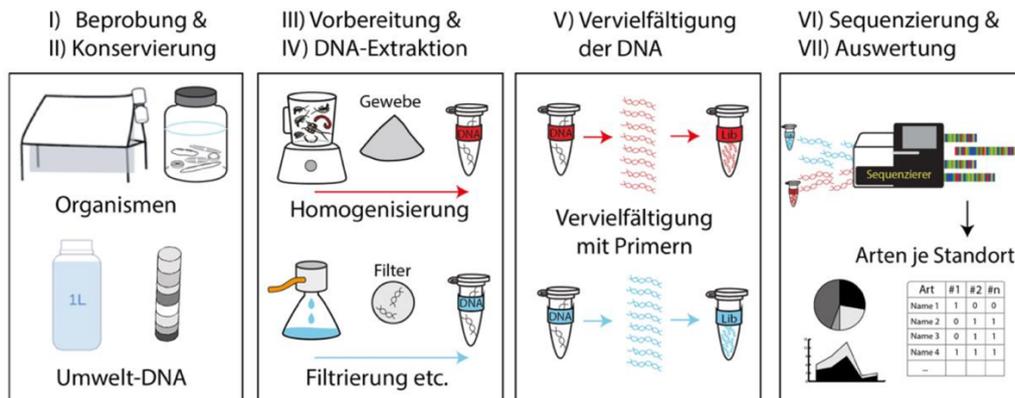
Neue Entwicklungen in der Hochdurchsatz-Sequenzierung haben DNA-basierte Identifikationsmethoden revolutioniert. Prinzipiell können viele Millionen Sequenzen in wenigen Tagen für wenige Hundert Euro generiert werden und somit viele biologische Proben mit vielen Tausenden von Individuen oder deren Umwelt-DNA-Spuren charakterisiert werden (Abbildung 1). Am häufigsten wird das DNA-Metabarcoding für Anwendungen im Bereich des Biodiversitätsmonitorings angewendet. DNA-Metabarcoding bezieht sich auf die Identifikation gesamter biologischer Proben, entweder von ganzen Organismen oder Umweltproben (Taberlet et al. 2012b). Die Methode basiert auf der Amplifikation spezifischer Zielmarker, die anschließend sequenziert werden. Im Allgemeinen bezieht sich DNA-Metabarcoding auf die Analyse von Sammelproben, ähnlich wie bei Proben, die in der WRRL-Bewertung gesammelt werden, wie Kicknet-Proben (Meier 2006). Der Begriff Umwelt-DNA-Metabarcoding (eDNA) bezieht sich auf die Analyse von Umweltproben, ohne die Zielorganismen zuerst zu isolieren (Taberlet et al. 2012a, 2018). Insbesondere die Analyse von eDNA ist an sich nicht neu und wird in der Mikrobiologie seit Jahrzehnten verwendet (Pace et al. 1986, Rondon et al. 2000, Daniel 2005, Fierer et al. 2007). Im Allgemeinen kann eDNA aus verschiedenen Materialtypen isoliert werden, wie Luft, Biofilmen, organischen Überresten, Sedimenten, Böden oder Wasser (Fahner et al. 2016, Bylemans et al. 2018a, Harper et al. 2019a, Nørgaard et al. 2021, Lynggaard et al. 2022, Pawlowski et al. 2022, Rivera et al. 2022, Roger et al. 2022). Während mikrobielle DNA den größten Anteil an eDNA-Proben ausmacht (Stat et al. 2017), ist auch DNA von Makroorganismen wie Pflanzen und Tieren vorhanden. Im Allgemeinen ist eDNA nicht unbedingt auf extrazelluläre DNA beschränkt, sondern umfasst vielmehr eine Mischung aus freier, partikelgebundener und intrazellulärer DNA aller in der Probe vorhandenen Organismen (Kirtane et al. 2023). DNA-Metabarcoding und insbesondere eDNA-Metabarcoding mit seiner minimal-invasiven Probenentnahme haben ein immenses Potenzial für groß angelegte Biodiversitätsüberwachungskampagnen und können grundlegende Veränderungen bei der Überwachung von Tieren und Pflanzen ermöglichen (Deiner et al. 2017).

1.3 Implementierungsmöglichkeiten von DNA-basierten Methoden in der WRRL

DNA-basierte Methoden bieten vielversprechende alternative oder ergänzende Ansätze für die WRRL-Bewertung. Insbesondere das DNA-Metabarcoding weist im Vergleich zu herkömmlichen

WRRL-Bewertungsmethoden klare Vorteile auf. Grundsätzlich ist die Methode ähnlich teuer, bei paralleler Analyse vieler Proben auch kostengünstiger und schneller. Zudem ist sie gut skalierbar im Vergleich zu herkömmlichen Methoden und generiert gleichzeitig robuste und oft taxonomisch hochauflösende Biodiversitätsdaten (Leese et al. 2016, Hering et al. 2018, Altermatt et al. 2020) (Leese et al. 2016, Hering et al. 2018, Altermatt et al. 2020). Vor der Implementierung von DNA-Metabarcoding in die WRRL-Bewertung müssen jedoch mehrere methodische Aspekte wie Standardisierung und Harmonisierung noch verbessert oder entwickelt werden (Hering et al. 2018, Leese et al. 2018, Zinger et al. 2019).

Abbildung 1: Übersicht über Individuen-basierten und Umwelt-DNA-basiertes Metabarcoding.



Quelle: Leese et al. (2023)

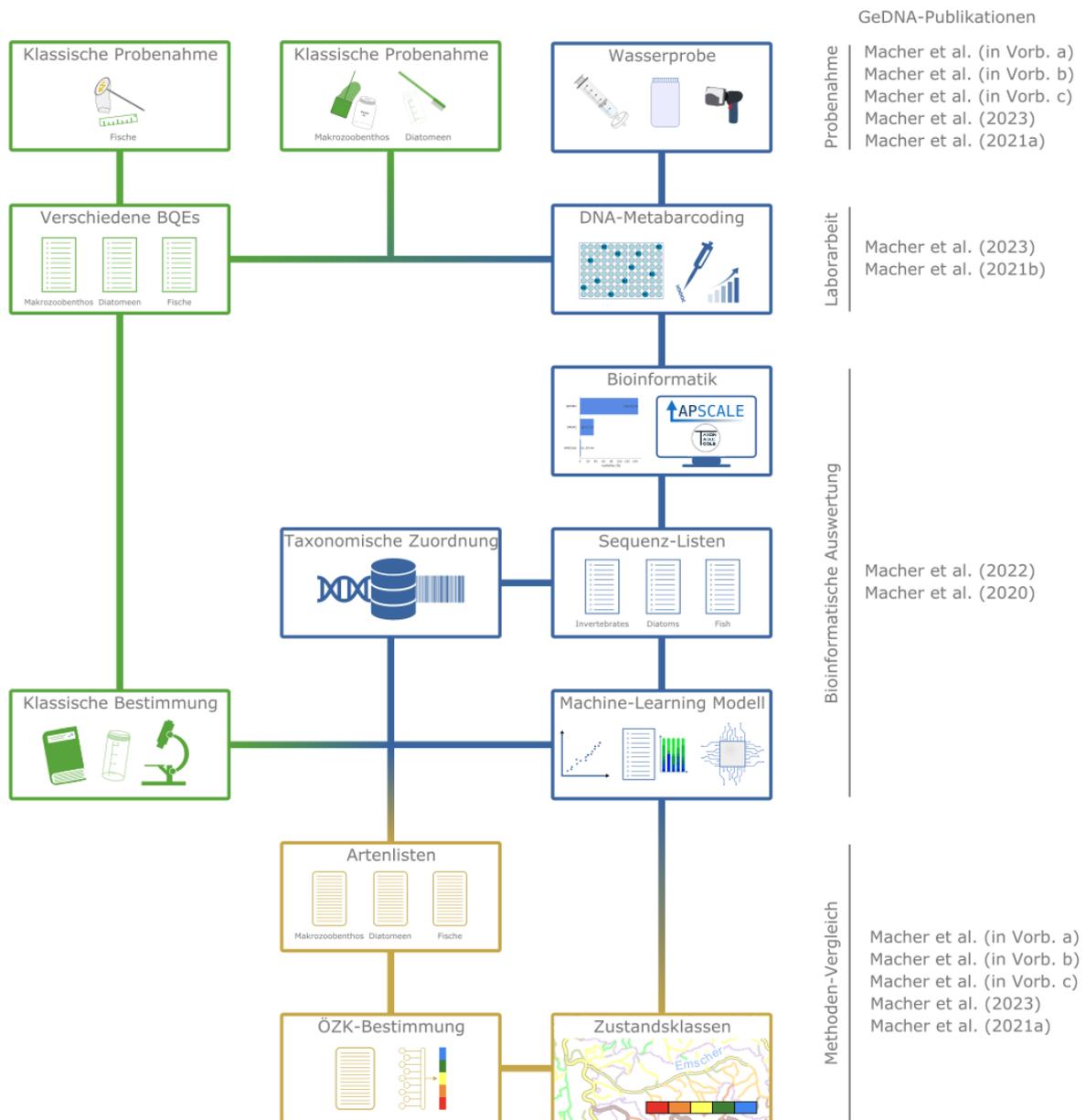
1.4 Zielsetzung des GeDNA-Projektes

DNA- und eDNA-Metabarcoding haben in den letzten Jahren in der wissenschaftlichen Forschung Anerkennung gefunden und werden zunehmend als vielversprechende Ergänzung zur WRRL-Bewertung angesehen. Bevor DNA-Metabarcoding in die WRRL-Bewertung integriert wird, sind jedoch ein fundierter Vergleich und eine Validierung zwischen DNA-basierten und morpho-taxonomischen Bewertungsmethoden unerlässlich. Um diesem Bedarf gerecht zu werden, wurde das GeDNA-Projekt (Abbildung 2) mit vier Hauptzielen ins Leben gerufen:

- 1) Die Validierung von DNA-Metabarcoding als Methode zur Beurteilung des ökologischen Zustands von Fließgewässern anhand einer großen Anzahl von Probestellen der vier häufigsten Fließgewässertypen und drei BQEs (Makrozoobenthos, Diatomeen, Fische) über einen Gradienten von Zustandsklassen.
- 2) Das Ableiten von Korrekturfaktoren, um DNA-basierte Methoden in die vorhandenen Bewertungssysteme integrieren zu können (Plausibilisierung).
- 3) Die Prüfung der Eignung von DNA-Metabarcoding für den Einsatz in der behördlichen Praxis inkl. Kosten-Nutzen-Bilanzierung im Vergleich zu konventionellen Bewertungsansätzen.
- 4) Die Entwicklung neuer Indikatoren, um biologische Prozesse nach Renaturierungen umfassender und aussagekräftiger zu beurteilen (Einbezug weiterer BQEs, kryptischer Arten etc.) und die Kausalanalyse der Daten zum ökologischen Zustand zu unterstützen.

Alle Ziele wurden im Projekt adressiert. Corona-bedingt konnten Teilaspekte nicht vollumfänglich durchgeführt werden, da in den Jahren 2020 und 2021 erhebliche Einschränkung hinsichtlich Schulung der Probenehmer:innen bestanden sowie Verbrauchsmaterialien für die Coronadiagnostik priorisiert wurden. Im Folgenden werden die Erkenntnisse am Beispiel der veröffentlichten Studien erläutert.

Abbildung 2: Workflow des GeDNA-Projektes und die jeweils zugehörigen Publikationen für die fünf Hauptaspekte Probenahme, Laborarbeit, Bioinformatik und Methoden-Vergleich.



Quelle: Dissertation Till-Hendrik Macher (2023), Universität-Duisburg-Essen

2 Publikationen im Rahmen des GeDNA-Projektes

Im Rahmen des GeDNA-Projektes sind zum Zeitpunkt des Abschlussberichtes sechs Publikationen veröffentlicht worden, ein Manuskript befindet sich im Review/in Begutachtung und zwei weitere Veröffentlichungen befinden sich in Vorbereitung. Eine zusätzliche Studie, die auf Erkenntnissen von Umwelt-DNA-Metabarcoding-Analysen innerhalb des GeDNA-Projektes entstand und sich mit Umwelt-DNA-Analysen von Baumkronen beschäftigt, wird hier zusätzlich aufgeführt. Hier werden Hauptergebnisse kurz zusammengefasst.

2.1 TaxonTableTools: A comprehensive, platform-independent graphical user interface software to explore and visualise DNA metabarcoding data.

Publikation: Macher et al. (2021a) Molecular Ecology Resources

Zusammenfassung: DNA-Metabarcoding wird zunehmend als Werkzeug zur Bewertung der Biodiversität in Forschung und Umweltmanagement eingesetzt. Zur Verarbeitung der Rohdaten stehen leistungsstarke Softwarelösungen zur Verfügung. Allerdings können die Umwandlung von Sequenzdaten in biologische Informationen und die nachfolgenden Analysen für Endbenutzer mit begrenzten Kenntnissen in der Bioinformatik schwierig sein. Daher besteht ein wachsender Bedarf an benutzerfreundlicher Software mit grafischer Benutzeroberfläche (GUI), um DNA-Metabarcoding-Daten zu analysieren und zu visualisieren. Hier stellen wir TaxonTableTools (TTT) vor, eine neue plattformunabhängige GUI, die diese Lücke schließen soll, indem sie einfache, reproduzierbare Analyse- und Visualisierungsworkflows anbietet. TTT verwendet als Grundlage eine "TaXon-Tabelle", ein Datenformat, das leicht in TTT aus zwei Eingabedateien erstellt werden kann: einer Read-Tabelle und einer Taxonomie-Tabelle, die mithilfe verschiedener veröffentlichter Metabarcoding-Pipelines erstellt werden können. TTT-Analyse- und Visualisierungsmodule umfassen Venn-Diagramme zum Vergleich der Taxon-Überschneidung zwischen Replikaten, Proben oder Analysemethoden. TTT analysiert und visualisiert grundlegende Statistiken wie den Read-Anteil pro Taxon sowie anspruchsvollere Visualisierungen wie interaktive Krona-Diagramme. Verschiedene ökologische Analysen, einschließlich Schätzungen der Alpha- oder Beta-Diversität und Ordinationsanalysen, können direkt erstellt werden. Metabarcoding-Daten können einfach in Formate umgewandelt werden, die für Analysen von Daten im Routinemonitoring erforderlich sind. Darüber hinaus kann TTT interaktive Grafiken in HTML-Format erstellen, die in jedem Webbrowser dargestellt werden können. Die Software wird mit einer Anleitung und einem Tutorial geliefert, ist kostenlos und öffentlich über GitHub (<https://github.com/TillMacher/TaxonTableTools>) oder den Python Package Index (<https://pypi.org/project/taxontabletools>) verfügbar.

2.2 Standardized high-throughput biomonitoring using DNA metabarcoding: Strategies for the adoption of automated liquid handlers.

Publikation: Macher et al. (2021b) Environmental Science & Ecotechnology

Zusammenfassung: Zuverlässige und umfassende Monitoringdaten sind erforderlich, um den Verlust der Biodiversität nachzuvollziehen und entgegenzuwirken. DNA-Metabarcoding-Analysen von Sammelproben oder aus Wasser- oder Sediment-Proben (Umwelt-DNA) hat das Biomonitoring revolutioniert, da es die schnelle Bewertung der Biodiversität über alle trophischen Ebenen hinweg mit vertretbarem Aufwand und zu moderaten Kosten ermöglicht. DNA-Metabarcoding hat das große Potential hochskaliert zu werden, um Hunderte von Proben

parallel zu verarbeiten. Während automatisierte Hochdurchsatz-Analysen im medizinischen Bereich bereits etabliert sind, dominiert in Biomonitoring-Laboren immer noch die manuelle Probenverarbeitung, was die Skalierbarkeit und Standardisierung für Anwendungen im Routinemonitoring begrenzt. Hier präsentieren wir einen automatisierten, skalierbaren und reproduzierbaren Metabarcoding-Workflow zur Extraktion von DNA aus Sammel-Proben, zur Durchführung von PCR und Vorbereitung der Proben zur Sequenzierung auf einem Pipettierroboter. Wesentliche Merkmale sind die unabhängige Replikation der Proben im gesamten Workflow und die Verwendung vieler negativer Kontrollen zur Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle. Wir haben zwei Datensätze generiert: i) einen Validierungsdatensatz, der aus 42 individuellen Arthropoden verschiedener Arten bestand, und ii) einen Routinemonitoring-Datensatz, der aus 60 Sammelproben von Makroinvertebraten bestand. Als Marker haben wir das mitochondriale COI-Gen verwendet. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der entwickelte Pipettierroboter-Workflow frei von laborbedingter Kontamination ist und äußerst konsistente Ergebnisse liefert. Geringfügige Abweichungen zwischen den Replikaten sind größtenteils auf stochastische Unterschiede für OTUs mit geringer Häufigkeit zurückzuführen. Somit haben wir erfolgreich demonstriert, dass die robotergesteuerte Laborarbeit zuverlässig von der DNA-Extraktion bis zur abschließenden Vorbereitung der Sequenzierung auf einem einzelnen Roboter durchgeführt werden kann. Dies erhöht die Durchsatzleistung erheblich, reduziert Kosten und steigert die Datenrobustheit für die Bewertung der Biodiversität und das Monitoring.

2.3 Beyond fish eDNA metabarcoding: Field replicates disproportionately improve the detection of stream associated vertebrate species.

Publikation: Macher et al. (2021c) Metabarcoding and Metagenomics

Zusammenfassung: Schnelle, zuverlässige und umfassende Biodiversitäts-Monitoringdaten sind für umweltbezogene Entscheidungsprozesse und das Management unerlässlich. Aktuelle Forschungen zur Metabarcoding-Analyse von Umwelt-DNA von Fischen zeigen, dass aquatische Vielfalt schnell, zuverlässig und nicht-invasiv zu moderaten Kosten erfasst werden kann. Da Wasser in einem Einzugsgebiet zum niedrigsten Punkt der Landschaft fließt, oft einem Fluss, kann es entlang seines Weges oder beim direkten Kontakt mit Wasser Spuren terrestrischer Arten akkumulieren, beispielsweise über Oberflächen- oder Untergrundabflüsse oder wenn Exemplare mit Wasser in Berührung kommen (z. B. beim Trinken). Die eDNA-Metabarcoding-Daten von Fischen können daher Informationen über Fischarten sowie über andere Wirbeltierarten, die in Auenhabitaten leben, liefern. Diese zusätzlichen Daten können einen wesentlich umfassenderen Ansatz zur Beurteilung der Wirbeltiervielfalt bieten, ohne zusätzliche Kosten zu verursachen. Studien darüber, wie die Probenahmestrategie die Erfassung von Arten, insbesondere von in Gewässern lebenden Gemeinschaften, beeinflusst, sind jedoch rar. Daher haben wir eine Analyse zu den Auswirkungen von Feld-Replikaten sowohl auf die Erfassung von Fischarten als auch von (semi-)terrestrischen Arten durchgeführt. Entlang eines 2 km langen Abschnitts des Flusses Mulde in Deutschland haben wir 18 Wasserproben von je 1 Liter gesammelt und die Beziehung zwischen der detektierten Artenvielfalt und der Anzahl der entnommenen Feld-Replikate analysiert. Dabei wurden insgesamt 58 Wirbeltierarten erkannt, darunter 25 Fischarten und Neunaugen, 18 Säugetiere und 15 Vögel, die 50 %, 22,2 % bzw. 7,4 % aller heimischen Arten in Sachsen-Anhalt ausmachen. Die Erhöhung der Anzahl der Feld-Replikate führte jedoch nur zu 24,8 % mehr erkannten Fischarten und Neunaugen, während die Artenvielfalt der Säugetiere und Vögel überproportional um 68,9 % bzw. 77,3 % zunahm. Im Gegensatz dazu zeigten PCR-Replikate nur geringe Stochastizität. Daher scheint es effektiver, die Anzahl der Feld-Replikate zu erhöhen, wenn das Ziel darin besteht, die allgemeine

Arterfassung zu verbessern. Dies gilt insbesondere, wenn der Fokus auf seltenen aquatischen Taxa oder auf (semi-)terrestrischen Arten, dem sogenannten 'Beifang', liegt. Dieser Informationsgewinn kann ohne zusätzlichen Probenahme- oder Laboraufwand erzielt werden, wenn die Probenahme-strategie sorgfältig ausgewählt wird. Mit der zunehmenden Verwendung von eDNA-Metabarcoding als Teil nationaler Programme zum Fisch-Monitoring können die ergänzenden Informationen über den Beifang für die Biodiversitäts-Monitoring und den Naturschutz auf einer deutlich breiteren Ebene genutzt werden.

2.4 APSCALE: advanced pipeline for simple yet comprehensive analyses of DNA metabarcoding data.

Publikation: Macher et al. (2022) Bioinformatics

Zusammenfassung: DNA-Metabarcoding ist ein aufstrebender Ansatz zur Bewertung und Überwachung der weltweiten Biodiversität, und infolgedessen nimmt die Anzahl und Größe der Datensätze exponentiell zu. Bisher existiert keine veröffentlichte Software für DNA-Metabarcoding, die (i) plattformunabhängig ist, (ii) benutzerfreundlich ist (einschließlich einer grafischen Benutzeroberfläche (GUI)), (iii) schnell ist (skaliert gut mit der Datensatzgröße) und (iv) den Datenschutzbestimmungen von Umweltbehörden entspricht. Die vorgestellte Pipeline APSCALE erfüllt diese Anforderungen und bewältigt die gängigsten Aufgaben bei der Verarbeitung von Sequenzdaten, wie das „paired-end merging“, das „primer trimming“, das Qualitätsfiltern, das Clustern und das Rauschunterdrücken jedes beliebigen Metabarcoding-Markers, wie den Internal Transcribed Spacer, 16S oder das Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit I. APSCALE gibt es in einer Befehlszeilen- und einer GUI-Version. Letztere bietet Benutzer:innen zusätzliche Optionen für Zusammenfassungenstatistiken und Links zu GUI-basierten Anwendungen in der weiteren Verarbeitung. APSCALE ist in Python geschrieben, einer plattformunabhängigen Sprache, und integriert Funktionen der Open-Source-Tools VSEARCH (Rognes et al., 2016), cutadapt (Martin, 2011) und LULU (Frøslev et al., 2017). Alle Module unterstützen Multithreading, um die schnelle Verarbeitung größerer Datensätze für das DNA-Metabarcoding zu ermöglichen. Weitere Informationen und Problembearbeitungshinweise finden sich auf den entsprechenden GitHub-Seiten für die Befehlszeilenversion (<https://github.com/DominikBuchner/apscale>) und die GUI-Version (https://github.com/TillMacher/apscale_gui), einschließlich eines ausführlichen Tutorials. Zusätzliche Daten sind online in Bioinformatics verfügbar.

2.5 It's raining species: Rainwash eDNA metabarcoding as a minimally invasive method to assess tree canopy invertebrate diversity.

Publikation: Macher et al. (2023a) Environmental DNA

Zusammenfassung: Baumkronen sind äußerst vielfältige Ökosysteme, aber trotz mehrerer Jahrzehnte intensiver Forschung bestehen nach wie vor erhebliche Wissenslücken hinsichtlich ihrer Biodiversität und ökologischen Interaktionen. Eine grundlegende Herausforderung in der Erforschung von Baumkronen besteht in der begrenzten Zugänglichkeit dieses Ökosystems. Folglich stützten sich frühere Studien entweder auf stark invasive Methoden wie chemische Bekämpfung oder auf zeitaufwändige und teure Einrichtungen wie Baldachinwege oder Kräne. Daher sind zeitsparende, kosteneffiziente und idealerweise minimalinvasive, aber dennoch umfassende Ansätze erforderlich, um diese Wissenslücke zu schließen. DNA-Metabarcoding-Analysen von Umwelt-DNA (eDNA), die aus Wasser, Boden oder Luft gesammelt wird, bietet eine minimalinvasive Methode zur Biodiversitätsbewertung. Dennoch wurde ihr Potenzial zur Überwachung der Biodiversität von Baumkronen bisher nicht erkundet. In dieser Studie haben

wir Metabarcoding-Analysen von Umwelt-DNA durchgeführt, welche durch Regenwasser aus den Baumkronen gespült wurde, um das Potenzial dieser Methode für terrestrisches Biodiversitätsmonitoring und ökologische Forschung zu untersuchen. Wir platzierten vier 1 m² Regensammler unter vier verschiedenen Bäumen (Buche, Eiche, Lärche und Kiefer) vor einem größeren Regenereignis, filterten die Umwelt-DNA aus dem gesammelten Regenwasser und führten eine Metabarcoding-Analyse des Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit-I-(COI)-Gens durch, um die Wirbelosengemeinschaft zu erfassen. Darüber hinaus sammelten und identifizierten wir alle Exemplare die in den Regensammler gefallen sind, um zu beurteilen, ob die eDNA nur von physisch im Regenwasser vorhandenen Exemplaren stammte. Insgesamt konnten 50 Arten von Wirbellosen durch die Umwelt-DNA-Metabarcoding-Analysen detektiert werden, von denen 43 nicht physisch im Wasser vorhanden waren und somit wahrscheinlich echte Signale der Biodiversität des Waldbaldachins darstellten. Darüber hinaus beobachteten wir unterschiedliche Muster in dem Vorkommen der Arten, die den vier Bäumen entsprachen, was nahelegt, dass ökologische Muster wie die Wirtsspezifität potenziell mit dieser Methode bewertet werden können. Zusammenfassend bietet unsere Studie einen Nachweis dafür, dass das eDNA-Metabarcoding von Regenwasser eine minimalinvasive und umfassende Methode für die Biodiversitätsüberwachung in Baumkronen darstellt.

2.6 Umwelt-DNA-basiertes Monitoring an der Fischtreppe Dessau-Roßlau: Ein Vergleich mit fischereilichen Methoden.

Publikation: Macher et al. (2023b) Wasserwirtschaft

Zusammenfassung: Es werden schnelle, zuverlässige, umfassende und kosteneffiziente Biodiversitätsdaten benötigt, um Umweltbewertungen und Entscheidungsfindungen in der Wasserwirtschaft zu unterstützen. In dieser Studie haben wir untersucht, ob Umwelt-DNA-Metabarcoding-Ansätze diese Anforderungen für des Fischmonitorings erfüllen können. Im April 2019 haben wir entlang eines 2 km langen Abschnitts des Flusses Mulde (Deutschland) an einem einzigen Tag 18 Wasserproben zu je 1 Liter gesammelt, parallel zu einem umfassenden Fischmonitoring, das über 17 Wochen an der Fischtreppe in Dessau-Roßlau durchgeführt wurde. Darüber hinaus standen Daten aus dem Fischmonitoring der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) für die Jahre 2017-19 desselben Standorts zur Verfügung. Insgesamt wurden 33 Fischarten mit allen drei Probenahmestrategien nachgewiesen. Die höchste Anzahl von Arten wurde durch Umwelt-DNA-Metabarcoding nachgewiesen (28 Arten), gefolgt von der Fischereiüberwachung an der Fischtreppe (27) und der WRRL-Überwachung (22). Im direkten Vergleich mit dem auf Umwelt-DNA basierenden Ansatz wies die Bewertung an der Fischtreppe eine höhere Übereinstimmung der nachgewiesenen Arten auf (23 von 32 Arten, die von beiden Methoden nachgewiesen wurden) als die WRRL-Überwachungsdaten (19 von 31). Obwohl auf Umwelt-DNA basierende Methoden derzeit auf die Beurteilung der Artenzusammensetzung beschränkt sind, könnten in Zukunft auch Daten zur Abundanz und sogar Alterszusammensetzung generiert werden. Hier kann die kluge Kombination von fischereibasierten Methoden mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung des Umwelt-DNA-Metabarcodings dazu beitragen, ein besseres Verständnis für Veränderungen im Ökosystem zu gewinnen und somit die Wasserwirtschaft zu verbessern.

2.7 Evaluating five primer pairs for environmental DNA metabarcoding of Central European fish species based on mock communities.

Publikation: Macher et al. (2023c) Metabarcoding and Metagenomics

Zusammenfassung: Die Analyse von Umwelt-DNA (eDNA) mittels Metabarcoding ist zu einem leistungsstarken Instrument zur Untersuchung von Fischgemeinschaften geworden. Die Etablierung methodischer Standards und die Integration von eDNA-basierten Bewertungen in das behördliche Monitoring (z. B. die Wasserrahmenrichtlinie) ist jedoch von großer Dringlichkeit. Um methodische Genauigkeit sicherzustellen und behördlichen Standards gerecht zu werden, wurden verschiedene Probenahme-, Labor- und bioinformatische Workflows etabliert. Eine entscheidende Voraussetzung für ein umfassendes Fischmonitoring ist jedoch die Auswahl geeigneter Primer-Paare, um die vorhandene Fischfauna genau abzubilden. In den letzten zehn Jahren wurden verschiedene fischspezifische Primer-Paare veröffentlicht, die auf verschiedene genetische Markerregionen abzielen. Es wurde jedoch noch keine spezielle Studie durchgeführt, um die Leistung häufig verwendeter Fischprimer-Paare zur Bewertung von mitteleuropäischen Fischarten zu bewerten. Daher haben wir eine künstliche Gemeinschaft aus DNA von 45 mitteleuropäischen Fischarten erstellt und die taxonomische Auflösung und Reproduzierbarkeit von fünf Fischprimer-Paaren untersucht. Unsere Studie hebt die Auswirkungen der Primerwahl und der bioinformatischen Filterung auf das Ergebnis von eDNA-Metabarcoding hervor. Von den in unserer Studie bewerteten fünf Primer-Paaren erwies sich das Tele02-Primer-Paar (12S-Gen) als die beste Wahl für das eDNA-Metabarcoding von Süßwasserfischen in Mitteleuropa. Die MiFish-U- (12S) und SeaDNA-mid- (COI) Primer-Paare zeigten ebenfalls eine gute taxonomische Auflösung und Reproduzierbarkeit. Allerdings stellte sich heraus, dass allgemeinere Primer-Paare (die auf Wirbeltiere abzielen) weniger zuverlässig waren und hohe Zahlen falsch positiver und falsch negativer Nachweise generierten. Unsere Studie verdeutlicht, wie die sorgfältige Auswahl von Primer-Paaren und bioinformatischen Arbeitsabläufen das eDNA-Metabarcoding zu einem zuverlässigeren Instrument für das Fischmonitoring machen kann.

2.8 Is it worth the extra mile? Comparing environmental DNA and RNA metabarcoding for vertebrate and invertebrate biodiversity surveys in a lowland stream.

Publikation: Macher et al. (zur Veröffentlichung angenommen) PeerJ

Zusammenfassung: Umwelt-DNA (eDNA)-Metabarcoding hat sich als vielversprechender Ansatz zur Bewertung der Biodiversität und zur Ableitung ökologischer Statusklassen aus Wasserproben etabliert. Eine Einschränkung von eDNA-Untersuchungen besteht jedoch darin, dass die nachgewiesenen DNA-Moleküle aus anderen Quellen stammen können, sogar von toten Organismen, was lokale Biodiversitätsbewertungen verfälschen kann. Kürzlich wurde Umwelt-RNA (eRNA)-Metabarcoding als ergänzendes Werkzeug zur präziseren Bewertung der biologischen Gemeinschaft vorgeschlagen. In dieser Studie haben wir den Alpha-Diversität und die Muster in den detektierten Artengemeinschaften, die durch eDNA- und eRNA-Metabarcoding von Wirbeltieren (12S) und Wirbellosen (COI) in Wasserproben aus einem Flachlandfluss in Mitteleuropa abgeleitet wurden, verglichen. Insgesamt haben wir 31 Fischarten, 16 Säugetierarten, 10 Vogelarten und eine Neunaugenart im Datensatz der Wirbeltiere nachgewiesen. Die Alpha-Diversität war im eRNA-Datensatz höher als im eDNA-Datensatz. Darüber hinaus stellten wir eine positive Korrelation zwischen dem Vorkommen genetischer Signale und den Verbreitungsmustern der Arten auf der Grundlage herkömmlicher Fischmonitoring-Daten fest. Im Datensatz der Wirbellosen haben wir 109 Arthropodenarten, 22 Ringelwurmarten, 12 Rädertierarten, 8 Weichtierarten und 4 Nesseltierarten nachgewiesen. Im Gegensatz zum Muster der Vielfalt bei Wirbeltieren war die Alpha-Diversität bei den Wirbellosen im eDNA-Datensatz höher als im eRNA-Datensatz. Insgesamt ist das eRNA-basierte Monitoring zwar eine effiziente Methode zur Bewertung von flussassoziierten Wirbeltieren, aber

die Bewertung von Wirbellosen bleibt schwierig. Diese Ergebnisse liefern Einblicke in die Vor- und Nachteile sowie die Anwendungsmöglichkeiten des eRNA-Metabarcodings für die Biodiversitätsüberwachung und Forschung.

2.9 Highly resolved temporal sampling showcases the potential of environmental DNA metabarcoding for holistic biodiversity monitoring of seasonal dynamics.

Publikation: Macher et al. (in Bearbeitung)

Zusammenfassung: Die Biodiversität in Süßwasserökosystemen nimmt in alarmierendem Tempo ab, und die Anzahl invasiver Arten nimmt zu. Während herkömmliche Biodiversitätsbewertungen von Süßwasserökosystemen umfassende Einblicke in die Gesundheit des Ökosystems bieten, sind sie zeitaufwändig und kostenintensiv und stoßen oft an ihre Grenzen in Bezug auf räumlich-zeitliche Auflösung, da sie Schwierigkeiten haben, Veränderungen im Ökosystem effizient darzustellen. Darüber hinaus kann die Bewertung mehrerer taxonomischer Gruppen die traditionelle Biomonitoring noch kostspieliger und zeitaufwändiger gestalten. Um diese Lücke zu schließen, könnte Umwelt-DNA-Metabarcoding als neues ergänzendes Werkzeug für das Biomonitoring dienen, da es effizient Muster des Vorkommens von Arten aus mehreren trophischen Ebenen erfassen kann, wobei gleichzeitig eine hohe Auflösung bei vergleichsweise geringem Aufwand und geringen Kosten erhalten bleibt. In dieser Studie führten wir eine Analyse an der Mündung der Lippe durch, um das Potenzial von Umwelt-DNA-Metabarcoding zu demonstrieren. Über den Zeitraum eines Jahres sammelten wir alle zwei Wochen 2 Liter Wasser, aus dem wir die eDNA von Wirbeltieren, Wirbellosen und Kieselalgen extrahierten und amplifizierten. Unsere Studie ergab konforme Artenvorkommensmuster über das Jahr hinweg für alle vier taxonomischen Gruppen. Beispielsweise beobachteten wir verschiedene invasive Arten, Wanderaktivitäten und Hinweise auf Laichereignisse. Darüber hinaus ermöglichten uns unsere Daten, Veränderungen in der Alpha-Diversität aufgrund eines signifikanten Hochwassereignisses und der anschließenden Erholung zu untersuchen. Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse das Potenzial von eDNA-Metabarcoding als holistische Methode zur Biodiversitätsüberwachung, ohne umfangreiche Probenahmen oder hohe Kosten.

2.10 Evaluating the state of DNA metabarcoding for ecological status class assessments of benthic invertebrates and diatoms under the Water Framework Directive.

Publikation: Macher et al. (in Bearbeitung)

Zusammenfassung: weltweit werden aquatische Ökosysteme durch verschiedene Indikatororganismen überwacht, um ihren ökologischen Status zu bewerten. In der Europäischen Union ist das Biomonitoring von Süßwasser ein entscheidender Bestandteil der EU-Wasserrahmenrichtlinie (WRRL, 2000/60/EC) und basiert derzeit hauptsächlich auf visuellen Bestimmungsmethoden. Diese Studie hatte zum Ziel, die anstehenden Schritte zu evaluieren, die notwendig sind, um DNA-Metabarcoding als ergänzende Methode, in das WRRL-Monitoring zu implementieren. Der Fokus lag auf den beiden Biologischen Qualitätskomponenten (BQEs) "Benthische Wirbellose" und "Phytobenthos" ("Benthische Kieselalgen"). Wir analysierten 170 Proben von wirbellosen Tieren und 148 Diatomeenproben, die in Deutschland für Überwachungszwecke im Rahmen der WRRL gesammelt wurden, und untersuchten sie sowohl mit Hilfe von DNA-Metabarcoding als auch unter Verwendung morpho-taxonomischer Methoden im Rahmen des WRRL-Monitorings. Unser Ziel war es, methodische

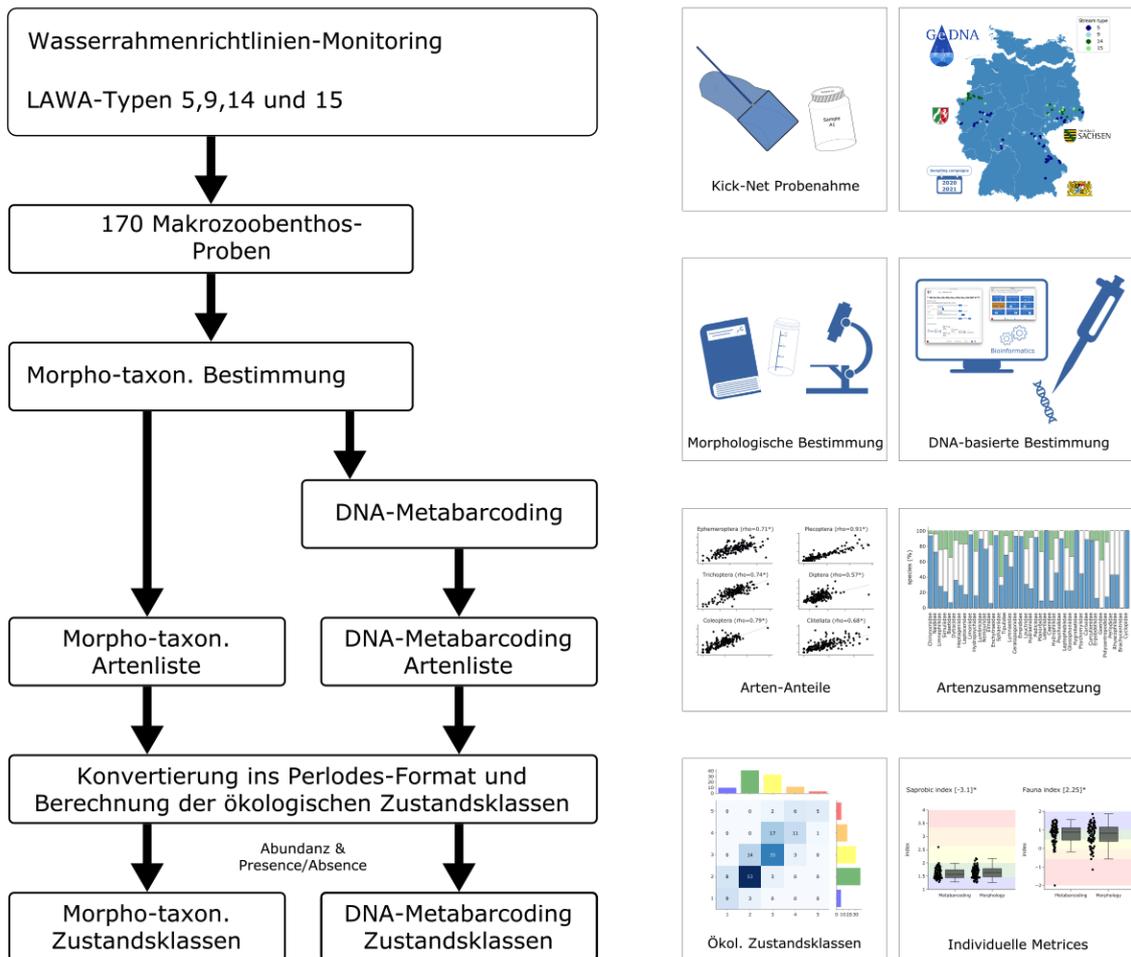
Unterschiede zu bewerten und das Potenzial von DNA-Metabarcoding-Analysen zu untersuchen, indem wir die detektierte Artenvielfalt sowie die Ergebnisse der ökologischen Zustandsklassen, die sowohl mit der morpho-taxonomischen als auch der DNA-basierten Artenidentifikation abgeleitet wurden, bewerteten. Infolgedessen haben wir Harmonisierungsmaßnahmen durchgeführt, um die Daten des DNA-Metabarcodings in die offiziellen WRRL-Module für Deutschland Perlodes (Wirbellose) und Phylib (aquatische Flora) zu integrieren. Anschließend wurden ökologische Zustandsklassen für beide DNA-basierten und morpho-taxonomische Datensätze berechnet, wobei der Einsatz von Abundanzdaten (morpho-taxonomische Methoden) und Presence-/Absence-Daten (Metabarcoding) verglichen wurde. Die Ergebnisse zeigten eine höhere Übereinstimmung in der Artenzusammensetzung bei benthischen Wirbellosen im Vergleich zu benthischen Diatomeen. Mit den DNA-Metabarcoding-Analysen konnten signifikant mehr Chironomidae-Taxa identifiziert werden und wiesen ähnliche Anteile von EPT-Taxa (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera) auf. Die ökologischen Zustandsklassen, die aus Wirbellosenbewertungen abgeleitet wurden, zeigten eine hohe Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden ($\rho=0,859$), während für Diatomeen größere Unterschiede beobachtet wurden ($\rho=0,551$). Die Wahl von Abundanz- oder Presence-/Absence-Daten hatte nur geringen Einfluss auf die zugewiesenen Statusklassen für beide BQEs. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Bewertung von benthischen Wirbellosen eine hohe Ähnlichkeit zwischen den Methoden, was auf die Eignung von DNA-Metabarcoding für das WRRL-Monitoring ohne große Änderungen vor einer zukünftigen Implementierung hindeutet. Die Analyse von benthischen Diatomeen mit Hilfe des DNA-Metabarcodings bleibt jedoch aufgrund der Herausforderungen bei der Taxonomieharmonisierung aufgrund der inhärenten Struktur des Phylib-Moduls und begrenzter Referenzsequenzen, die die Anzahl der verfügbaren Indikatorarten beschränken, herausfordernd. Weitere Interkalibrationsmaßnahmen und eine Neustrukturierung des Phylib-Moduls werden erforderlich sein, bevor es mit DNA-Metabarcoding-Daten verwendet werden kann. Alternativ könnten in anderen WRRL-Mitgliedsländern verwendete Indizes genutzt werden, die hohe Übereinstimmung zwischen beiden Methoden gezeigt haben. Dies würde jedoch eine vollständige Überarbeitung des deutschen Bewertungssystems für die aquatische Flora erfordern.

3 Biologische Qualitätselemente

In diesem Abschnitt wird genauer auf die Ergebnisse der BQE-Analysen eingegangen und diese vor dem Hintergrund insbesondere der ersten zwei Projektziele (Validierung und Plausibilisierung von DNA-Metabarcoding) näher ausgeführt.

3.1 Makrozoobenthos

Abbildung 3: Makrozoobenthos-Analyse der Proben, die im Rahmen des GeDNA-Projekts gesammelt wurden.



Quelle: Macher et al. (in Bearbeitung)

3.1.1 Material und Methoden

Die vollständige Arbeitsablauf der Makrozoobenthos-Analysen ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Probenahme wurde während des WRRL-Monitorings gemäß in den Jahren 2020 und 2021 von Expertenteams aus Nordrhein-Westfalen (LANUV), Sachsen (SMEKUL) und Bayern (LfU) durchgeführt. Insgesamt wurden 170 Probenahmestellen auf Basis ihres LAWA-Typs und des zuvor gemeldeten ökologischen Status ausgewählt (Abbildung 3). Es ist wichtig zu beachten, dass die Verteilung der Statusklassen der in der jeweiligen WFD-Bewertungsperiode bewerteten Flüsse nicht gleich war. Dies führte dazu, dass einige Statusklassen an den Probenahmestellen unterrepräsentiert waren. Die ungleiche Vertretung der Statusklassen ist ein unvermeidliches

Ergebnis des WFD-Bewertungsprozesses. Um die Variabilität aufgrund der LAWA-Typen zu begrenzen, wurden Proben ausschließlich aus den Flusstypen 5 ("grobmaterialreiche, silikatische Mittelgebirgsbäche"), 9 ("silikatische, fein- bis grobmaterialreiche Mittelgebirgsflüsse"), 14 ("sandgeprägte Tieflandbäche") und 15 ("sand- und lehmgeprägte Tieflandflüsse") entnommen, die die häufigsten Flusstypen in Deutschland darstellen. Um eine DNA-Degradation nach der Probenahme zu verhindern und eine ausreichende Konservierung aller für diese Studie gesammelten Proben zu ermöglichen, wurde eine Leitfaden für die Probenahme vorbereitet und den Feldteams zur Verfügung gestellt (Anhang A1). Die Proben wurden nach nationalen Standards, d.h. der Multihabitatprobenahme nach Perloides (Wirbellose), zwischen März und August entnommen. Zunächst wurde der Anteil der verschiedenen Flussbett-Lebensräume an repräsentativen Probenahmestellen abgeschätzt, die sich über 20-50 m erstreckten. Basierend auf der Schätzung wurde die Anzahl der Unterproben für die einzelnen Substrattypen bestimmt.

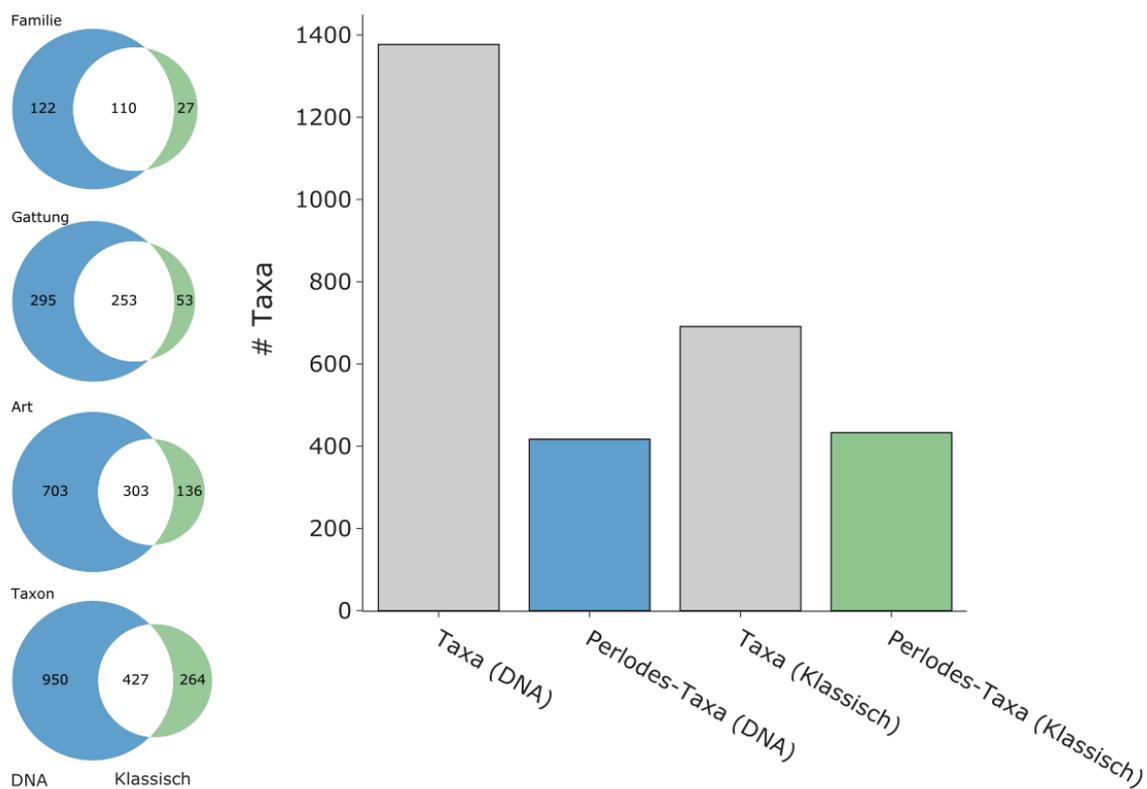
Für jede Unterprobe wurde für jede 5 %ige Abdeckung eines Substrattyps eine Probe entnommen. Insgesamt ergab dies 20 Unterproben, die mit Keschern gesammelt wurden und eine Fläche von etwa 25 x 25 cm abdeckten. Die Proben wurden gegen die Strömung des Gewässers gesammelt. Größere Steine und Totholz wurden von Hand gesammelt und die Proben wurden im Netz abgewaschen. Die Proben wurden entweder im Feld oder im Labor vorbereitet. Pro Probe wurden mindestens 350 Individuen sortiert und in ein Kautex-Röhrchen (oder Ähnliches) überführt. Die Proben wurden in 96 %igem Ethanol (MEK, PET oder IPA) im Verhältnis 1:3 Probe zu Ethanol konserviert. Innerhalb von 24 Stunden wurde das Ethanol ausgetauscht, um eine Verdünnung des Ethanols durch das von den konservierten Exemplaren abgegebene Wasser zu verhindern. Dazu wurde die Probe aus dem Röhrchen durch ein 500-µm-Sieb gesiebt und in frischen Ethanol zurückgegeben, während der ursprüngliche Ethanol verworfen wurde. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Proben, während der morpho-taxonomischen Bestimmung (durchgeführt von Experten des LANUV, SMEKUL und LfU) separat behandelt. Zwischen den Proben wurde das Equipment (z.B. Pinzetten) gereinigt, um das Übertragen von Körperteilen wie Beinen zu verhindern, was eine mittels morpho-taxonomischen Methoden analysierte Probe nicht kontaminieren würde, aber mittels DNA-Metabarcoding nachgewiesen werden könnte. Während der morpho-taxonomischen Bestimmung wurden die Exemplare vorübergehend in Wasser oder 70 % Ethanol gelegt, um die Handhabung zu erleichtern. Nach der morpho-taxonomischen Bestimmung wurden die Proben dunkel gelagert und anschließend zur Universität Duisburg-Essen zur Durchführung der DNA-Metabarcoding-Analyse versendet.

Details zur der DNA-Metabarcoding-Analyse der Makrozoobenthos-Proben werden in Macher et al. (in Bearbeitung) veröffentlicht. Die Proben wurden zunächst homogenisiert, um die DNA anschließend aus dem Homogenat zu extrahieren. Mit dem DNA-Extrakt wurde anschließend eine Zwei-Schritt-PCR durchgeführt (Buchner et al. 2021), um einen Abschnitt des mitochondrialen COI-Gens von Invertebraten mittels der sog. Fwh-Primer (FwhF2, FwhR2n) zu vervielfältigen (Vamos et al. 2017). Anschließend wurden alle die PCR-Produkte aller Proben in einer Metabarcoding-Library zusammengefasst und zur Sequenzierung geschickt, um die vervielfältigten Genabschnitte auszulesen. Die so erhaltenen Sequenzdaten wurden anschließend mit der Software APSCALE (Macher et al. 2022) ausgewertet. Die taxonomische Zuordnung der DNA-Metabarcoding-Daten wurde mit der Software BOLDigger (Buchner and Leese 2020)B gegen die BOLDsystem-Datenbank durchgeführt (Ratnasingham and Hebert 2007). Anschließend wurden die Daten mittels der Software TaxonTableTools (Macher et al. 2021a) und eigens entwickelten bioinformatische Skripten weiter ausgewertet. Hierbei lag der Fokus vor allem auf dem methodischen Vergleich der detektierten Arten und dem Vergleich der berechneten Statusklassen und der individuellen Metrics.

3.1.2 Ergebnisse

Für 170 Proben lagen sowohl DNA-Metabarcoding- als auch morpho-taxonomische Daten vor. Insgesamt wurden 1.006 Arten mit DNA-basierten Methoden nachgewiesen, während 439 Arten mit den morpho-taxonomische Methoden nachgewiesen wurden. Davon waren 303 Arten in beiden Methoden gemeinsam (Abbildung 4). Die artenreichste taxonomische Gruppe im DNA-basierten Datensatz waren Zweiflügler (337 Arten), Köcherfliegen (123), Käfer (99), Eintagsfliegen (59), Tubificidae (48) und Steinfliegen (43). Dem gegenüber waren die häufigsten taxonomischen Gruppen im morpho-taxonomischen Datensatz die Köcherfliegen (113), Eintagsfliegen (69), Käfer (54), Zweiflügler (52), Lungenschnecken (20) und Steinfliegen (20). Im Durchschnitt wurden 20,7 % der Arten pro Familie von beiden Methoden gemeinsam detektiert, während 16,5 % und 62,7 % exklusiv für morpho-taxonomische Methoden bzw. DNA-Metabarcoding waren. Insbesondere für die Familien Chironomidae und Naididae wurden mittels DNA-Metabarcoding signifikant mehr exklusive Arten (180 und 37 Arten) im Vergleich zu morpho-taxonomischen Methoden (7 und 2) gefunden, während nur ein kleiner Teil geteilt wurde (5 und 12). Hierbei ist zu beachten, dass die Identifikationsstandards für Perlodes die Identifikation von Chironomiden maximal auf Familienebene vorsehen.

Abbildung 4: Anzahl der Arten (Venn-Diagramme) und Taxa (Balkendiagramme) vor und nach der Konvertierung in das Perlodes-Format (Makrozoobenthos) für beide Datensätze.



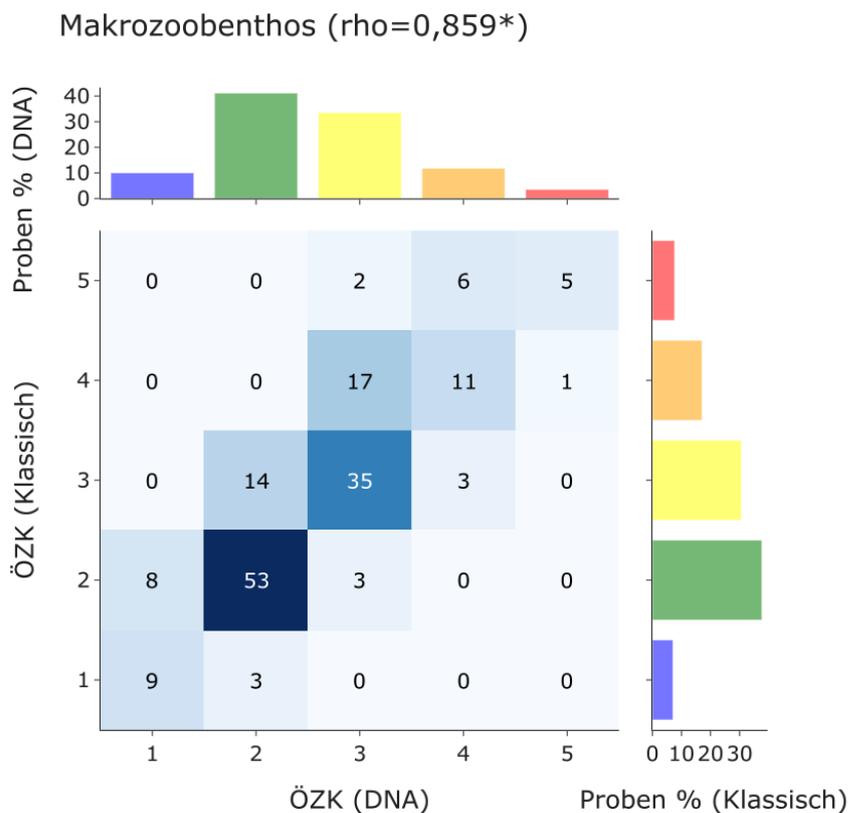
Quelle: Macher et al. (in Bearbeitung)

Der Verlust an taxonomischen Informationen bei der Umwandlung in das Perlodes-Format war bei den DNA-Metabarcoding-Ergebnissen höher, wo ursprünglich 1.377 eindeutige Taxa in 417 Taxa umgewandelt wurden (30 %). Im morpho-taxonomischen Datensatz wurden 691 eindeutige Taxa in 433 Taxa umgewandelt (62 %). Die Taxongruppe mit der höchsten Verlustrate (d.h., Taxa, die auf eine höhere taxonomische Ebene zurückgestuft wurden) im DNA-

basierten Datensatz waren die Chironomidae (Perlodes-Taxon: Chironomidae Gen. sp.) mit 225 eindeutigen Taxa, gefolgt von Naididae und Tubificidae (Naididae/Tubificidae Gen. sp., 58 eindeutige Taxa), Heteroptera (Heteroptera Gen. sp., 37) und Oligochaeta (Oligochaeta Gen. sp., 35). Im Gegensatz dazu war die Verlustrate im morpho-taxonomischen Datensatz niedriger, wo 24 eindeutige Chironomidae-Taxa zusammengeführt wurden, gefolgt von Naididae und Tubificidae (17 eindeutige Taxa), Limnephilidae (Limnephilidae Gen. sp., 15), Heteroptera (11) und Simulium (Simulium sp., 10). Die ökologische Zustandsklassenbewertung mit Perlodes war insgesamt geringfügig besser im DNA-basierten Datensatz, bei dem 47 Proben höher bewertet wurden und 10 Proben im Vergleich zu den traditionellen Methoden niedriger bewertet wurden. Es wurden keine Unterschiede im Vergleich von Presence-/ Absence-Daten und Abundanzdaten für beide Methoden gefunden. Alle paarweisen Vergleiche der ökologische Zustandsklassen von Presence-/Absence-Daten (Spearman'sches rho=0,867, p<0,05), Abundanzdaten (rho=0,846, p<0,05) und Abundanz (morpho-taxonomisch) im Vergleich mit Presence-/ Absence-Daten (Metabarcoding) (rho=0,859, p<0,05; Abbildung 5) waren nahezu identisch. Daher wurden Abundanzdaten der morpho-taxonomischen Datensatzes mit den Presence- / Absence-Daten des Metabarcoding-Datensatzes für alle nachfolgenden Analysen verwendet, da dies das wahrscheinlichste Szenario darstellt, wie morphologische und Metabarcoding-Daten angewendet werden. Die Daten zeigen aber, dass auch abundanzfreie Bewertungen für die Gewässertypen möglich sind (siehe auch Buchner et al. 2019 und Anhang A.3).

Abbildung 5: Paarweiser Vergleich der ökologischen Zustandsklassen zwischen den beiden Methoden.

Übereinstimmende Zustandsklassen liegen auf der Diagonalen. Zusätzlich ist der Anteil der Proben pro Zustandsklasse als Balkendiagramme angegeben.

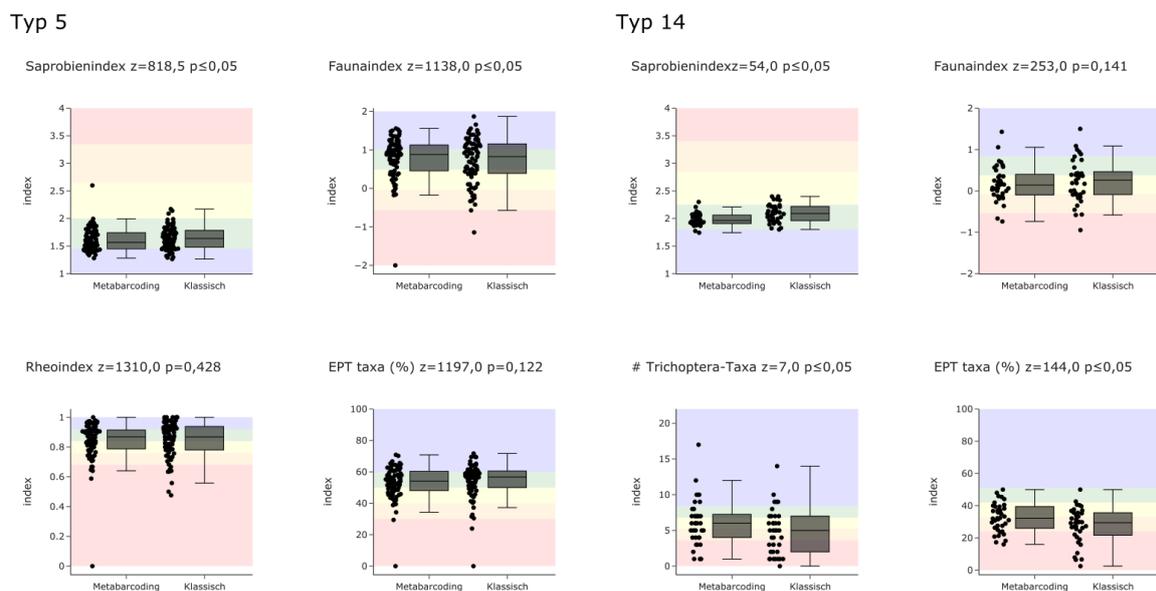


Quelle: Macher et al. (in Bearbeitung)

Eine größere Anzahl von Proben wurde den Statusklassen 1-3 im DNA-basierten Datensatz zugeordnet (ESC sehr gut: 17, gut: 70, mäßig: 57) im Vergleich zu dem auf traditionelle Weise abgeleiteten Datensatz (sehr gut: 12, gut: 64, mäßig: 52). Umgekehrt wurden in den traditionellen Ergebnissen mehr Proben mit den Statusklassen 4 und 5 klassifiziert (schlecht: 29, sehr schlecht: 13) im Vergleich zu den DNA-Metabarcoding-Ergebnissen (unbefriedigend: 20, schlecht: 6). Die meisten Proben wiesen dieselbe ökologische Zustandsklasse auf (113 Proben; 66,47 %), während 45 Proben (26,47 %) von einer Methode besser bewertet wurden, und bei zwei Proben (1,18 %) wurden zwei Klassen besser bewertet. Weitere 10 Proben (5,88 %) wurden um eine Klasse schlechter bewertet.

Abbildung 6: Boxplots der einzelnen Metrics für die Fließgewässertypen 5 und 14.

Wilcoxon-Tests wurden zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden durchgeführt. Die Farben repräsentieren die Statusklassen.



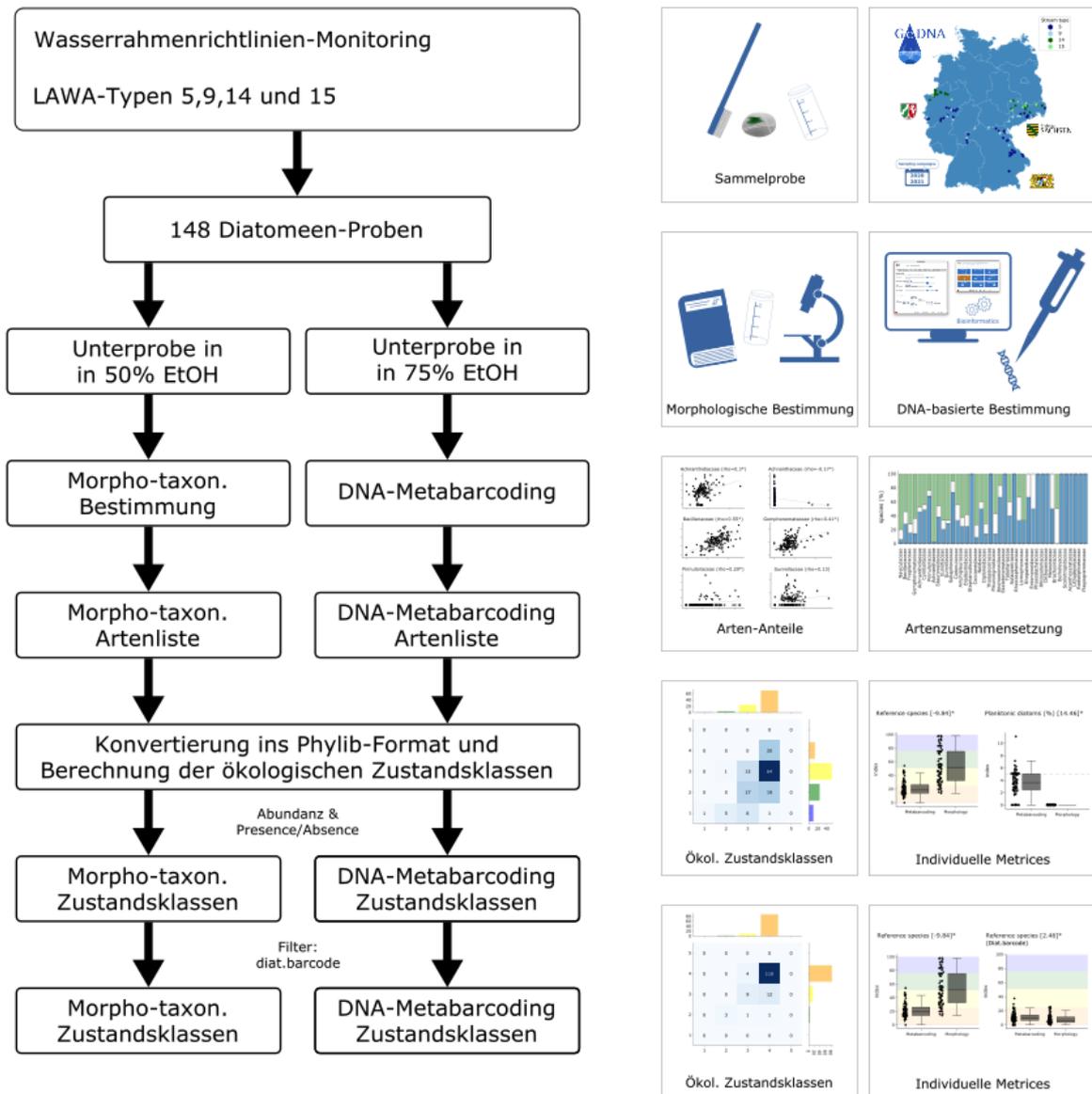
Quelle: Macher et al. (in Bearbeitung)

Von den 18 relevanten Metrics wiesen jedoch 12 signifikante Unterschiede zwischen den Methoden auf (Wilcoxon-Test $p \leq 0,05$, Abbildung 6). Für Fließgewässertyp 5 wurden signifikante Unterschiede beim Saprobienindex beobachtet, der im Durchschnitt beim Metabarcoding niedriger war, und im Faunaindex, der beim Metabarcoding höher war (Abbildung 4). Fließgewässertyp 9 zeigte signifikant niedrigere Werte des Saprobienindex, Anteile von EPT-Taxa und Anteile von Metarhithralbesiedlern (Zonation Metarhithral) im Metabarcoding-Datensatz. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der EPTCBO-Taxa im Metabarcoding-Datensatz signifikant höher. Fließgewässertyp 9 zeigte signifikant höhere Zahlen von Köcherfliegentaxa und Anteilen von EPT-Taxa, während die Werte des Saprobienindex im Metabarcoding-Datensatz niedriger waren (Abbildung 4). Schließlich zeigten die Metabarcoding-Proben des Fließgewässertyps 15 signifikant höhere Fauna-Indexwerte und signifikant niedrigere Saprobienindex-Werte. Bei der Untersuchung der Unterschiede in den Perlodes-Metriken von Proben, die sich in ihrer Gesamtstatusklasse unterschieden, wurden keine Unterschiede im Saprobienindex (57 Proben, 100 %) und in den Uferbesiedlern (Zonation Littoral) (7 Proben, 100 %) festgestellt, die die Statusklasse für alle relevanten Proben gemeinsam hatten. Die meisten Unterschiede traten in der Anzahl der Köcherfliegentaxa (57 %) und dem Anteil von EPT-Taxa (38 %) auf, bei denen mehr Metabarcoding-Proben bessere Statusklassen aufwiesen, verglichen mit 7 % bzw. 15 % der Proben für die klassisch bestimmten.

3.2 Diatomeen

3.2.1 Material und Methoden

Abbildung 7: Diatomeen-Analyse der Proben, die im Rahmen des GedDNA-Projekts gesammelt wurden.



Quelle: Macher et al. (in Bearbeitung)

Die Probenahme erfolgte im Rahmen des WRRL-Monitorings und wurde mit den etablierten Diatomeen-Probenahmeprotokollen durchgeführt. Das gesammelte Phytobenthos wurde direkt vom Substrat in 50-ml-Röhrchen übertragen, um eine mögliche Kontamination durch Zwischenlagerung in z.B. weißen Tablettis zu vermeiden. Harte Substrate wurden bevorzugt gesammelt. Alternativ wurden auch Totholz oder Sedimente gesammelt, wenn keine harten Substrate verfügbar waren. Jede Probe wurde in zwei Fraktionen aufgeteilt. Erstens, für die traditionelle Identifikation, wurden 10 ml Probe mit 10 ml 96 % unvergälltem Ethanol gemischt, um eine Endkonzentration von etwa 50 % Ethanol zu erreichen (Abbildung 7 und Anhang A2).

Für die zweite Fraktion für die DNA-Metabarcoding-Analysen wurden 10 ml Probe mit 40 ml 96 % unvergälltem Ethanol gemischt, um eine Endkonzentration von etwa 75 % Ethanol zu erreichen. Die Proben wurden durch Umkehren gemischt. Die Fraktion für die DNA-Metabarcoding-Analysen wurde unter dunklen Bedingungen gelagert und anschließend an das DNA-Labor der Universität Duisburg-Essen versandt. Die morpho-taxonomische Bestimmung wurde von Experten vom LANUV, SMEKUL und LfU durchgeführt.

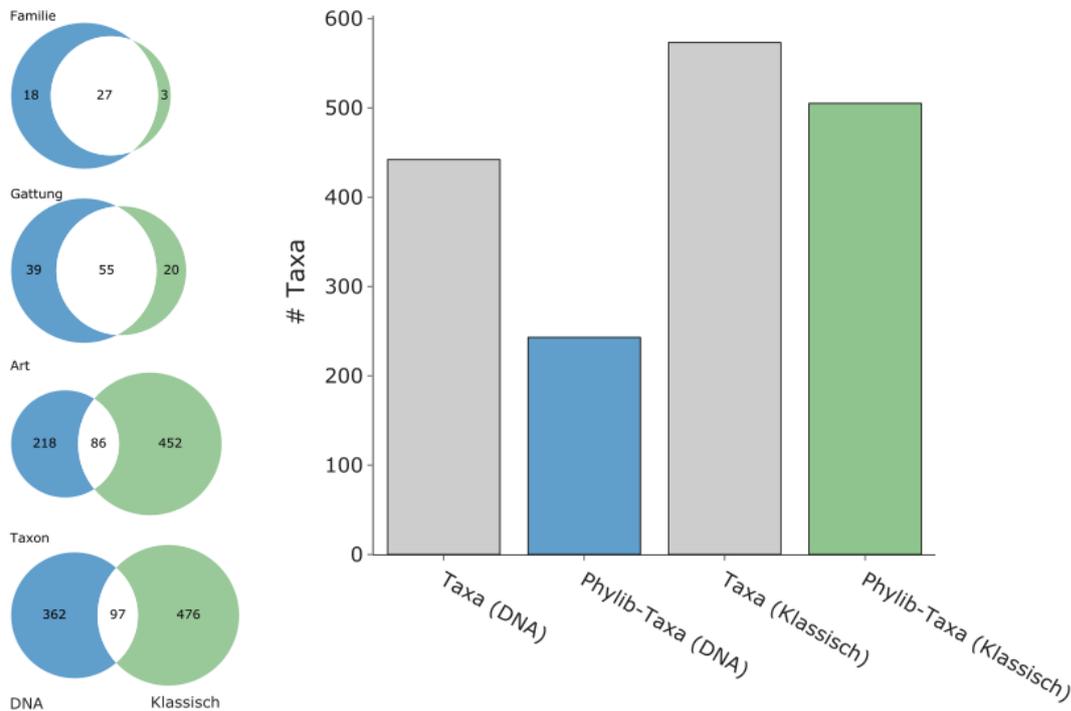
Details zur der DNA-Metabarcoding-Analyse der Diatomeen-Proben werden in Macher et al. (in Bearbeitung) veröffentlicht. Die Proben wurden zunächst von 50 mL EtOH in 10 mL EtOH aufkonzentriert, um die DNA anschließend zu extrahieren. Mit dem DNA-Extrakt wurde anschließend eine Zwei-Schritt-PCR durchgeführt (Buchner et al. 2021), um einen Abschnitt des auf dem Chlorplastengenom gelegenen *rbcL*-Gens von Diatomeen zu vervielfältigen (Vasselon et al. 2017b). Anschließend wurden alle die PCR-Produkte aller Proben in einer Metabarcoding-Library zusammengefasst und zur Sequenzierung geschickt, um die vervielfältigten Genabschnitte auszulesen. Die so erhaltenen Sequenzdaten wurden anschließend mit der Software APSCALE (Macher et al. 2022) ausgewertet. Die taxonomische Zuordnung der DNA-Metabarcoding-Daten wurde mit APSCALE gegen die Datenbank diat.barcode durchgeführt (Rimet et al. 2019). Anschließend wurden die Daten mittels der Software TaxonTableTools (Macher et al. 2021a) und eigens entwickelten bioinformatische Skripten weiter ausgewertet. Hierbei lag der Fokus vor allem auf dem methodischen Vergleich der detektierten Arten und dem Vergleich der mittels Phylib berechneten Statusklassen und der individuellen Metrics. Zusätzlich wurden beide Datensätze nach den in der diat.barcode Datenbank vorhandenen Arten gefiltert. Neben der Berechnung in Phylib wurden auch internationale Diatomeen-Indices berechnet.

3.2.2 Ergebnisse

Insgesamt wurden 304 Arten mit DNA-basierten Methoden detektiert, während 538 Arten mit den morpho-taxonomischen Methoden gezählt wurden (Abbildung 8). Davon wurden 86 Arten mit beiden Methoden gefunden (Abbildung 7). Die häufigsten Familien im DNA-basierten Datensatz waren Bacillariaceae (46 Arten), Pinnulariaceae (28), Naviculaceae (28), Fragilariaceae (24), Cymbellaceae (232) und Achnanthesiaceae (23). Im morpho-taxonomischen Datensatz waren die häufigsten Familien Naviculaceae (134), Fragilariaceae (75), Bacillariaceae (73), Gomphonemataceae (46) und Achnanthesiaceae (34). Im Durchschnitt wurden 10,6 % der Arten pro Familie zwischen den Methoden geteilt, während 33,1 % und 56,3 % ausschließlich bei morpho-taxonomischen Methoden bzw. DNA-Metabarcoding zu finden waren. Insbesondere bei den Familien Naviculaceae, Fragilariaceae und Bacillariaceae wurden von der morpho-taxonomischen Methode wesentlich mehr exklusive Arten erkannt (115, 65 bzw. 55 Arten), im Vergleich zum DNA-Metabarcoding (9, 14 bzw. 29), während nur ein kleiner Teil in beiden Datensätze vorhanden war (20, 11 bzw. 18).

Der Verlust taxonomischer Informationen bei der Konvertierung in das Phylib-Format war in den Ergebnissen des DNA-Metabarcodings höher, wobei ursprünglich 442 eindeutige Taxa in 243 Taxa umgewandelt wurden (54,9 %). Im traditionellen Datensatz wurden nach der Phylib-Konvertierung 505 von 573 Taxa beibehalten (88,1 %). Die Taxongruppe mit der höchsten Verlustrate im DNA-Metabarcoding-Datensatz war Nitzschia, die aus 40 Taxa bestand, gefolgt von Navicula (24 eindeutige Taxa), Pinnularia (23) und Gomphonema (16). Die Verlustrate war im morpho-taxonomischen Datensatz höher, wo 111 eindeutige Navicula-Taxa zusammengeführt wurden, gefolgt von Nitzschia (69), Fragilaria (56) und Gomphonema (44). Der mit traditionellen Methoden generierte Datensatz zeigte insgesamt bessere Bewertungen der ökologischen Statusklasse im Vergleich zu den DNA-basierten Methoden (Abbildung 8).

Abbildung 8: Anzahl der Arten (Venn-Diagramme) und Taxa (Balkendiagramme) vor und nach der Konvertierung in das Perloides-Format (Makrozoobenthos) für beide Datensätze.



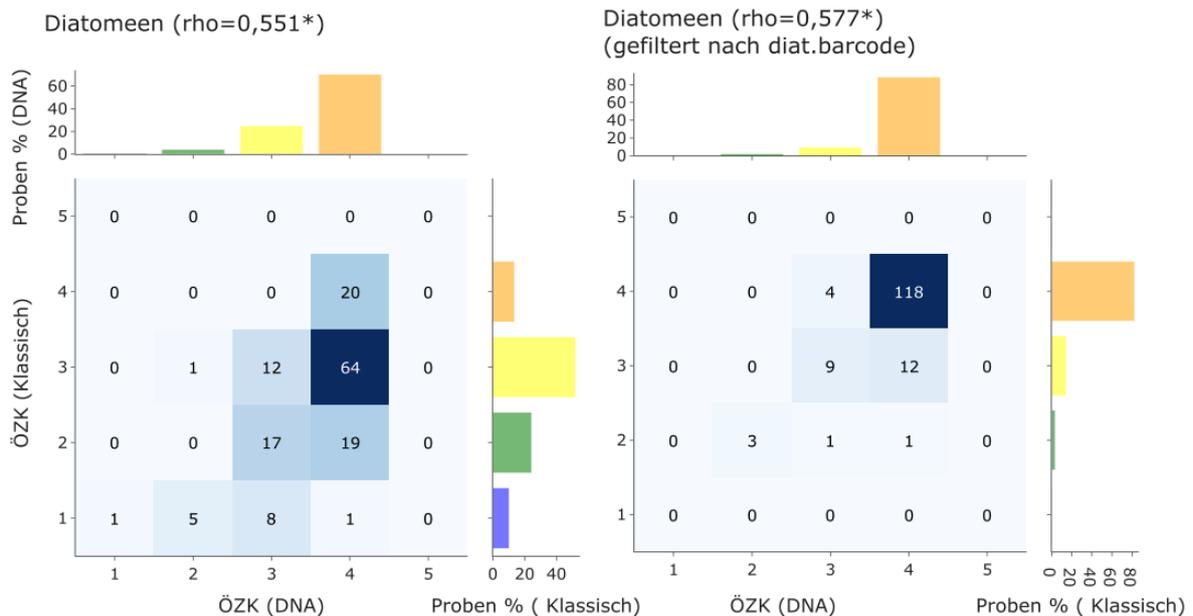
Quelle: Macher et al. (in Bearbeitung)

Hier zeigte sich eine mäßige Übereinstimmung der ökologischen Zustandsklassen, wenn man Presence- / Absence-Daten ($\rho=0,556$, $p \leq 0,05$), Abundanzdaten ($\rho=0,515$, $p \leq 0,05$) und morphologische Abundanz sowie Presence- / Absence-Daten des Metabarcoding-Datensatzes verglich ($\rho=0,551$, $p \leq 0,05$; Abbildung 9). Daher wurde der letztere Vergleich für alle nachfolgenden Analysen verwendet, da er das wahrscheinlichste Szenario darstellt, wie morphologische und Metabarcoding-Daten angewendet werden. Insgesamt wurden mehr Proben im morpho-taxonomischen Datensatz mit Statusklassen 1-3 bewertet (sehr gut: 15, gut: 36, mäßig: 77) im Vergleich zum DNA-basierten Datensatz (sehr gut: 1, gut: 6, mäßig: 37). Im Gegensatz dazu wurden mehr Proben im DNA-basierten Ergebnis mit Statusklasse 4 bewertet (unbefriedigend: 104), verglichen mit den traditionellen Ergebnissen (schlecht: 20). Kein Datensatz enthielt Proben mit Statusklasse 5. Nur wenige Proben hatten denselben ÖZK zwischen den Methoden (33 Proben; 22,3 %), während 86 (58,11 %), 27 (18,24 %) und eine Probe (0,68 %) mit morpho-taxonomischen Methoden um eine, zwei bzw. drei Klassen besser bewertet wurden. Eine einzige Probe (0,68 %) wurde um eine Klasse besser mit DNA-Metabarcoding bewertet. Signifikante Unterschiede zwischen den Methoden wurden für die meisten spezifischen Phylib-Module beobachtet (Abbildung 10). Die Trophieindex-Werte zeigten signifikante Unterschiede und waren in den Metabarcoding-Datensätzen für alle Flusstypen durchgehend höher. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der Referenzarten im Metabarcoding-Datensatz signifikant niedriger. Folglich waren die Diatomeenindex-Werte ebenfalls signifikant niedriger in den Metabarcoding-Datensätzen für alle Flusstypen. Zwischen den Methoden wurden signifikante Unterschiede in verschiedenen Modulen festgestellt, die zur Bewertung der Robustheit der Phylib-Ergebnisse verwendet wurden. Zunächst war das Identifikationsniveau-Modul für DNA-basierte Methoden schlechter und überschritt konstant

die 5 %-Schwelle. Auch bei den morpho-taxonomischen Proben wurde tendenziell die 5 %-Schwelle überschritten, jedoch bei weniger Proben. Da im traditionellen Datensatz keine planktonischen Taxa erfasst wurden, aufgrund einer vorherigen Filterung durch die drei Bundesländer, zeigten die Ergebnisse des DNA-Metabarcodings signifikant höhere Anteile von planktonischen Taxa, die oft die 5 %-Schwelle überschritten. Der Anteil aerophiler Taxa war für den Flusstyp 5 im DNA-Metabarcoding-Ergebnis signifikant höher und ähnlich in den anderen Flusstypen, wobei jedoch in keinem Flusstyp die 5 %-Schwelle überschritten wurde. Nur wenige Hinweise auf Versauerung wurden im Allgemeinen mit beiden Methoden gefunden, und keine Probe überschritt die erste Schwelle. Hier zeigten nur die Proben des Flusstyps 5 (D5) signifikante Unterschiede. Schließlich war der Halobienindex für den Metabarcoding-Datensatz für Typ 5 signifikant höher, jedoch überschritt keine Probe in einem der Datensätze die erste Schwelle.

Abbildung 9: Paarweiser Vergleich der ökologischen Zustandsklassen zwischen den beiden Methoden, mit allen Phylib-Taxa (links) und nach Taxa der diat.barcode Datenbank gefiltert (rechts).

Übereinstimmende Zustandsklassen liegen auf der Diagonalen. Zusätzlich ist der Anteil der Proben pro Zustandsklasse als Balkendiagramme angegeben.



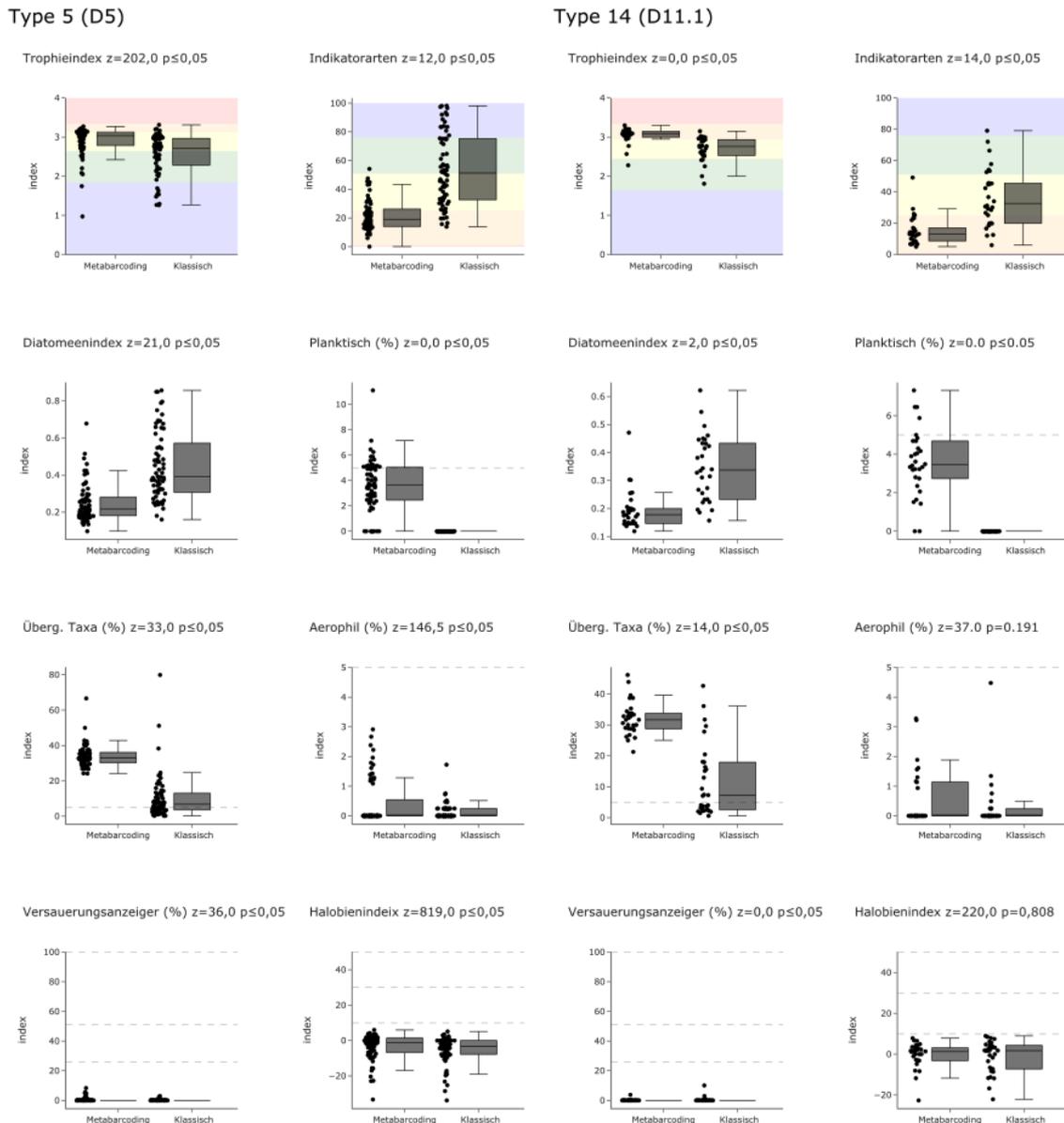
Quelle: Macher et al. (in Bearbeitung)

Die Phylib-Referenztaxaliste umfasst derzeit 368 Gattungen, 3.237 Arten, von denen 618 Artenvarianten waren. Die diat.barcode-Datenbank enthält Referenzsequenzen für 303 Gattungen, 1.308 Arten, von denen 147 Artenvarianten oder Gruppen waren. Zwischen den beiden Taxalisten teilten sich 108 Gattungen, 343 Arten und 9 Artenvarianten, was 19,2 %, 7,8 % bzw. 1,2 % entspricht (Zusatzabbildung 10). Wenn beide Datensätze auf Taxa beschränkt werden, die zwischen der Phylib-Taxaliste und der diat.barcode-Datenbank geteilt werden, wurde eine höhere Kongruenz zwischen dem DNA-Metabarcoding- und dem morpho-taxonomischen Datensatz beobachtet (Abbildung 9, rho=0,577, p<0,05). Jetzt zeigten 130 Proben dieselbe ökologische Statusklasse mit beiden Methoden, während vier mit DNA-Metabarcoding besser bewertet wurden und 14 bessere ökologische Statusklassen im morpho-

taxonomischen Datensatz aufwiesen. Über 80 % der Proben beider Datensätze wurden jedoch jetzt in die Statusklasse "unbefriedigend" eingestuft.

Abbildung 10: Boxplots der einzelnen Metrics für die Fließgewässertypen 5 und 14.

Wilcoxon-Tests wurden zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden durchgeführt. Die Farben repräsentieren die Statusklassen.



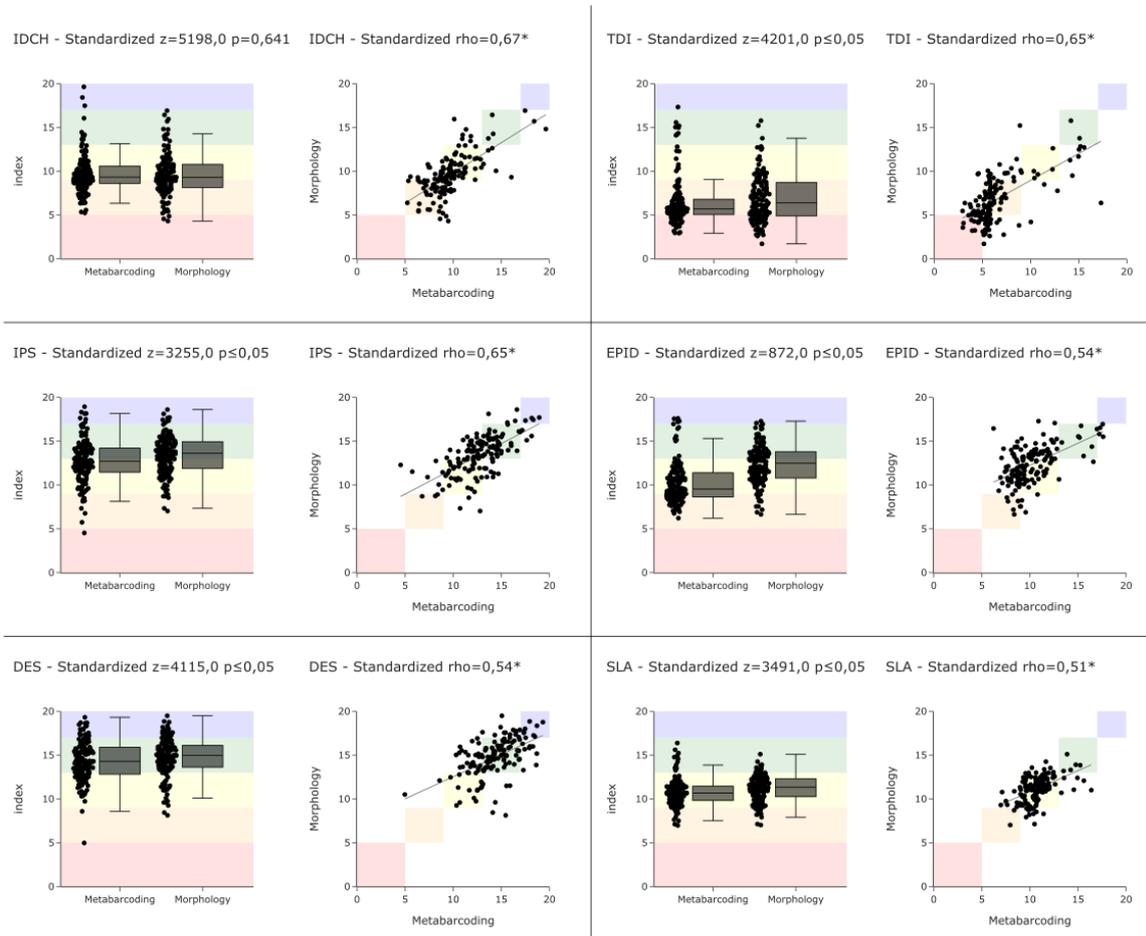
Quelle: Macher et al. (in Bearbeitung)

Andererseits wurden bei der Umwandlung der Datensätze in DiaThor 144 Taxa für den morpho-taxonomischen Datensatz erkannt und 429 ausgeschlossen, während 303 Taxa für den DNA-Metabarcoding-Datensatz akzeptiert und 139 ausgeschlossen wurden. Im Gegensatz zu den Phylib-Analysen führte dies zu einer signifikant niedrigeren durchschnittlichen Taxareichtum von 43,6 im morpho-taxonomischen Datensatz im Vergleich zum DNA-Metabarcoding-Datensatz mit einem Reichtum von 98,5. Im Vergleich der Indexe zeigten 10 von 15 Indizes eine signifikante Pearson-Korrelation zwischen den Datensätzen. Die stärksten signifikanten Korrelationen wurden für den IDCH-Index (Pearson rho=0,67) beobachtet, gefolgt von TDI

(0,65), IPS (0,65), EPID (0,54), DES (0,54) und SLA (0,51; Abbildung 11). Signifikante Unterschiede im Mittel der Indices (Wilcoxon-Test) wurden für sieben Indices festgestellt.

Abbildung 11: Boxplots und Punktdiagramme verschiedener internationaler Diatomeen-Indices für alle Proben des Diatomeen-Datensatzes.

Wilcoxon- und Spearman-Tests wurden zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden durchgeführt. Die Farben repräsentieren die Statusklassen.



Quelle: Macher et al. (in Bearbeitung)

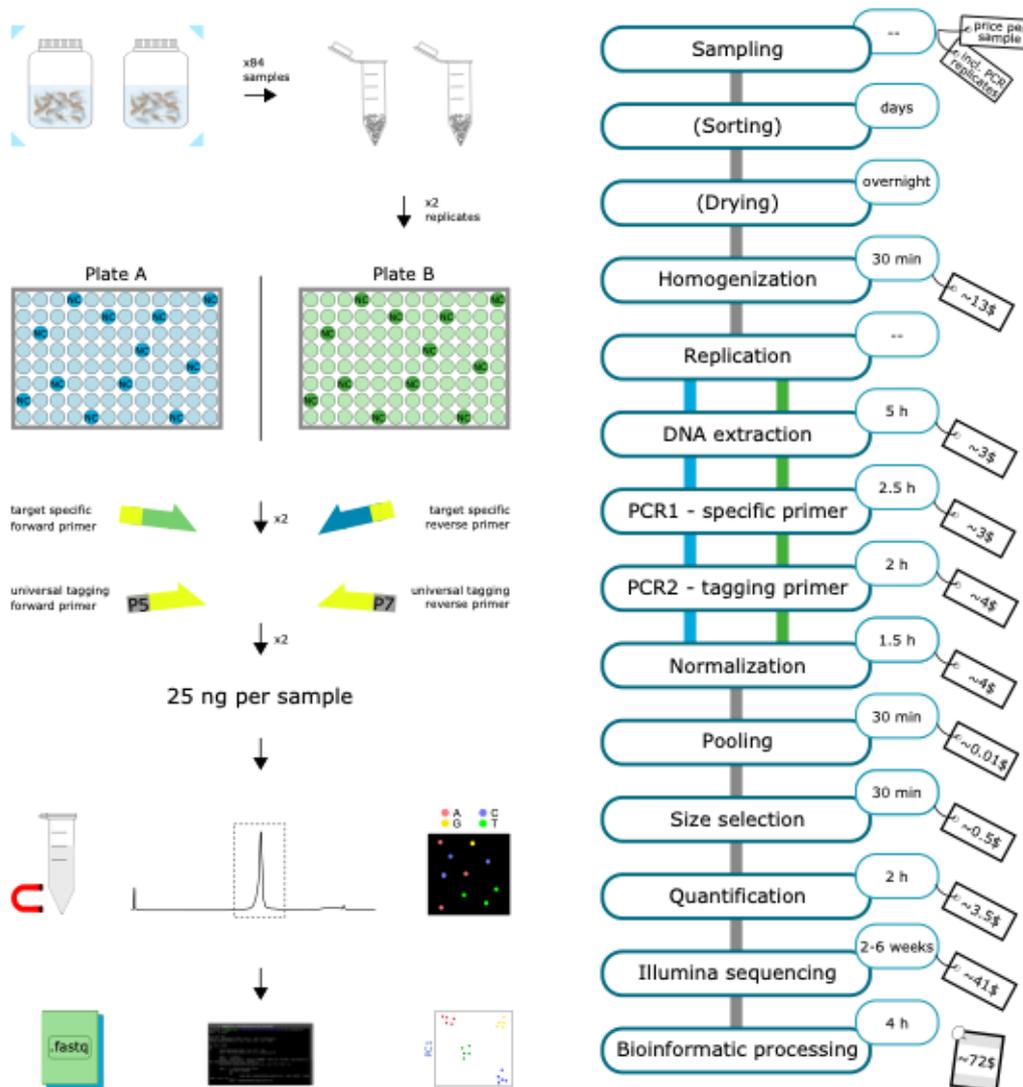
4 Bewertung der Methode für den Einsatz in der behördlichen Praxis

Das dritte Projektziel war die Prüfung der Eignung von DNA-Metabarcoding für den Einsatz in der behördlichen Praxis inkl. Kosten-Nutzen-Bilanzierung im Vergleich zu konventionellen Bewertungsansätzen. Mit diesem Kapitel soll, basierend auf den in Kapiteln 1-3 vorgestellten Ergebnissen, eine Bewertung für den Einsatz in der behördlichen Praxis (WRRL) vorgenommen werden.

4.1 Verifizierung, Standardisierung und Automatisierung von DNA-Metabarcoding-Arbeitsabläufen

Abbildung 12: DNA-Metabarcoding-Workflow, der für die Standardisierung und Hochskalierung im Labor optimiert wurde.

Die Materialkosten der jeweiligen Laborschritte wurden berechnet, welche seit der Veröffentlichung weiter gesenkt werden konnten.



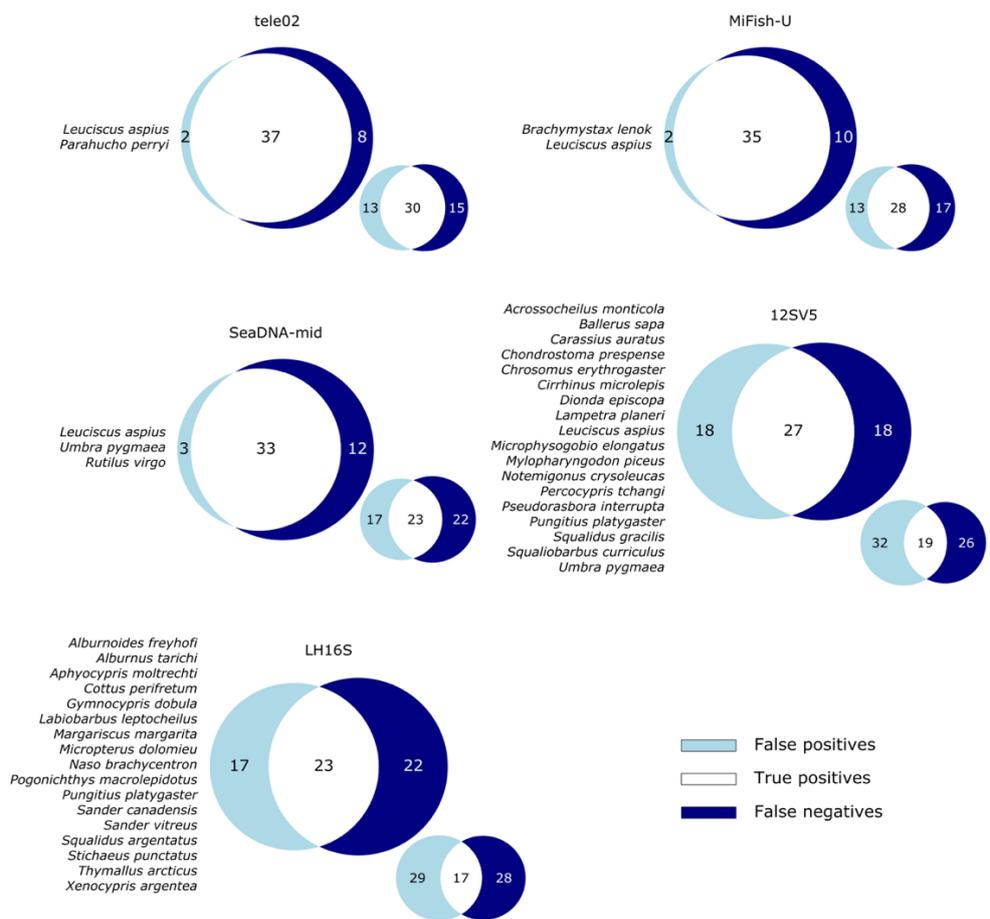
Quelle: Macher et al. (2021b)

Unabhängig vom GeDNA-Projekt werden DNA-basierte Methoden zunehmend als Ergänzung zu traditionellen morpho-taxonomischen Biomonitoring und Biodiversitätsmonitoring-Programmen betrachtet. Dies gilt insbesondere auch für den Kontext der WRRL (Hering et al. 2018, Leese et al. 2018, Pawlowski et al. 2018, Pont et al. 2021). Obwohl viele (e)DNA-Metabarcoding-Aspekte noch in der Entwicklungsphase sind und verschiedene Protokolle für DNA-Extraktion, Amplifikation, Sequenzierung und Bioinformatik existieren, ist es von entscheidender Bedeutung, zuverlässige Protokolle und Arbeitsabläufe zu etablieren, um die Implementierung in die WRRL-Bewertung voranzutreiben. Im GeDNA-Projekt lag ein Schwerpunkt auf der Entwicklung von Qualitätssicherungs- und -kontrollmaßnahmen (QA/QC) für Laborprozesse und bioinformatische Analysen (Leese et al. 2018). Da dieser auch für andere Umweltbeobachtungsprogramme der Behörden relevant ist wurde unter Beteiligung vom Umweltbundesamt und VDI e.V. unter der Federführung vom Bundesamt für Naturschutz (BfN) 2022 ein Workshop zum Thema Standardisierung durchgeführt. Die daraus resultierende Veröffentlichung wurde vom GeDNA-Team maßgeblich mit verfasst (Leese et al. 2023) und auf diese soll hier ebenfalls Bezug genommen werden.

4.1.1 Arbeitsabläufe im Labor

Abbildung 13: Evaluierung von fünf Fisch-spezifischen Primern zur Detektion von mitteleuropäischen Fischarten auf Basis einer künstlich zusammengestellte Probe.

Der zurzeit am besten geeignete Primer ist der tele02-Primer, da er die wenigsten Anteile an falsch-positiven und falsch-negativen und den größten Anteil an positiven Nachweisen erbringt.



Quelle: Macher et al. (2023a)

Die Laborschritte von DNA-Metabarcoding-Analysen umfassen Probenahme, DNA-Extraktion, Amplifikation und Sequenzierung. Verschiedene Protokolle existieren für diese Schritte, und es gibt keinen etablierten "Goldstandard". Die Auswahl der Methoden kann die Ergebnisse beeinflussen. Im GeDNA-Projekt wurden neue Laborprotokolle entwickelt, um die Anforderungen für eine zukünftige Umsetzung in der WRRL zu erfüllen.

Die Skalierbarkeit von DNA-Metabarcoding-Analysen ermöglicht die gleichzeitige Bearbeitung vieler Proben (Abbildung 12). Automatisierte Hochdurchsatz-Workflows sind im medizinischen Bereich etabliert, aber in der Biodiversitätsforschung sind manuelle Prozesse immer noch üblich. Automatisierte Pipettierroboter können die Effizienz und Skalierbarkeit erheblich steigern und die Robustheit erhöhen, indem sie potenzielle Kontaminationen vermindern und die parallele Sequenzierung tausender Proben zu niedrigeren Kosten ermöglichen (Buchner et al. 2021). Die Senkung der Sequenzierungskosten ist entscheidend, da ausreichende Replikate pro Probe erforderlich sind.

Tabelle 1: Beispiele für verfügbare und validierte Primer für die drei Biologischen Qualitätselemente „benthische wirbellose Fauna“, „benthische Diatomeen“ und „Fischfauna“

BQE	Primer-Paar	Marker	Publikation	Validierungs-Studie
Benthische wirbellose Fauna	fwhF2n fwhR2n	COI	Vamos et al. (2017)	Macher et al. (in Bearbeitung)
Benthische wirbellose Fauna	fwhF2n EPTDr2n	COI	Leese et al. (2021)	Brantschen et al. (2021)
Benthische Diatomeen	Diat_rbcL_708F Diat_rbcL_R3	<i>rbcL</i>	Vasselon et al. (2017)	Macher et al. (in Vorbereitung)
Benthische Diatomeen	rbcl-646F rbcl-998R	<i>rbcL</i>	Kelly et al. (2020)	Kelly et al. (2020)
Fische	tele02_fw tele02_rv	12S	Taberlet et al. (2018)	Macher et al. (2023a)
Fische	MiFish-U_fw MiFish-U_rv	12S	Miya et al. (2015)	Macher et al. (2023a)
Fische	coi.175f coi.345r	COI	Collins et al. (2019)	Macher et al. (2023a)

Benchmarks-Tests sollten durchgeführt werden, um geeignete Primer für die WRRL-Bewertung zu ermitteln, da es keine festgelegten Standards für Primer gibt. Für benthische Invertebraten und Kieselalgen ist die Primerwahl relativ einfach, aber für die eDNA-Metabarcoding von Fischen sind regionale Unterschiede zu berücksichtigen. Um potenzielle Fehlerquellen zu detektieren und den am besten geeigneten Primer für die Umwelt-DNA-basierte Detektion von Fischen in Mitteleuropa zu finden, führten Macher et al. (2023a) einen Primer-Test anhand einer künstlich zusammengestellten Probe durch. Diese sog. „Mock-Community“ bestand aus DNA-Extrakten aus Schleimabstrichen von 45 Mitteleuropäischen Fischarten. Diese künstliche Probe wurde anschließend mit fünf verschiedenen Primern amplifiziert, um Primer-spezifische Fehlerquellen (falsch negative, falsch positive Detektion) zu erörtern (Abbildung 13). Die Wahl des Primers beeinflusste die Ergebnisse erheblich, und ungeeignete Primer können zu falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen führen. Der "tele02"-Primer zusammen mit dem

"SeaDNA-mid"-Primer wurde als zuverlässigste Wahl für die eDNA-Metabarcoding von mitteleuropäischen Süßwasserfischen identifiziert (Macher et al. 2023a). Da der „SeaDNA-mid“-Primer jedoch das COI-Fragment amplifiziert ist hier in eDNA-Analysen eine hohe nicht-Zielorganismus-Amplifikation bekannt, was die Anwendung im Vergleich zum „tele02“ weniger geeignet macht. Eine Auswahl empfohlener Primer, die im Rahmen des GeDNA-Projektes genutzt wurden, ist in Tabelle 1 gelistet.

4.1.2 Bioinformatische Auswertung

Mit den jüngsten Fortschritten im Labor können DNA-Metabarcoding-Analysen nun in großem Maßstab durchgeführt werden, wodurch jedoch Herausforderungen in der bioinformatischen Verarbeitung und Interpretation der Daten entstehen. Dieser Engpass betrifft insbesondere Nicht-Bioinformatiker, die für die Dateninterpretation in der Biologie von entscheidender Bedeutung sind. Mit der möglichen Integration von DNA-Metabarcoding in die WRRL-Bewertung besteht ein dringender Bedarf an effizienten Lösungen zur Datenverarbeitung und -analyse. Die bioinformatischen Programme APSCALE und TaxonTableTools, welche im Rahmen des GeDNA-Projekts entwickelt wurden, bieten zuverlässige Softwarelösungen für die Analyse von DNA-Metabarcoding-Daten, sowohl für Expert:innen als auch für Anfänger:innen. Eigenständige Versionen von APSCALE und TaxonTableTools werden zurzeit entwickelt, um die Nutzerfreundlichkeit zu verbessern und eine einfache Installation auf verschiedenen Betriebssystemen zu ermöglichen. APSCALE ermöglicht die Analyse von Rohdaten und bietet vergleichbare Ergebnisse wie andere Pipelines, jedoch mit reduzierten Laufzeiten (Macher et al. 2022). Es enthält Module zur automatischen taxonomischen Zuordnung und Referenzdatenbanken für die Bewertung von benthischen Invertebraten, benthischen Diatomeen und Fischen. Die Daten können dann in TaxonTableTools zur weiteren Verarbeitung übertragen werden, einschließlich der Konvertierung in WRRL-Bewertungsformate (Macher et al. 2021a). Darüber hinaus werden Module entwickelt, um den Datentransfer zwischen Informationsdatenbanken wie freshwaterecology.info und der GBIF-Datenbank zu erleichtern. Diese Aufgabe ist ein zentraler Bestandteil des F+E Projekt „dbDNA“, welches die identifizierten Herausforderungen mit Blick auf Referenzdatenbanken explizit aufgreift, diese zu schließen sucht und Datenbanken und Software zur Verfügung stellt.

Effiziente Pipelines zur Datenverarbeitung sind entscheidend für die Integration von DNA-Metabarcoding in die WRRL-Bewertung. Zusammen mit anderen Workflows gibt es bereits eine solide bioinformatische Grundlage, die in Zukunft validiert und in standardisierte Frameworks integriert werden kann.

4.2 Rahmenbedingungen des (e)DNA-Metabarcoding im Biomonitoring

Bis zum Abschluss des vierten Bewirtschaftungszyklus im Jahr 2027 werden die etablierten morpho-taxonomischen Methoden weiterhin für die Bewertung der WRRL verwendet. Allerdings erfordert die mögliche Einführung von DNA-Metabarcoding in die WRRL-Bewertung eine sorgfältige Evaluierung, bevor sie nach 2027 in die reguläre Monitoringpraxis aufgenommen werden kann. Kriterien für diese mögliche Implementierung wurden von Hering et al. (2018) vorgeschlagen, und im Rahmen des GeDNA-Projekts wurden erste Antworten und Lösungsansätze für diese Kriterien erarbeitet. Wichtig ist, dass mit Blick auf eine mögliche – und basierend auf diesen Projektergebnissen sowie internationalen Projekten sinnvolle – Integration in die WRRL nicht nur national (LAWA), sondern auch international (ECOSTAT als Teil von EC CIS – Common Implementation Strategy) der Dialog gesucht wird. Dies ist entscheidend, um eine

nachgeschaltete Interkalibrierung unterschiedlicher Ansätze direkt zu vermeiden und stattdessen lediglich einen „compliance check“ durchzuführen. Hierzu muss für die Jahre 2024-2026 ein Fahrplan mit den verantwortlichen Praxispartner:innen erarbeitet und umgesetzt werden.

4.2.1 Anwendbarkeit der aktuellen Probenahmemethoden und Verfügbarkeit alternativer Methoden zur Gewinnung biologischen Materials für die DNA-basierte Identifikation.

Im Rahmen des GeDNA-Projekts wurden Proben von mehr als 300 Standorten nach den gängigen WRRL-Bewertungsstandards gesammelt. Die Anpassungen an den Probenahmeprotokollen, um DNA-basierte Analysen zu ermöglichen, waren minimal. Dies wurde in Workshops erreicht, die von der Universität Duisburg-Essen, dem Botanischen Garten und Botanischen Museum Berlin sowie der Umweltbundesamt organisiert wurden. Diese Workshops legten den Grundstein für zwei erfolgreiche Sammelkampagnen in den Jahren 2020 und 2021, durchgeführt von den Kooperationspartner:innen der Landesämter, die die WRRL-Bewertung durchführen. Für die beiden untersuchten Biologischen Qualitätskomponenten (BQEs), "benthische Invertebraten" und "benthische Kieselalgen", waren nur minimale Anpassungen der Probenahmeverfahren erforderlich, um die DNA-Erhaltung sicherzustellen (siehe Anhang A1 und A2). Hier ist v.a. die Konservierung in hoch-prozentigem Ethanol von großer Bedeutung. Probenahmeanweisungen wurden vorbereitet und den Teams vor Ort zur Verfügung gestellt. Keine signifikante Degradation der DNA wurde in den bereitgestellten Proben festgestellt. Eine weitere Entwicklung und Standardisierung dieser Probenahmeanweisungen könnte die nahtlose Integration der DNA-kompatiblen Probenahme in bestehende WRRL-Bewertungsprozesse erleichtern.

Die Entnahme von Umweltproben, beispielsweise Wasserproben, erfordert nur minimale spezifische Fachkenntnisse. In den letzten Jahren wurden verschiedene Optionen entwickelt, um effiziente eDNA-Probenahmemethoden zu ermöglichen, selbst für Personen ohne spezielle Expertise, darunter Filterkartuschen- und Spritzenvorsatzfilter-Kits (Boivin-Delisle et al. 2021, Miya et al. 2022), Peristaltikpumpen (Murienne et al. 2019, Coutant et al. 2021) oder selbstkonservierende Filter in Verbindung mit Citizen-Science-Pumpen (Thomas et al. 2018, 2020). Das Sammeln und Filtrieren von Wasserproben erfordert zwar zusätzlichen Arbeitsaufwand, zum Beispiel im Rahmen von Elektrofischkampagnen. Die eigentliche Probenahme ist jedoch in wenigen Minuten durchgeführt, und viele Standorte können von kleinen Teams in kurzer Zeit beprobt werden. Obwohl eDNA-Metabarcoding am häufigsten zur Fischarten-Detektion verwendet wird (Bylemans et al. 2018b, Nakagawa et al. 2018, Di Muri et al. 2020, Macher et al. 2023c), ist eDNA nicht auf bestimmte Organismengruppen beschränkt und kann verwendet werden, um alle Lebensformen nachzuweisen (Klymus et al. 2017, Ushio et al. 2018, Harper et al. 2019b, Sales et al. 2020, Macher et al. 2021b).

Zusammenfassend werden zukünftig nur geringfügige Anpassungen zur Probenahme von Makrozoobenthos und Diatomeen notwendig sein, um die Proben mit DNA-basierten Verfahren zu analysieren. Die eDNA-Probenahme weicht zwar von den traditionellen Methoden ab, ist aber einfach anwendbar und benötigt kaum Vorkenntnisse oder spezifisches Training.

4.2.2 Fehler beim DNA-basierten Artnachweis und Ähnlichkeit von DNA-basierten und konventionellen Taxa-Listen

Die Unterscheidung zwischen DNA-basierten Methoden, die DNA aus Sammelproben (DNA-Metabarcoding) und Umweltproben (eDNA-Metabarcoding) extrahieren, ist entscheidend, wenn es darum geht, Fehlerquellen und Ähnlichkeiten mit konventionellen Taxalisten zu bewerten (siehe Abbildung 1). Im Rahmen des GeDNA-Projekts wurde ein erster Benchmark für die beiden Biologischen Qualitätskomponenten (BQEs) "benthische Invertebraten" und "benthische Diatomeen" durchgeführt, um die Taxonlisten aus Proben zu vergleichen, die sowohl mit DNA-Metabarcoding als auch mit morpho-taxonomischen Methoden direkt analysiert wurden. Für Fische wurde dies anhand von Fallstudien durchgeführt.

Bei den benthischen Wirbellosen wurden mäßige allgemeine und erhebliche gruppenspezifische Unterschiede zwischen den morpho-taxonomischen und DNA-Metabarcoding-Taxonlisten festgestellt. Besonders signifikant waren die Unterschiede in der taxonomischen Auflösung der Chironomidae. Hier wurden mit DNA-Metabarcoding 180 exklusive Chironomidenarten identifiziert, im Vergleich zu sieben Arten, die nur mit morpho-taxonomischen Methoden entdeckt wurden. Dies unterstreicht die höhere Artenauflösung der DNA-Metabarcoding für bestimmte Gruppen. Hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass die „konventionelle“ Methode mit wenigen Ausnahmen lediglich eine Bestimmung auf Tribus-Niveau vorsieht und die Chironomidae-Taxa auch nur auf diesem Niveau in die Berechnung eingehen. Prinzipiell wäre eine Bestimmung von Chironomidae-Larven auch mit morphotaxonomischen Methoden möglich, allerdings aufwändig und mit großen Unsicherheiten behaftet.

Im Gegensatz dazu wurden bei den benthischen Kieselalgen mit morpho-taxonomischen Methoden deutlich mehr Arten nachgewiesen, die für die ökologische Zustandsklassenbewertung (ÖZK) relevant sind, im Vergleich zur DNA-Metabarcoding-Methode. Hier wurden über 450 Arten mit morpho-taxonomischen Methoden identifiziert, während DNA-Metabarcoding nur 218 Arten erkannte. Dieser Unterschied in der Artenauflösung ist wahrscheinlich auf die fehlende Harmonisierung und veraltete Taxonomie im Phylib-Modul zurückzuführen, das verwendet wurde. Zusätzlich wirkt sich die zu geringe Abdeckung in der Diat.Barcode Datenbank negativ auf die Ergebnisse aus. Hier besteht großer Bedarf an der Erstellung weiterer Barcodes, um eine größere taxonomische Abdeckung zu erreichen. Die Harmonisierung der Taxonomie stellt eine Herausforderung dar und muss vor der Integration von DNA-Metabarcoding in die WRRL geprüft werden. Dies betrifft auch eine Harmonisierung von Taxonnamen zwischen Bundesländern. Hierzu ist das Instrument der Bundestaxaliste entscheidend – und eine Qualitätssicherungsstelle von essenzieller Bedeutung. Die Institutionalisierung dieser Aufgaben ist eine wichtige Erkenntnis und auch Forderung (Leese et al. 2023) für das behördliche Monitoring.

Basierend auf den Ergebnissen des GeDNA-Projektes sollte der Fokus somit als nächstes auf die Harmonisierung von Taxonomie (sowohl für Makrozoobenthos aber insbesondere Diatomeen) zwischen den genetischen Datenbanken und den Taxonlisten aus den WRRL-Modulen (Perlodes und Phylib) bzw. der OTL und BTL gelegt werden. Eine internationale Abstimmung der Harmonisierung mit anderen Ländern wird außerdem empfohlen.

4.2.3 Standardisierung und Interkalibrierung

Eine Qualitätssicherungsstelle ist auch nötig, um die Qualität von DNA-Metabarcoding-Analysen zu gewährleisten, unabhängig von dem ausführenden Analyselabor. Hierzu wurde in den Diskussionen im Rahmen des GeDNA-Projekts einerseits eine Eignungsprüfung über Ringtests vorgeschlagen. Hierzu sollten Referenzproben erstellt und verwendet werden. Solche

Referenzproben sind zudem für die Quantifizierung der Messgenauigkeit von Einzelanalysen nutzbar und können beauftragenden Institutionen dienen die Sicherheit einer Messung zu quantifizieren (und ggf. bei Nichterreichen einer bestimmten Höhe abzulehnen). Dies würde bedeuten, dass Labore die Leistung ihrer Labors und bioinformatischen Pipelines anhand von „Mock-Communities“ (Proben mit bekannter Artenzusammensetzung) demonstrieren. Diese Praxis kann die Akzeptanz von DNA-Metabarcoding in der WRRL-Bewertung fördern und auf die Plausibilität der Daten anstelle der Standardisierung der Methodenvielfalt abzielen. Wichtig in diesem Zusammenhang ist wiederum die Institutionalisierung der Qualitätssicherung.

Das GeDNA-Projekt hat DNA-Metabarcoding-Analysen als komplementäre Methode für das Biodiversitätsmonitoring vorgestellt und evaluiert. Vor der Implementierung in das Routinemonitoring sind jedoch zunächst weitere Maßnahmen im Bereich der Qualitätssicherung und Standardisierung notwendig. Für vergleichbare und reproduzierbare Artenlisten werden technische Mindeststandards sowie eine Qualitätssicherung von der Probenahme bis zu den erstellten Artenliste benötigt (Leese et al. 2023).

Abbildung 14: Vorgeschlagene Ebenen zur möglichen Standardisierung DNA-basierter Biodiversitätsanalysen im behördlichen Natur- und Umweltschutz.



Quelle: Leese et al. (2023)

Die grundlegende Voraussetzung für eine Nutzung von DNA-Metabarcoding im Routinemonitoring ist der regelmäßige Austausch von Fachleuten für die Planung und Umsetzung der DNA-basierten Monitoringprogramme, die Laboruntersuchungen sowie die Bewertung und Berichterstattung. Hier sind besonders eine eindeutige Terminologie, die Standardisierung auf nationalem (DIN oder VDI) und internationalem Level (CEN oder ISO) sowie eine enge Abstimmung mit anderen Staaten von großer Bedeutung. Letzteres ist eine Voraussetzung für die internationale Anerkennung der Verfahren (z.B. Nutzung in der WRRL) und die Vergleichbarkeit der Daten. Für eine Etablierung von DNA-Metabarcoding-Analysen müssen in naher Zukunft die etablierten Probenahmen der Monitoringprogramme angepasst oder erweitert werden. Hierzu konnten im GeDNA-Projekt bereits Empfehlungen ausgesprochen werden. Es gibt jedoch zu viele etablierte Labor- und Bioinformatikprotokolle, um strikte Vorgaben vorzuschreiben. Daher sollte beispielsweise eine Liste von Empfehlungen (z.B. Protokolle oder Primer) als Hilfestellung von offizieller Seite bereitgestellt werden. Eine noch ausstehende Herausforderung ist die gesicherte Zuweisung der Artnamen in DNA-Metabarcoding-Analysen, welche eine qualitätsgesicherte, öffentliche Referenzdatenbanken, die stufenweise erweitert und von Fachleuten verfügbar gemacht werden, erfordern wird. Zukünftig sollten neue Schulungen und Tests zu den Eignungsprüfungen etabliert werden, um die Qualität der DNA-basierten Analysen insgesamt zu verbessern.

Laboranalysen werden gewisse Mindeststandards benötigen, wofür eine Qualitätssicherung kritischer Arbeitsabläufe und Probenarten empfohlen wird. Leese et al. (2023) beschreiben Maßnahmen zur Qualitätssicherung DNA-basierter Analysen auf vier Ebenen (Abbildung 14):

- 1) Rahmenbedingungen für die Art und Weise der Probenahme und den Laborbetrieb, insbesondere mit Blick auf Schulung, Dokumentation und Probenlagerung.
- 2) Regelmäßige Eignungsprüfungen der durchführenden Labore durch kompetente Institutionen, beispielsweise durch Ringtests.
- 3) Mindestanforderungen der Laboruntersuchungen durch Vorgaben für kritische Parameter wie Anzahl, Umfang und Konservierung der Proben, kontaminationsfreie Arbeitsweise, Anzahl der Replikate, Negativ- /Positivkontrollen sowie Sequenziertiefe.
- 4) Qualitätskontrolle analysierter Proben a posteriori, z.B. über Rückstellproben oder Co-Analyse von Blindproben.

Erneut muss betont werden: Die Koordination der Qualitätssicherung wird eine Institutionalisierung erfordern. Hierfür gibt es bereits Erfahrungen und Beispiele aus anderen Messprogrammen, wie z.B. das Bund/Länder-Messprogramm (BLMP) der Küsten.

Die Zuverlässigkeit von DNA-Metabarcoding ist nicht grundsätzlich geringer als die herkömmlichen Methoden. Entscheidend ist, dass Probenmaterial (Gewebe, DNA) eingelagert und erneut analysiert werden kann. DNA-Sequenzlisten sind einsehbar und überprüfbar. Dies ermöglicht eine wesentlich stringenter Qualitätssicherung und damit Datenvergleichbarkeit als bisherige Datenerhebungen (insbesondere Expertenurteil, nur teilweise Qualitätskontrolle über Rückstellproben bzw. Qualitätssicherung über Schulungen).

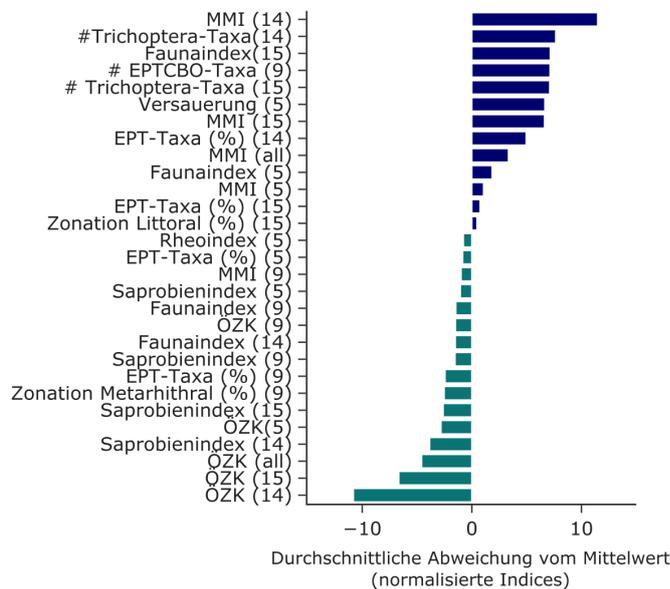
Die Vergleiche zwischen den Methoden sollten sorgfältig durchgeführt werden, und die Einhaltung bestimmter Standards in allen Schritten des DNA-Metabarcoding-Prozesses ist entscheidend, um zuverlässige Ergebnisse zu gewährleisten. Europäische Standards wie der neue eDNA Beprobungsstandard (CEN/TC 230/WG 28 - DNA and eDNA Methods) liefern wichtige Grundlagen.

Die Ergebnisse dieses Projekts wie auch die Resultate zahlreicher internationaler Pionierprojekte (Kelly et al. 2008, Vasselon et al. 2017a, Brantschen et al. 2021, Pont et al. 2021) zeigen, dass die Integration neuer Methoden in die WRRL-Bewertung machbar ist. Allerdings erfordert dies eine Interkalibrierung mit etablierten Verfahren (Birk et al. 2012, Poikane et al. 2014). Das GedNA-Projekt erfüllte diese Anforderung, indem es Proben entlang von Umweltgradienten sammelte und sowohl DNA-Metabarcoding als auch traditionelle morpho-taxonomische Methoden in verschiedenen Flusstypen einsetzte. Es zeigte eine gute Übereinstimmung zwischen den Ansätzen für benthische Makroinvertebraten ($\rho=0,86$), wobei etwa 65% der Proben gleiche Statusklassen aufwiesen. Die Interkalibrierung von Methoden zur Identifizierung von Fischen sollte unkompliziert sein, da bereits viele Studien den Vergleich zwischen traditionellem und eDNA-basiertem Monitoring durchgeführt haben. Dies ermöglicht das parallele Sammeln von Wasserproben zur WRRL-Bewertung und bietet die Chance zur Untersuchung und Interkalibrierung zusätzlicher biologischer Qualitätskomponenten aus denselben eDNA-Metabarcoding-Proben, darunter Wirbellose und Kieselalgen. Für Kieselalgen sollten hingegen primär die Lücken in den Referenzbarcodes und taxonomische Fragen priorisiert werden, bevor eine Interkalibrierung in Betracht gezogen wird.

Die Interkalibrierung von DNA-Metabarcoding zur Nutzung im WRRL-Monitoring ist der essenzielle nächste Schritt. Hierfür sind die rechtlichen Voraussetzungen klar geregelt. Im technischen Report 2015-0.85 „Procedure to fit new or updated classification methods to the results of a completed intercalibration exercise“ (Guidance Document No. 30) werden die benötigten Schritte zur Durchführung der Interkalibrierung aufgeführt. Diese Interkalibrierung konnte im Rahmen des GeDNA-Projektes noch nicht durchgeführt werden, sollte aber der nächste Schritt zur Etablierung von DNA-Metabarcoding sein und kurzfristig abgeschlossen werden, damit eine Implementierung ins Routinemonitoring bis 2027 vollzogen werden kann.

Abbildung 15: Durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert der normalisierten Metrics, welche für die ÖZK-Bewertung in Perloides für die Fließgewässertypen 5, 9, 14 und 15 relevant sind.

Positive Abweichungen (blau) beschreiben eine bessere Bewertung mittels DNA-Metabarcoding, während negative Abweichungen (grün) eine schlechtere Bewertung mittels morpho-taxonomischer Bestimmung zeigen.



Quelle: Macher et al. (in Bearbeitung)

Während eine Interkalibrierung der Diatomeen-Erfassung erst nach einer ausführlichen Harmonisierung der Taxonomie möglich sein wird, sollte die Interkalibrierung der Makrozoobenthos-Erfassung mittels DNA-Metabarcoding einfacher vollzogen werden können. Die Ergebnisse des GeDNA-Projektes zeigten bereits eine gute Übereinstimmung zwischen den Methoden auf und es konnten spezifische Module identifiziert werden bei denen größere und systematische Unterschiede auftreten (Abbildung 15). So wurden besonders große Unterschiede in den spezifischen Indices für die Fließgewässertypen 14 und 15 festgestellt, welche auf der absoluten Anzahl von Trichoptera-Taxa bzw. EPTCBO-Taxa (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, Coleoptera, Bivalvia und Odonata) beruhen. Die genauen Ursachen für die Unterschiede in diesen spezifischen Gruppen zwischen der morpho-taxonomischen Bestimmung und der DNA-Metabarcoding-Analyse werden in der sich in Vorbereitung befindliche Studie (Macher et al., in Vorbereitung) genauer untersucht. In jedem Fall handelt es sich bei diesen Metrics um Ansatzpunkte, um die beiden Methoden zu kalibrieren. Ein Lösungsweg soll in dem nun angelaufenen Vorhaben dbDNA beschrrieben werden: der in GeDNA erstellte Datensatz kann genutzt werden, um die Berechnungsmethoden von Perloides so zu verändern, dass die Abweichungen zwischen klassischer und DNA-basierter Probennahme und Bestimmung weiter

minimiert werden. Dies kann auch unter Nutzung des großen Deutschland-weit verfügbaren Datensatzes zu den klassischen Beprobungsergebnissen zur WRRL durchgeführt werden, in dem die Bewertungsergebnisse von Taxalisten mit und ohne Berücksichtigung der Abundanz verglichen werden. Ggf. sind einige Klassengrenzen anzupassen, um eine weitgehende Übereinstimmung der „Abundanz-freien“ mit der klassischen Methode zu erreichen. Sollte dies gelingen, würde ggf. ein „Compliance Check“ ausreichen, um die DNA-basierten Methoden gleichwertig mit den klassischen Methoden anwenden zu können.

4.2.4 Notwendigkeit der Bewertung der Abundanz und der Genauigkeit der Abundanzschätzungen mit DNA-basierten Methoden

Die Bewertung der WRRL fordert die Evaluierung der Zusammensetzung und Abundanz der Gewässerflora, der benthischen wirbellosen Fauna und der Fischfauna. Die Korrelationen zwischen den Anfangsmengen an DNA in der Probe oder den Beobachtungen/Zählungen in den Proben und den Read-Abundanzen aus DNA-Metabarcoding-Untersuchungen sind in verschiedenen Studien für verschiedene Probenotypen untersucht worden. Dabei wurden bestenfalls moderate Korrelationen beobachtet. Es ist wichtig zu beachten, dass Abundanz, Biomasse und DNA-Zählungen nicht notwendigerweise korreliert sein müssen.

Größenunterschiede zwischen taxonomischen Gruppen in den Proben können zu falsch-negativen Ergebnissen führen, insbesondere wenn größere Exemplare mehr DNA beitragen als kleinere. Es gibt auch Umweltfaktoren wie Wetterereignisse oder chemische Parameter, welche die Anzahl der Reads beeinflussen können. Diese Vielzahl von Einflussfaktoren auf die Read-Abundanzen macht es schwierig, sie als direkte Schätzung für die Abundanz oder Biomasse von Arten zu verwenden.

In Bezug auf die WRRL-Bewertung werden derzeit Daten zur relativen Häufigkeit (Makrozoobenthos, Kieselalgen) bzw. absoluten Häufigkeit (Fische) für die Berechnung der ökologischen Zustandsklassen verwendet. Dies beinhaltet z.B. den Prozentsatz der EPT-Taxa und den Saprobienindex für benthische Invertebraten, die Häufigkeit von Referenzarten für Fische und den Diatomeenindex für Kieselalgen. Mehrere Studien haben jedoch gezeigt, dass Zustandsklassen, die auf Presence-Absence-Daten basieren, eine hohe Übereinstimmung mit denen der taxonomisch bestimmten Proben zeigten. Dies wirft die Frage auf, ob das Fehlen von Daten zur Häufigkeit bei der Verwendung von DNA-Metabarcoding als Ausschlusskriterium berücksichtigt werden sollte. Eine beträchtliche Anzahl von Flüssen und spezifischen BQEs wurde bisher nicht bewertet, hauptsächlich aufgrund des Mangels an verfügbaren Daten zur Häufigkeit. Da das Schließen dieser Lücken mit herkömmlichen Methoden allein unrealistisch scheint, sollten DNA-basierte Methoden in Betracht gezogen werden, um Oberflächengewässer zu bewerten, für die sonst keine ökologische Zustandsklasse erhoben würden. Obwohl die Daten zur Häufigkeit in diesen Fällen möglicherweise nicht erfasst werden, würden ökologische Zustandsklassen abgeleitet, die eine hohe Übereinstimmung mit denen auf Häufigkeitsdaten basierten. Die Generierung von Daten an diesen fehlenden Standorten sollte als wichtiger erachtet werden als das Fehlen von Informationen, allein aufgrund des Mangels an Daten zur Häufigkeit. Dies kann besonders in Situationen relevant sein, in denen das Sammeln von Abundanzdaten schwierig oder zu kostspielig ist.

Wichtig ist allerdings zu erwähnen, dass sich unter den über 400 interkalibrierten Methoden zur Bewertung des ökologischen Zustands auch zahlreiche Verfahren befinden, die nicht auf relativer oder absoluter Abundanz basieren (z.B. Pont et al. 2021). Entscheidend ist in dem Kontext, dass ein „Compliance Check“ der Methode erfolgreich durchgeführt wurde (Technical Report - 2015 – 085: Procedure to fit new or updated classification methods to the results of a completed intercalibration exercise).

4.2.5 Fähigkeit von DNA-basierten Methoden zur Erfassung sensibler Taxa

Die Identifizierung sensibler Taxa spielt eine wichtige Rolle in der Wasserrahmenrichtlinie, da diese Arten empfindlich auf Umweltveränderungen reagieren und daher wichtige Indikatoren für die Gewässerqualität sind. Mehrere Studien haben gezeigt, dass DNA-basierte Methoden gut dazu geeignet sind, sensible und oft seltene Arten zu erkennen. Beispielsweise hat sich die eDNA-Analyse als effizienter bei der Erkennung seltener Fischarten erwiesen im Vergleich zu morpho-taxonomischen Methoden (Civade et al. 2016, Kusanke et al. 2020, Brys et al. 2021, Macher et al. 2023c). Auch das DNA-Metabarcoding von benthischen Invertebraten-Sammelproben hat ähnliche Anzahlen von Referenzarten, wie EPT- und EPTCBO-Taxa, sowie wesentlich mehr Arten der Chironomidae erfasst (Macher et al., vorläufige Daten). Diese Familie wird derzeit nicht in WRRL-Bewertungen verwendet, könnte jedoch wichtige Indikatorarten beinhalten. Die Qualität der Identifizierung sensibler Taxa durch DNA-basierte Methoden hängt jedoch stark von der Vollständigkeit der Referenzdatenbanken ab. Diese Methoden sind auf gut gepflegte und vollständige Datenbanken angewiesen, die für einige biologische Qualitätskomponenten, wie das Phytobenthos (insbesondere Kieselalgen), möglicherweise nicht ausreichend vorhanden sind. Daher sind sensible Taxa und Referenzarten in diesen Datenbanken oft unterrepräsentiert. Projekte wie das vom UBA geförderte dbDNA-Projekt sowie das Bioscan-Europe-Projekt, zielen darauf ab, Referenzdatenbanken zu vervollständigen, und werden in den kommenden Jahren von entscheidender Bedeutung sein, um diese Lücken zu schließen und die Genauigkeit von DNA-Metabarcoding-Methoden zur Identifizierung sensibler Taxa zu verbessern. Die Verfügbarkeit umfassender und gut gepflegter Referenzdatenbanken wird entscheidend sein, um DNA-Metabarcoding als eine effektive Methode zur Identifizierung von sensiblen Taxa in der WRRL-Bewertung zu etablieren. Dabei sollten spezifische Referenzdatenbanken als verpflichtende Vorgaben für die taxonomische Zuordnung im WRRL-Monitoring vorgegeben werden, ähnlich zur aktuell genutzten operationellen Taxaliste (OTL) oder der Bundestaxaliste (BTL). Diese Referenzdatenbanken sollten mit Versionsnummern versehen werden und nur auf verifizierten 'Goldstandard'-Sequenzen beruhen. Diese Vorgehensweise wird zurzeit im dbDNA-Projekt erarbeitet.

Da die in der WRRL-Bewertung verwendeten Indizes auf taxonomischen Zuordnungen basieren, ist eine gute Artenrepräsentation in den Referenzdatenbanken entscheidend. Derzeit wird die BOLDsystems-Datenbank häufig für benthische Invertebraten verwendet und enthält etwa 97% der Gattungen und 89% der Arten der operativen Taxaliste, die für Perlodes verwendet wird (verfügbar als BOLD-Checkliste: CL-1345 Deutsche Operative Taxonliste). Die wenigen bislang nicht verfügbaren Taxa sind meist sehr selten und werden bei den Beprobungen so gut wie nie gefunden. Bei benthischen Kieselalgen haben etwa 23% der Gattungen und 8% der Arten, die auf der Phylib-Taxonliste aufgeführt sind, *rbcl*-Referenzsequenzen in der diat.barcode-Datenbank (Rimet et al. 2019). Sowohl für Fischanalysen werden die Marker 12S als auch COI häufig verwendet. Deren Sequenzen sind über Genbank zugänglich, vorzugsweise durch die kuratierte Version Midori2 (Leray et al. 2022). Dennoch variiert die Verfügbarkeit von Referenzsequenzen je nach Marker. Für den 12S-Marker besaßen etwa 89% der für fiBS (Berechnung der fischbasierten ökologischen Bewertung von Fließgewässern gemäß EG-Wasserrahmenrichtlinie) verwendeten Fischarten Referenzsequenzen, während für 97% COI-Barcodes verfügbar waren (Tabelle 2). Während die Verfügbarkeit von Referenzsequenzen für benthische Invertebraten und Fische ausreichend ist, beschränken erhebliche Barcode-Lücken derzeit die DNA-Metabarcoding-Analysen von Kieselalgen. Der resultierende Mangel an Referenzarten, die sich Metabarcoding-Daten zuordnen lassen, wirkt sich anschließend negativ auf die Zuordnung der ökologischen Statusklassen für diese BQE aus. Darüber hinaus müssen Inkonsistenzen in der Nomenklatur, Synonyme, kryptische Arten und der Status von Arten für Kieselalgen in Zukunft gepflegt und gelöst werden. International verwendete Software zur

Berechnung von Metriken für Kieselalgen, wie die OMNIDIA-Software (Lecointe et al. 1993) oder das R-Paket DiaThor (Nicolosi Gelis et al. 2022), bieten derzeit aktuellere taxonomische Grundlagen für den methodischen Vergleich. Zusammenfassend hängt der Einfluss nicht zugeordneter Sequenzen und Barcode-Lücken hauptsächlich von der bewerteten BQE ab.

4.2.6 Nicht zugeordnete Sequenzen

Die Anzahl der nicht zugeordneten Sequenzen hängt stark von der Verfügbarkeit von Referenzsequenzen ab. Im Allgemeinen variiert die Anzahl der verfügbaren Sequenzen pro aquatischer Organismengruppe, die als Indikatorarten in der Biomonitoring-Anwendung verwendet wird, je nach taxonomischer Gruppe und Land (Weigand et al. 2019).

Tabelle 2: Analyse der Vollständigkeit von Referenz-Datenbanken und Vergleich der verfügbaren Taxa zu den Bewertungsmodulen (Perloides, Phylib und fiBS), die im GeDNA-Projekt für die taxonomische Zuordnung genutzt wurden.

Modul	Perloides	Phylib	fiBS	
Marker	COI	<i>rbcL</i>	12S	COI
BQE	Benthische wirbellose Fauna	Benthische Diatomeen	Fische	Fische
Datenbank	BOLDsystems	diat.barcode	Midori2 v255	Midori2 v255
Vorhanden	569	343	58	63
Fehlend	64	3237	7	2
Vorhanden (%)	89.89	9.58	89.23	96.92

4.2.7 Kosten und Verarbeitungsgeschwindigkeit im Vergleich zu traditionellen Methoden

Die Kosten und Verarbeitungsgeschwindigkeit variieren je nach gewähltem Workflow und Methode für DNA-Metabarcoding-Analysen. Fortschritte in der Technik haben zu kosteneffizienteren und schnelleren Laborverfahren geführt, was für Sammelproben, Wasserproben und terrestrischen Malaise-Fallenproben demonstriert werden konnte (Buchner et al. 2021, 2023). Automatisierte und halbautomatisierte Pipettierroboter reduzieren Bearbeitungszeiten und minimieren Personalkosten. Die Verwendung selbst hergestellter Reaktionspuffer senkt die Kosten weiter, da sie leichter kontrollierbar sind als kommerzielle Kits. Die Sequenzierungskosten sind stark gesunken, und eine sorgfältige Projekt- und Probenplanung ist entscheidend, um die Kosteneffizienz zu maximieren. Neue Sequenzierplattformen können Millionen von Reads pro Sequenzierungslauf generieren. Dadurch konnten die Materialkosten pro Probe auf unter 15 € gesenkt werden, sogar unter Berücksichtigung der Personalkosten. Selbst als kommerzielles Angebot sind Preise ab 50 € zukünftig möglich, jedoch klar abhängig vom Umfang und der Vorbereitung des Probenmaterials und geforderten Beratungsangeboten und Berichtspflichten. Werden wenige Proben zur Analyse geschickt und sind Sortier- oder Aufbereitungsschritte nötig, so können die Kosten je Probe auch über 300 € liegen. Das Potenzial an Kosteneinsparungen ist jedoch verglichen mit den traditionellen WRRL-Bewertungsmethoden erheblich. Zum Vergleich reichen die Kosten pro

Probe in der traditionellen WRRL-Bewertung von 260 € bis 1500 € (Buss et al. 2014). Für individuelle Analysen sind die Kosten allerdings oft auch geringer (100 bis 350 € je Probe).

Zusammenfassend bietet die DNA-Metabarcoding eine attraktive Lösung für die WRRL-Bewertung, mit schneller Verarbeitung, niedrigeren Kosten, standardisierten Workflows und hoher taxonomischer Auflösung. Gerade mit Blick auf weitere Berichtspflichten im Biodiversitätsmonitoring könnten hier künftig Synergien genutzt werden und andere Umweltbeobachtungsprogramme (FFH, Invasive Arten, Vogelmonitoring, Biodiversitätsstrategie) unterstützt werden.

4.2.8 Wohl der Tiere, Gesundheit und Sicherheit, Umweltauswirkungen

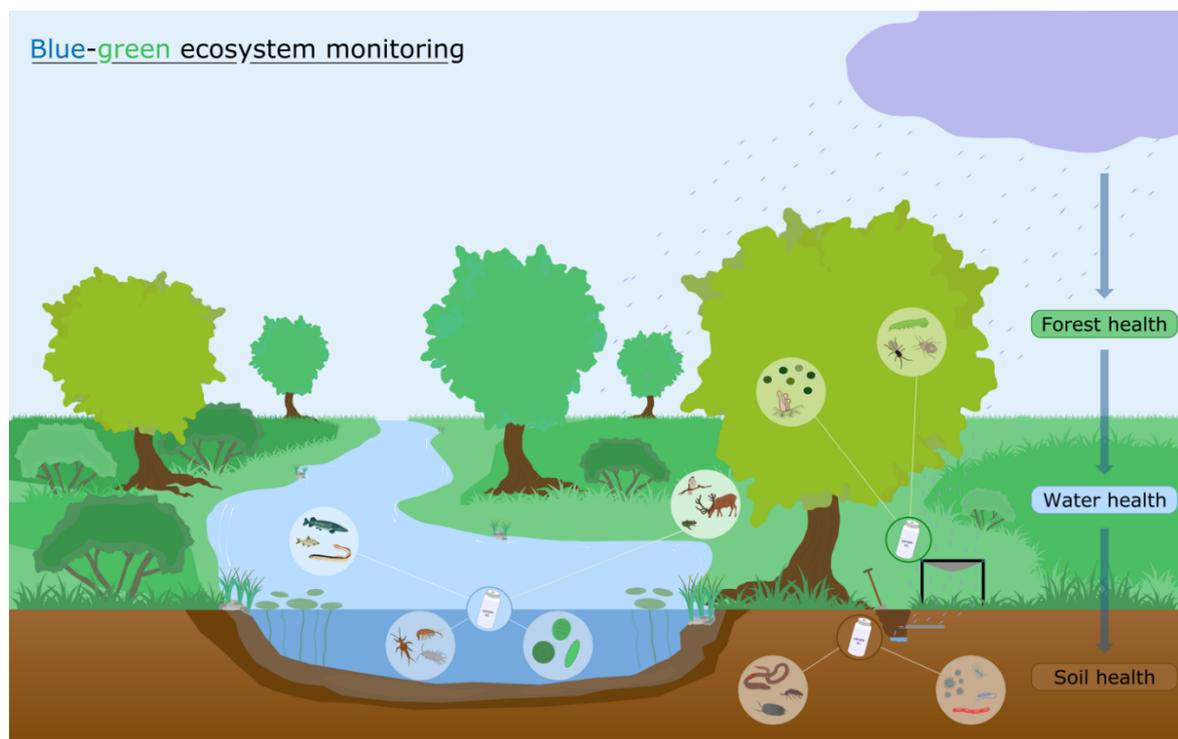
Die Probenahme für DNA-Metabarcoding-Analysen und morpho-taxonomische Ansätze erfolgt ähnlich und erfordert die Sammlung von aquatischen Organismen wie benthischen Wirbellosen und Kieselalgen, die in Ethanol konserviert werden. Ein Vorteil der Umwelt-DNA (eDNA)-Metabarcoding besteht jedoch in ihrer minimalinvasiven Probenahme. Hierbei werden nur geringe Wasservolumina benötigt und die Proben können oft von Brücken oder vom Ufer aus entnommen werden. Dies minimiert Störungen in empfindlichen Lebensräumen, Schutzgebieten und während der Brutzeiten. Zusätzlich ermöglicht die Analyse von Wasserproben die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Organismengruppen, einschließlich aquatischer und terrestrischer Wirbellose, Wirbeltiere wie Fische, Säugetiere, Vögel, Amphibien und Kieselalgen. Dies verringert den Aufwand für die Probenahme erheblich. Die Probenahme und Wasserfiltration sind in der Regel zeitsparend, wodurch mehrere Standorte effizient beprobt werden können. Die eDNA-Metabarcoding-Analyse aus Wasserproben ist vor allem in der Fischbewertung etabliert. Hierbei minimiert sie den Stress für die untersuchten Fische im Vergleich zu traditionellen Methoden wie dem Elektrofischen, das oft Verletzungen und Stress verursacht. Beachtenswert ist jedoch, dass DNA-basierte Methoden im Vergleich zu traditionellen Techniken mehr Plastikabfall erzeugen. Die Reduzierung von Einwegmaterialien und die Wiederverwendung gereinigter Ausrüstung sind erste Schritte zur Lösung dieses Problems. Die Herausforderung besteht darin, Wege zur effizienteren Wiederverwendung von Laborausstattung und zur Förderung einer nachhaltigeren Nutzung zu entwickeln.

4.3 Umwelt-DNA-Metabarcoding zeigt das Potenzial für die routinemäßige und langfristige Monitoring der biologischen Vielfalt auf

Umwelt-DNA-Metabarcoding hat großes Potenzial für WRRL-Bewertungen. Im Gegensatz zu invasiven Verfahren wie Schöpfnetzen ermöglicht sie die nicht-invasive, effiziente Erfassung von Umwelt-DNA und eine umfassende Biodiversitätsanalyse (Abbildung 16). Diese Methode erlaubt die Probenahme aus der Umgebung, ohne direkten Kontakt zu den Organismen oder ihren Lebensräumen. Während Sammel- und Abkratzen ortsspezifische Signale liefern, fließen eDNA-Moleküle mit dem Fluss und bieten eher ein Signal aus einem weiteren Einzugsgebiet. Dies ermöglicht die Analyse größerer Flussabschnitte, was ein besseres Gesamtverständnis des Ökosystems fördert und fundiertere Entscheidungen und Managementstrategien unterstützt. Ein weiterer Vorteil ist die Vielseitigkeit dieser Methode. Während herkömmliche Proben oft auf eine spezifische Gruppe oder Biologische Qualitätskomponente ausgerichtet sind, können eDNA-Metabarcodinganalysen aus Wasserproben Informationen über verschiedene Organismen liefern, ohne zusätzlichen Aufwand. Beispielsweise können Fischproben gleichzeitig Daten zur Verbreitung von Säugetieren und Vögeln sammeln, ohne die Qualität der Fischbewertung zu beeinträchtigen (Macher et al. 2021b). Zusammengefasst kann die Integration der eDNA-Metabarcoding in WRRL-Bewertungen zu einer effizienten, leistungsstarken Methode führen, die herkömmliche Ansätze ergänzt. Sie liefert wertvolle Informationen zur Gesundheit und

Biodiversität von aquatischen Ökosystemen auf breiter räumlicher und taxonomischer Ebene. Auf der anderen Seite ist die räumliche Zuordnung von Artenvorkommen bei eDNA-Proben schwieriger als bei klassischen Probennahmen, da Moleküle mit der fließenden Welle über längere Strecken transportiert werden können.

Abbildung 16: Umwelt-DNA-Metabarcoding birgt enormes Potential für ein holistisches Biodiversitätsmonitoring von aquatischen und terrestrischen Lebensräumen und deren Schnittstellen („Blue-Green ecosystem monitoring“) durch die Analyse von Wasserproben aus Gewässern, von Regenwasser und Bodenproben.



Quelle: Dissertation Till-Hendrik Macher (2023), Universität-Duisburg-Essen

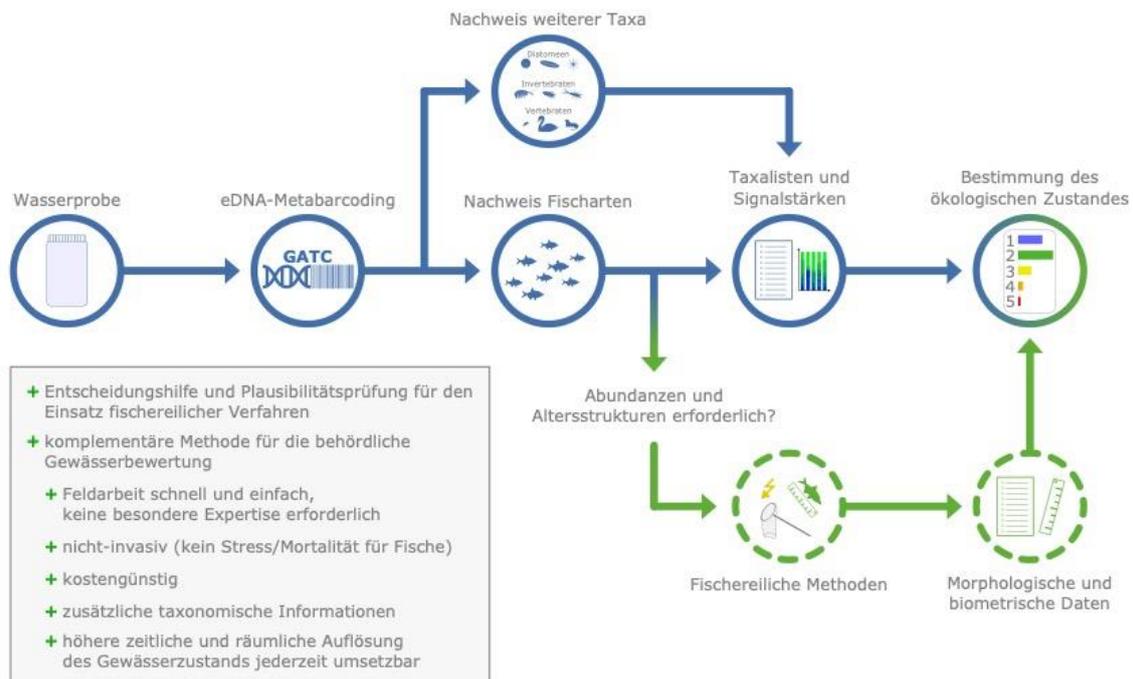
4.3.1 eDNA-Pilot-Studie an der Mulde

Das Ziel dieser Studie war es, die Effizienz des eDNA-Metabarcoding-Verfahrens im Umweltmonitoring im Vergleich zu den herkömmlichen fischereilichen Methoden zu bewerten, die derzeit zur Bewertung der Funktion der Lebensraumverbesserung (FFA) sowie im Rahmen des Monitorings gemäß der WRRL verwendet werden. Die Anforderungen der WRRL in Bezug auf das Monitoring der Fischfauna leiten sich aus den normativen Definitionen in Anhang 5 (Abschnitt 1.2 und weiteren) ab, die zur Einstufung des ökologischen Zustands oder Potenzials herangezogen werden. Die genannten Kriterien zur Bewertung der Fischfauna beinhalten: i) die Artenvielfalt, ii) die Häufigkeit der Arten und iii) die Altersstruktur der Fischarten in Fließgewässern.

Dafür wurden im April 2019 an einem Tag insgesamt 19 eDNA-Proben ober- und unterhalb vom Muldewehr in Dessau gesammelt. Die eDNA-Probennahme erfolgte somit parallel zu einem intensiven fischereilichen Monitoring, welches über 17 Wochen am Muldewehr zur Funktionsbewertung einer 2017 in Betrieb genommenen Fischaufstiegsanlage durchgeführt wurde. Zusätzlich wurden Daten aus den WRRL-Probennahme 2017-2019 verglichen (Abbildung 17). Aufgrund von OTUs, die nicht immer bis zur Art identifiziert werden können, ist der Vergleich zwischen den Ergebnissen der fischereilichen Methoden und den genetischen Daten nur begrenzt möglich und eröffnet Raum für Interpretationen. Wenn die Ergebnisse

beider Methoden zusammengerechnet werden, konnten insgesamt 32 verschiedene Fische nachgewiesen, wobei vier ausschließlich durch die fischereilichen Methoden und fünf ausschließlich durch eDNA-Metabarcoding identifiziert wurden (Abbildung 18A). Mit einer konservativen Betrachtungsweise stimmten die Ergebnisse beider Methoden für 20 Arten im untersuchten Gewässerabschnitt überein. Wenn wir auch nicht eindeutig identifizierte OTUs berücksichtigen, erhöht sich die Schnittmenge der mit beiden Methoden gefundenen Arten auf 23 von insgesamt 32 nachgewiesenen Arten (Abbildung 18B).

Abbildung 17: Integration der eDNA-Metabarcoding-Verfahren in die behördliche Gewässerbewertung für den komplementären Einsatz zu fischereilichen Methoden.



Quelle: Macher et al. 2023a

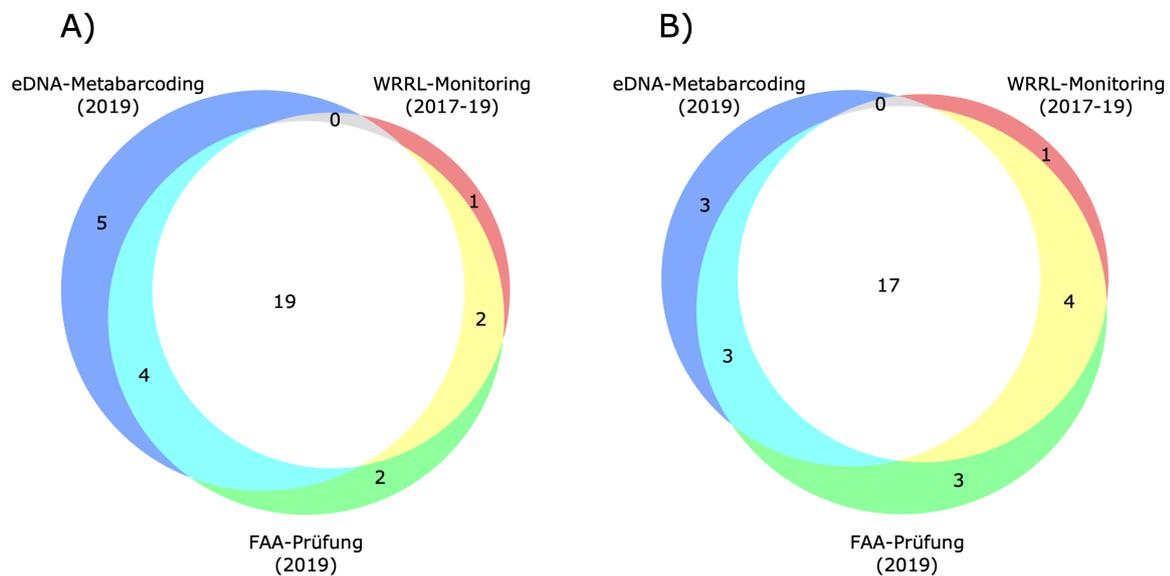
Im Vergleich zu den WRRL-Monitoring-Daten wurden große Übereinstimmungen zu den beiden vorherigen Datensätzen beobachtet. In den drei betrachteten Jahren wurden insgesamt 22 Fischarten nachgewiesen. In den beiden Jahren 2017 und 2018 wurden jeweils 19 Arten nachgewiesen, wobei 16 davon in beiden Jahren vorkamen und jeweils drei Arten spezifisch entweder 2017 oder 2018 vorkamen. Dies entspricht einer Übereinstimmung von 72,7 %. Im Jahr 2019 wurden hingegen lediglich acht Arten gefunden. Interessanterweise wurden alle im Jahr 2019 nachgewiesenen Arten bereits in den Jahren 2017 und 2018 identifiziert.

Die Daten aus fischereilichen Methoden wurden mit den Ergebnissen des eDNA-Metabarcoding-Ansatzes verglichen, und es zeigte sich, dass dieser Ansatz effektiv die taxonomische Zusammensetzung der Fischarten in Gewässern erfassen kann. Die Probenahme ist dabei vergleichsweise simpel und unkompliziert, da lediglich Wasserproben im Feld entnommen und gefiltert werden müssen. Dies ermöglicht es, innerhalb eines Tages mehrere Proben an verschiedenen Stellen zu sammeln, und somit in kurzer Zeit mit minimalem Aufwand eine große Anzahl von Gewässern zu beproben. Dies wiederum erlaubt eine optimale Nutzung der verfügbaren Ressourcen für das Monitoring, um die räumliche und zeitliche Abdeckung der Fischartengemeinschaften signifikant zu erweitern.

In der Probenahme an einem Fließgewässer werden die Anzahl der Fischindividuen als wichtiger Parameter betrachtet. Bei der Analyse der eDNA-Metabarcoding-Daten ist jedoch zu beachten, dass nur Signalstärken in Form von relativen Readabundanz erzeugt werden. Absolute Abundanz, also die genaue Anzahl der Fischindividuen oder die Biomasse, können nach den gängigen fischereilichen Standards nicht ermittelt werden. Die WRRL selbst definiert nicht eindeutig, ob Abundanz als relative oder absolute Häufigkeit (oder beides) zur Bewertung des ökologischen Zustands herangezogen werden soll. In Deutschland wird im Bewertungsverfahren fiBS hauptsächlich auf relative Abundanz (Dominanz) gesetzt. Das Fehlen von Daten zur absoluten Abundanz in den Ergebnissen des Metabarcoding stellt daher an sich kein grundsätzliches Hindernis für den Einsatz dieser Methoden im Rahmen der WRRL dar.

Abbildung 18: Venn-Diagramme, welche die drei Datensätze am Muldewehr vergleichen.

Die DNA-Metabarcoding-Daten wurden einmal herkömmlich (A) und einmal konservativ (B) ausgewertet, da nicht immer alle OTUs eindeutigen Arten zugewiesen werden können.



Quelle: Macher et al. 2023a

Die fischereilichen Methoden bieten den klaren Vorteil, dass sie die Erfassung von Altersstrukturen ermöglichen, was ein wichtiger Parameter bei der fiBS-Bewertung ist. Dies ist derzeit mit eDNA-Metabarcoding noch nicht möglich. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass der Methylierungsgrad von eDNA mit dem Alter des zugehörigen Organismus in Zusammenhang stehen könnte (Zhao et al. 2023). Bisher wurde dies jedoch nur für einzelne Arten nachgewiesen und erfordert erheblichen zusätzlichen methodischen Aufwand sowie vertiefte Kenntnisse über die untersuchte Art. Daher wird die Ermittlung von Altersstrukturen mithilfe von eDNA-Metabarcoding-Verfahren vermutlich auch mittelfristig eine Herausforderung bleiben.

4.3.2 Umwelt-RNA-Metabarcoding

Umwelt-RNA-Metabarcoding, kurz eRNA-Metabarcoding, wurde als potenzielle Methode vorgeschlagen und kann insbesondere dann wertvoll sein, wenn es darum geht, nur die metabolisch aktive Gemeinschaft zu bewerten. In im GeDNA-Projekt eine Studie durchgeführt, welche die Eignung von eRNA im Vergleich zu eDNA für die Detektion von Wirbeltieren und Wirbellosen hinsichtlich Nachweiswahrscheinlichkeiten und Lokalität untersuchte. Dabei ergab sich, dass die eRNA-Metabarcoding bei der Bewertung von Fischen eine höhere Auflösung und

bessere Darstellung für lokale und aktuelle Arten bot als eDNA-Metabarcoding. Es ist jedoch zu beachten, dass Umwelt-RNA-Metabarcoding durch die Wahl des Markergens beeinflusst werden kann, da Konzentrationen und Abbauraten zwischen ribosomaler und messenger RNA-Markern variieren, was die Interpretation der Ergebnisse beeinflussen kann. Ein Beispiel verdeutlicht dies: Während bei DNA-Metabarcoding-Analysen keine Unterschiede zwischen der Verwendung von 12S- und COI-Markern erwartet werden, können bei der eRNA-Metabarcoding Unterschiede in den Nachweisraten auftreten, da der 12S-eRNA-Metabarcodingsansatz auf die hochabundante kleine Einheit des mitochondrialen Ribosoms abzielt, die stabil ist. Im Gegensatz dazu ist COI-mRNA anfälliger für den Abbau. Obwohl die eRNA-Metabarcoding Vorteile wie die Ortsbezogenheit und verbesserte Nachweisraten bietet, geht dies mit einem erhöhten Aufwand und Kosten für die Probenahme einher. Für Ressourcen beschränkte Untersuchungen von häufigen Fischarten in einem Einzugsgebiet bleibt die eDNA-Metabarcoding die bevorzugte Methode. Die eRNA-Metabarcoding kann jedoch eine effiziente Alternative sein, insbesondere für Studien, die sich auf lokalisierte Signale und die aktive Gemeinschaft konzentrieren.

4.3.3 Anwendungsbeispiel für hochauflösendes Monitoring mittels eDNA-Metabarcoding

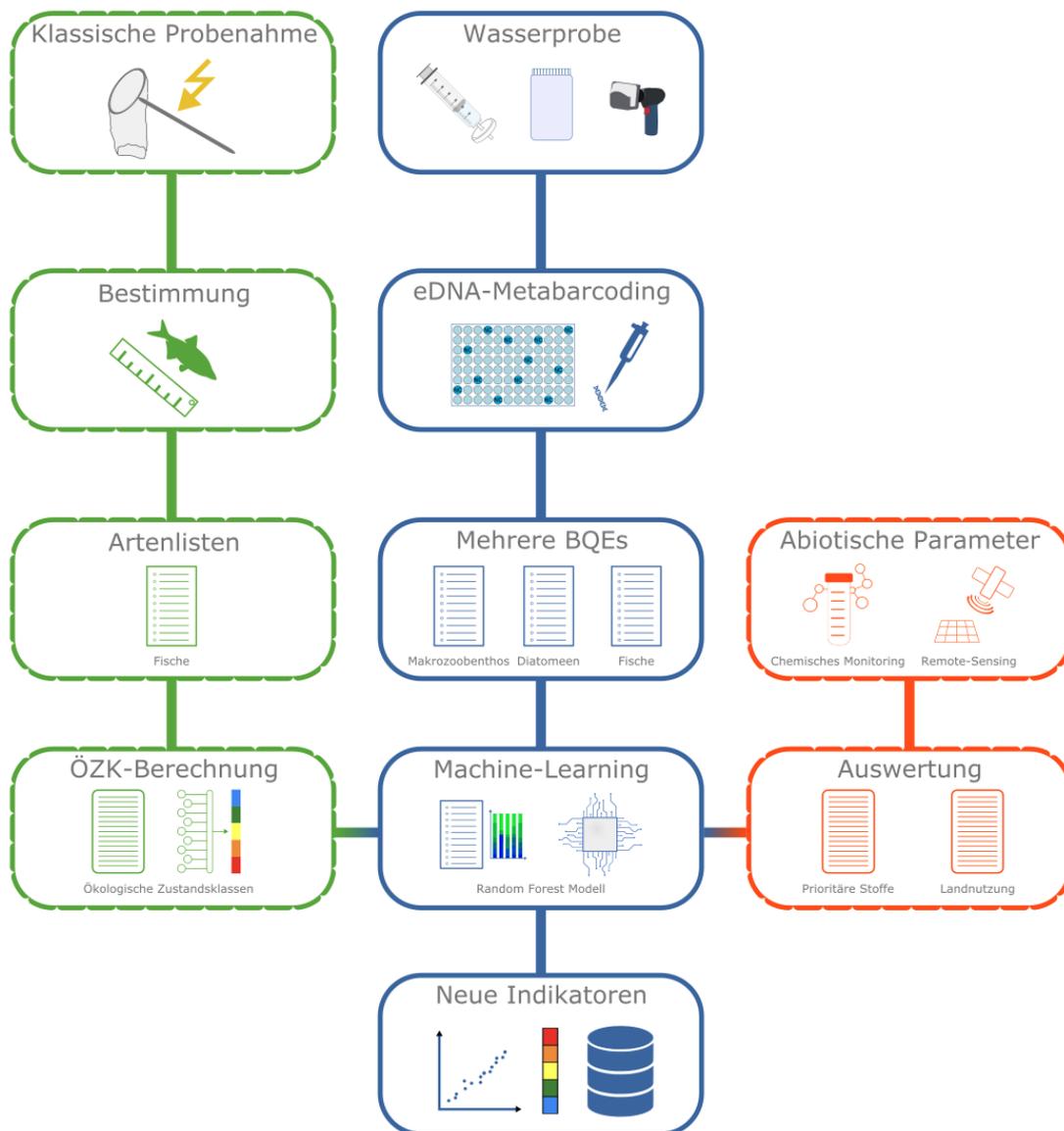
Um die Praktikabilität des eDNA-basierten Monitorings zu belegen, wurde im Rahmen des GeDNA-Projektes eine umfassende einjährige Bewertung von Fischen, Vögeln, Säugetieren, Wirbellosen und Kieselalgen an der Lippemündung durchgeführt. Diese Studie lieferte wertvolle Informationen für drei BQE und zusätzliche Daten zu Vögeln und Säugetieren. Fischarten wurden zuverlässig unabhängig von Jahreszeit und Umweltfaktoren nachgewiesen. Es gab einige Schwankungen in der Alpha-Diversität der Fische, aber die Ergebnisse legen nahe, dass eine zuverlässige Bewertung von Fischen das ganze Jahr über mit eDNA durchgeführt werden kann. Es gab Hinweise auf Korrelationen zwischen der DNA-Konzentration im Wasser und der Anzahl der Reads. Die am häufigsten nachgewiesene Fischart war die Schwarzmundgrundel, eine stark invasive Art. Vorübergehende Spitzen in relativen Read-Häufigkeiten wurden für den Hecht und die Quappe beobachtet, die gut mit ihren Laichaktivitäten korrelierten. Vogel- und Säugetierarten, insbesondere Vögel, wurden ebenfalls nachgewiesen, wobei Unterschiede im Zugverhalten beobachtet wurden. Die Alpha-Diversität der aquatischen Wirbellosen erreichte im Frühling, Sommer und Herbst ihren Höhepunkt, was mit der Laichsaison vieler aquatischer Wirbellosen übereinstimmte. Ein Hochwasserereignis führte zu Verdünnungseffekten auf die eDNA-Signale, hatte jedoch Auswirkungen auf die ökologische Statusklassifizierung der benthischen Wirbellosen. Die Zustandsklasse der Kieselalgen in der Lippemündung wurden das ganze Jahr über als "schlecht" eingestuft. Diese Klassifizierung wurde durch Referenz-Barcode-Lücken beeinflusst. Zusammenfassend zeigt diese hochauflösende eDNA-Monitoring das Potenzial der eDNA-Metabarcoding für eine effiziente Biomonitoring-Methode, insbesondere für Wirbeltiere und Wirbellose. Bemerkenswerterweise betragen die gesamten Laborkosten etwa 20 € pro Probe, was eDNA-Analysen zu einer kosteneffizienten Option für hochauflösende Monitoringkampagnen macht.

Die Integration von eDNA-Metabarcoding in die WRRL -Bewertung ist eine realistische Option. Dies könnte parallele Wasserprobenahmen für eDNA-Analysen beinhalten, was bei einer europaweiten Bewertung zu vertretbaren Kosten führen würde. Da herkömmliche Methoden allein den Monitoringbedarf der WRRL nicht mehr bewältigen können, sollte diese Investition in Betracht gezogen werden.

4.4 Entwicklung neuer Indices: Maschinelles Lernen

Abbildung 19: Schematischer Arbeitsablauf zur Veranschaulichung der Entwicklung neuer Indices auf der Grundlage von eDNA-Proben, die parallel zur WRRL-Fischbewertung zusätzlich zu den Daten aus der chemischen Überwachung der WRRL und der Fernerkundung gesammelt wurden.

Durch die Kombination von Umweltparametern und eDNA-Metabarcoding können neue Indizes entwickelt werden.

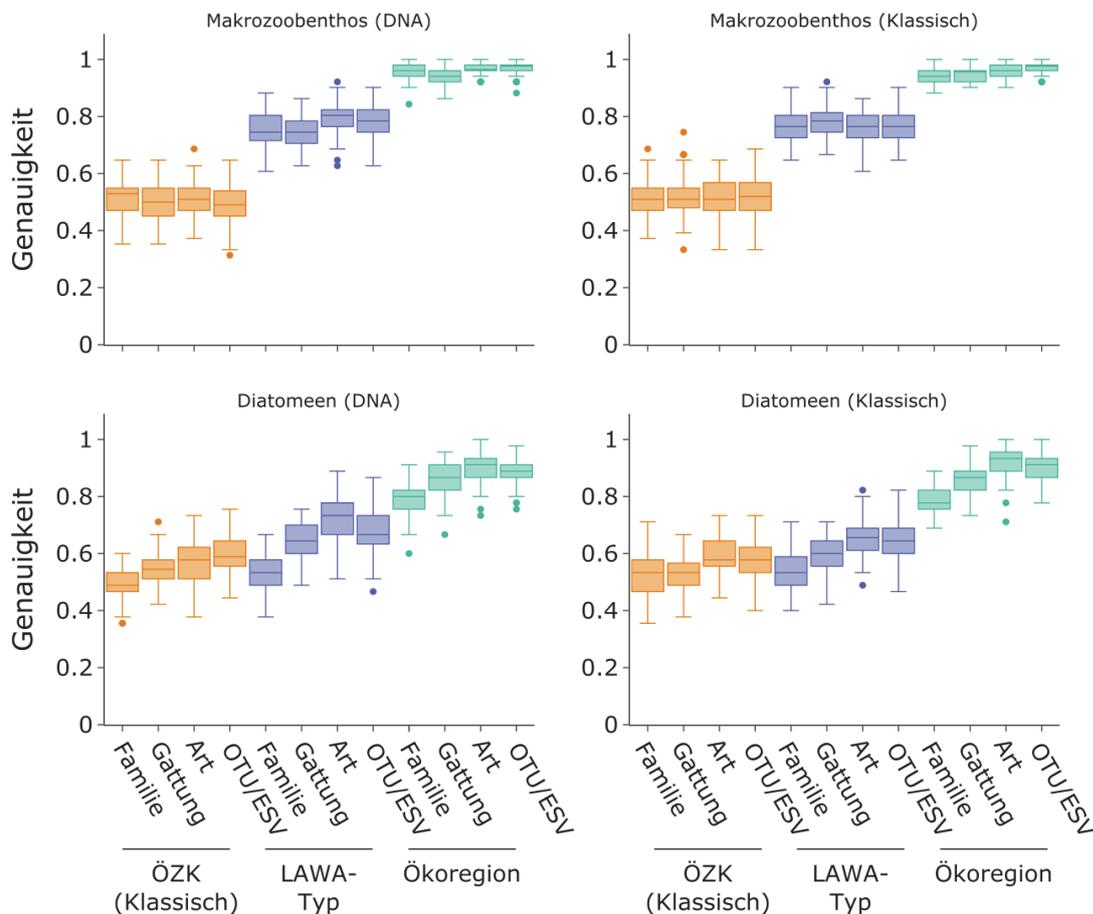


Quelle: Dissertation Till-Hendrik Macher (2023), Universität-Duisburg-Essen

Das letzte Projektziel von GeDNA war auch das Prüfen neuer Indices. Umwelt-DNA-Metabarcoding-Daten, die gleichzeitig mit der herkömmlichen WRRL-Bewertung erhoben werden, bergen das Potenzial nicht nur zur Erleichterung von Interkalibrationsbemühungen im Rahmen der bestehenden Methodik, sondern auch zur Anregung innovativer Ansätze, darunter die Entwicklung von neuen Indizes, die auf maschinellem Lernen basieren (Abbildung 19).

Dieses Potenzial wurde bereits für Süßwasser- (Apothéloz-Perret-Gentil et al. 2021, Brantschen et al. 2021, Keck et al. 2023) und Meeresökosysteme (Cordier et al. 2017, 2019, Frühe et al. 2021) demonstriert.

Abbildung 20: Boxplots, die die Genauigkeit des Random-Forest-Modells bei der Vorhersage der ökologischen Zustandsklasse (ÖZK), des Flusstyps und der Ökoregion auf der Grundlage von Familie, Gattung, Art und OTUs (Makrozoobenthos) und ESVs (Diatomeen) zeigen.



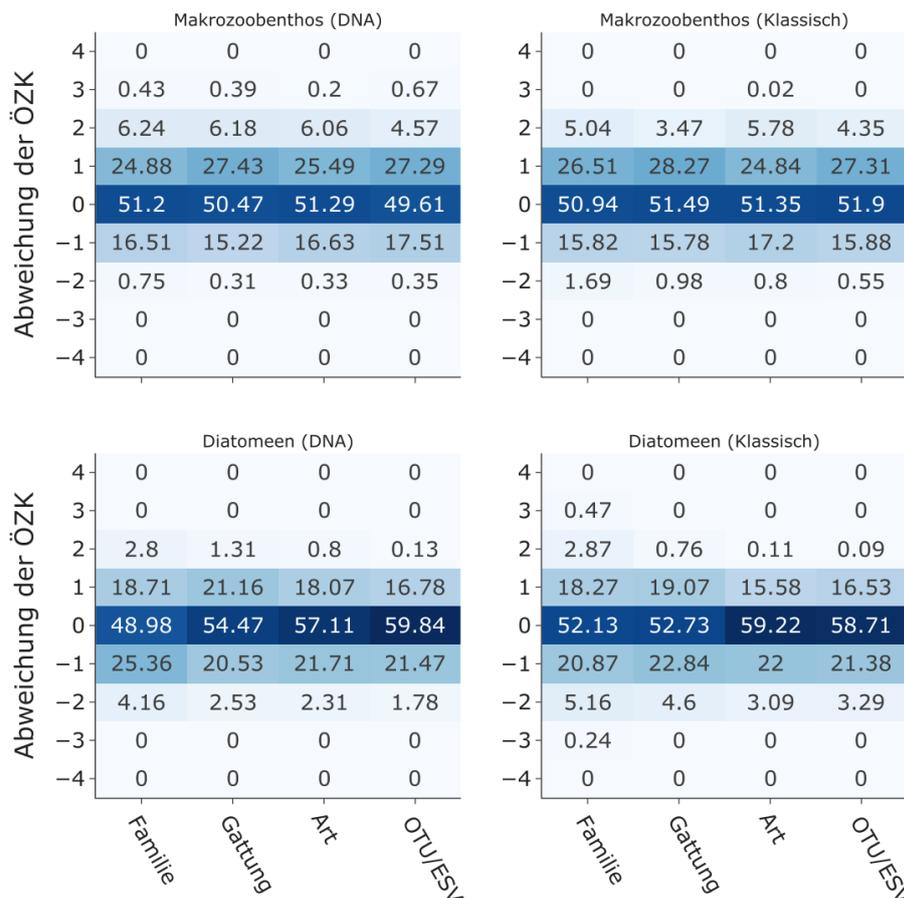
Quelle: Dissertation Till-Hendrik Macher (2023), Universität-Duisburg-Essen

Allerdings wurde dies bislang noch nicht für die Bewertungsdaten für die Wasserrahmenrichtlinie getestet. Die Anwendung von maschinellem Lernen in Verbindung mit Umwelt-DNA-Metabarcoding-Taxonlisten (potenziell für alle biologischen Qualitätskomponenten), den traditionellen ökologischen Statusklassen (basierend auf verfügbaren BQEs), chemischen Parametern (chemische WRRL-Bewertung) und geografischen Informationen (wie GeoBasis-DE / BKG 2022) würde die Berechnung neuer Bewertungsindizes im Rahmen der WRRL ermöglichen. Dies eröffnet die Möglichkeit, auch neue Stressfaktoren gezielt zu erfassen, von Klimawandelfaktoren über Schadstoffzeigern bis hin zu einem Frühwarnsystem für invasive Arten. In diesem Szenario könnten Wasserproben parallel zum Fisch-Monitoring und zu dem chemischen Monitoring entnommen werden. Dieses Probenahmeszenario wäre vergleichsweise kosteneffizient, da die WRRL-Bewertung ohnehin durchgeführt wird. Die Umwelt-DNA-Metabarcoding-Technik könnte somit Taxalisten nicht nur für Fische, sondern für sämtliche relevante Organismengruppen, einschließlich mikrobieller Taxa (Sagova-Mareckova et al. 2021), generieren. Die eDNA-Daten, die chemischen Parameter

und die geografischen Informationen könnten im Anschluss dazu dienen, maschinelles Lernen zur Vorhersage neuer Bewertungsindizes zu trainieren, wie dies bereits in kleinerem Maßstab von Keck et al. (2023) gezeigt wurde. Im Unterschied zur Verwendung von Massenproben bietet die Methode des eDNA-Metabarcoding den Vorteil, Umweltsignale auf einer größeren räumlichen Skala abzubilden.

Die im Rahmen des GeDNA-Projekts erhobenen Daten zu benthischen Invertebraten und Diatomeen können erste Einblicke in die Vorhersagefähigkeit von maschinellen Lernmodellen bieten. In diesem Zusammenhang wurden Modelle mit 170 Massenproben von benthischen Invertebraten und 148 Massenproben von benthischen Diatomeen trainiert, wobei Presence-/Absence-Daten auf der Grundlage der jeweiligen herkömmlichen Datensätze herangezogen wurden. Die Modelle wurden mithilfe eines Random-Forest-Klassifikators (Python-Paket sklearn) erstellt. Die Einstellungen wurden auf die Standardwerte belassen, und die Anzahl der Schätzer wurde auf 1000 festgelegt. Die Modellberechnung wurde 1000-mal auf Familienebene, Gattungsebene, Artebene und OTU/ESV-Ebene (morphologische OTUs wurden als alle vorhandenen Taxa gezählt) wiederholt, und Genauigkeitswerte wurden ermittelt (Abbildung 20). Bei den Vorhersagen der ökologischen Statusklasse wurden die Abweichungen der vorhergesagten Werte von den ursprünglichen Werten bewertet (Abbildung 21).

Abbildung 21: Heatmaps, die die Abweichung von den vorhergesagten Statusklassen von Random-Forest-Modellen zeigen, die die ökologische Statusklasse (ESC) auf der Grundlage von Familie, Gattung, Art und OTUs (Makrozoobenthos) und ESVs (Diatomeen) vorhersagen.



Quelle: Dissertation Till-Hendrik Macher (2023), Universität-Duisburg-Essen

Die niedrigsten Genauigkeitswerte wurden bei den Vorhersagen der ökologischen Statusklasse festgestellt. In diesem Zusammenhang zeigten sowohl die DNA-basierten als auch die traditionellen Invertebratendatensätze stabile Genauigkeitswerte, die unabhängig von der taxonomischen Ebene waren (durchschnittliche Genauigkeitswerte im Bereich von 0,50 bis 0,52). Im Gegensatz dazu wurde bei den Diatomeendatensätzen eine Zunahme der Genauigkeitswerte mit steigender taxonomischer Auflösung beobachtet, mit durchschnittlichen Genauigkeitswerten von 0,49 (Familie, DNA) bis 0,60 (OTUs/ESVs, DNA). Allerdings wichen die meisten Proben nur um eine einzige Statusklasse ab (siehe Abbildung 8). Bei der Vorhersage des Flusstyps wurden im Allgemeinen höhere durchschnittliche Genauigkeitswerte beobachtet. Hier führten die beiden Invertebratendatensätze zu Vorhersagemodellen mit höheren durchschnittlichen Genauigkeitswerten im Bereich von 0,75 bis 0,80, während die auf den Diatomeendatensätzen basierenden Vorhersagemodelle niedrigere durchschnittliche Genauigkeitswerte zeigten, die von 0,53 (Diatomeen auf Familienebene, sowohl für DNA- als auch für traditionelle Datensätze) bis 0,73 (Diatomeen-DNA-Datensatz) reichten. Die insgesamt höchste Genauigkeit wurde bei den Modellen zur Vorhersage der Ökoregion festgestellt. Hier zeigten die Invertebratendatensatzmodelle durchschnittliche Genauigkeitswerte im Bereich von 0,94 bis 0,97, während die Diatomeendatensatzmodelle durchschnittliche Genauigkeitswerte von 0,77 bis 0,93 aufwiesen.

Zusammenfassend verdeutlichen die vorläufigen Ergebnisse das Potenzial des maschinellen Lernens für die Schulung von Modellen zur Vorhersage unterschiedlicher Zustände an Probenahmestellen. Allerdings gab es gewisse Einschränkungen hinsichtlich der Modellgenauigkeit, insbesondere im Hinblick auf die ökologischen Statusklassen. Beide Datensätze enthielten insgesamt nur eine geringe Anzahl von Proben, und die Verteilung der Klassifikationswerte war ungleichmäßig, was sich ebenfalls auf die Genauigkeit auswirkte. So bestand beispielsweise der Invertebratendatensatz nur zu 7 % aus Proben der Statusklassen "1" und "5", während 37 % als "2" klassifiziert wurden. Um die Genauigkeit künftiger Modelle zu steigern, wird eine ausgewogenere Verteilung der Proben über alle Statusklassen hinweg von entscheidender Bedeutung sein. Modelle zeigten eine höhere Genauigkeit für Kategorien mit weniger Klassifikationswerten, wie beispielsweise die Kategorie "ökologische Regionen", die nur die Klassen "Norddeutsches Tiefland" und "Mittelgebirge" enthielt. Hier wurden äußerst genaue Modelle erstellt, mit durchschnittlichen Genauigkeitswerten über 0,9. Angesichts einer ähnlichen Probenanzahl pro Klasse in anderen Kategorien, insbesondere in den ökologischen Statusklassen, sind höhere Genauigkeitswerte zu erwarten. Dennoch zeigten selbst bei einer begrenzten Probenanzahl die meisten Vorhersagen der ökologischen Statusklassen eine hohe Genauigkeit oder wichen nur um eine Statusklasse ab, was auf die Robustheit der Modelle auf verschiedenen taxonomischen Ebenen hinweist. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das maschinelle Lernen vielversprechend ist als wertvolles Werkzeug zur Vorhersage ökologischer Zustände an Probenahmestellen. Durch die Bewältigung von Herausforderungen, insbesondere hinsichtlich der Verteilung der Proben und die Erweiterung des Datensatzes, können Machine-Learning-Modelle verfeinert und effektiver im ökologischen Monitoring und der Zustandsbewertung eingesetzt werden.

5 Abschlusstreffen in Berlin

Am 09. und 10. Oktober 2023 fand das GeDNA-Abschlusstreffen im Botanischen Garten Berlin statt (siehe A.4 für Agenda). Zu Beginn informieren Florian Leese und Jan Koschorreck die Teilnehmenden über die Erfahrungen und Schlussfolgerungen des GeDNA-Projektes. Anschließend präsentiert Till-Hendrik Macher die Hauptergebnisse des GeDNA-Projektes und berichtet insbesondere über die Validierung von DNA-Metabarcoding für die biologischen Qualitätselemente Makrozoobenthos und Diatomeen (siehe Kapitel 3 und 4). Außerdem werden die im GeDNA-Projekt entwickelten Angebote für den Daten-Workflow, die Visualisierung und die Bewertung vorgestellt.

Am Nachmittag finden Diskussionen in Kleingruppen zu DNA-basierten Monitoringansätzen anhand von Leitfragen statt. Die Leitfragen lauten „Wo stehen wir heute?“, „Was sind die Herausforderungen?“ und „Was sind die nächsten Schritte?“. Die Kleingruppen beschäftigen sich mit Fischen, Makrozoobenthos, Diatomeen und Qualitätssicherung, Datenbanken und Standardisierung. Insbesondere die letztere Gruppe ist besonders stark besucht und zeigt erneut den großen Bedarf an Maßnahmen zur Qualitätssicherung und Standardisierung von DNA-Metabarcoding in der behördlichen Praxis auf. Auch wiesen die Teilnehmenden aus der Praxis darauf hin, dass große Unsicherheit bei der Vergabe von Aufträgen gibt. Da es keine klaren Richtlinien gibt werden unterschiedlichste Angebote von Firmen bereitgestellt und es ist oft unklar, wie gut die Qualität für die zu beantwortende Fragestellung ist. Hier erwarten die Teilnehmenden Hilfestellung von den Expert:innen wie dem GeDNA-Team.

Am zweiten Tag werden zunächst die Ergebnisse der Kleingruppen präsentiert und diskutiert. Anschließend werden verschiedene nationale und internationale Projekte und Initiativen von Elvira Mächler (Simplex DNA, Schweiz), Sascha Krenek (BfG), Jan Koschorreck (UBA), Arne Beermann, Lina Frank, Till-Hendrik Macher und Robin Schütz (alle UDE) vorgestellt.

Zum Abschluss des GeDNA-Projekttreffens findet eine Podiumsdiskussion unter der Moderation von Christoph Schulte (UBA) mit Beteiligung von Yvonne Sakka (NLWKN), Elvira Mächler (Simplex DNA, Schweiz), Michael Traugott (Universität Innsbruck, Österreich) und Jan Koschorreck (UBA) statt. Die Leitfrage der Diskussion ist „Was muss passieren, damit nach 2027 genetische Methoden im behördlichen Monitoring genutzt werden können?“. In einer angeregten Diskussion wird dargestellt, dass es nicht um den Ersatz von etablierten Methoden geht, sondern um die Nutzung des Potenzials der molekularen Methoden. Durch die Nutzung von genetischen Methoden kann das „Best of Both Worlds“ hervorgehoben werden. Es sollte nicht gewartet werden, bis genetische Methoden fertig entwickelt sind, sondern bereits jetzt DNA-Metabarcoding von Makrozoobenthos oder eDNA für Fische integriert werden. Hier werden stärkere Synergien und Schnittstellen auf technischer (z.B. Datenbanken und Bundestaxaliste) und organisatorischer bzw. politischer Ebene gefordert (Biodiversitätsstrategien für ein flächendeckendes Monitoring). Dabei werden v.a. die LAWA, das UBA, die BfG und das BfN als wichtige Partner:innen für die Umsetzung genetischer Methoden aus der Forschung in die Praxis herausgestellt. Insbesondere eine Institutionalisierung der Qualitätssicherung wird als wichtig angesehen. Betont wird aber auch der Schulterschluss mit den europäischen und darüber hinaus internationalen Partner:innen. Hier soll im Dialog gearbeitet werden, insbesondere auf europäischer Ebene Abstimmung erfolgen.

6 Nächste Schritte

Weitere Schritte zur Implementierung von DNA-Metabarcoding als komplementäre Methode in der behördlichen Praxis werden auch nach dem Abschluss des GeDNA-Projektes erforderlich sein und sollten in den Jahren 2024-2027 erfolgen:

- ▶ Ausbau von Schulungsangeboten für Praxispartner:innen in Methodenkenntnis, ebenfalls Hilfestellungen für die Ausschreibung von Aufträgen. Dadurch wird die Sachkompetenz bis 2026 in der Fläche verfügbar gemacht. GeDNA-Partner:innen, europäischen Kolleg:innen (DNAqua-Net) und Firmen kommt hier eine zentrale Rolle zu.
- ▶ Erstellen und Verfügbarmachen von verbindlichen nationalen Barcodereferenzen auf Basis der BTL/OTL. Diese Datenbank sollte nach internationalen Kriterien erstellt werden und an internationale Datenbanken, wie z.B. www.freshwaterecology.info (Schmidt-Kloiber and Hering 2015) oder www.boldsystems.org (Ratnasingham and Hebert 2007) angeknüpft werden (2025 verfügbar, über dbDNA-Projekt).
- ▶ Integration einer Bewertungsoption von Presence-/Absence-Daten in der Online-Plattform über gewaesser-bewertung-berechnung.de, um den Behörden die Möglichkeit zu geben die im GeDNA-Projekt demonstrierte Robustheit der Berechnung ohne Abundanzdaten selbst testen können (Prototyp 2025 verfügbar über dbDNA-Projekt).
- ▶ Harmonisierung der Taxonomie und Nomenklatur von Diatomeen und Integration der Nomenklatur in die offiziellen Bewertungsmodule. Zusätzlich sollten weitere Referenzen generiert werden, um Barcodinglücken zu schließen (bis 2027, hier sind Kooperationen mit den Diatomeenexpert:innen und Förderprojekte wichtig).
- ▶ Entwickeln einer Schnittstelle zu einer nationalen Datenbank (UBA) für Sequenzdaten in Kooperation mit der Research Data Commons Datenbank von NFDI4BIODIVERSITY unter Einhaltung der FAIR Prinzipien (bis 2027).
- ▶ Vorantreiben der Standardisierung auf DIN/CEN/ISO Level mit Blick auf Minimalstandards muss in den nächsten Jahren. Hier gibt es auf ISO (TC 147 / SC 5) und CEN (TC 230 / WG 28) Aktivitäten, die vor allem durch die Initiative iESTF (<https://iestf.org>) koordiniert wird. Besonders wichtige Standards sollen bis 2025 in den formalen Abstimmungsprozess eingeführt werden, so dass sie 2027 spätestens verfügbar sind.
- ▶ Erarbeiten von Konzepten im Rahmen der Standardisierung für robuste Referenzmaterialien (Blindproben, „Mock communities“), um zuverlässige DNA-Metabarcoding-Analysen für das biologische Routinemonitoring zu gewährleisten.
- ▶ Ausarbeiten und Etablierung von Eignungsprüfungen (in Abstimmung mit Akkreditierungsstellen). Außerdem sollte die Qualitätssicherung für Metabarcoding/eDNA institutionalisiert werden und im Idealfall von einer Bundesbehörde koordiniert werden.
- ▶ Ein wichtiger Schritt ist die Initiierung des Dialogs auf nationaler (LAWA) und EU-Ebene (CIS) mit Blick auf die Implementierung von DNA-Metabarcoding in die nächste Phase der WRRL nach 2027. Hierzu muss 2024 ein Fahrplan in Abstimmung mit den Behördenvertreter:innen erarbeitet werden.

Das GeDNA-Projekt hat bereits zahlreiche Aspekte bezüglich der Implementierung von DNA-basierten Methoden in das behördliche Monitoring erörtert und konkrete Empfehlungen für die Praxis erarbeitet. Diese Zusammenarbeit zwischen Wissenschaft und Praxis stellt einen

bedeutenden Meilenstein dar und sollte als Grundlage für zukünftige Initiativen und Dialoge dienen, um die Integration von DNA-basierten Verfahren in das Monitoring im Rahmen der WRRL ab 2027 zu ermöglichen. Das GeDNA-Projekt hat verdeutlicht, dass DNA-Metabarcoding eine wegweisende und verlässliche Methode darstellt und erheblichen Nutzen in der Praxis bieten kann. Mit diesen Empfehlungen kann der Übergang von der wissenschaftlichen Forschung zur praktischen Umsetzung und politischen Entscheidungsfindung erfolgreich vollzogen werden.

7 Ausblick

DNA-Metabarcoding zeigt sich als eine leistungsstarke und ergänzende Methode zu morpho-taxonomischen Verfahren. Diese Technologie beinhaltet ein enormes Potenzial und wird maßgeblich dazu beitragen, die Erforschung von Süßwasserökosystemen zu verbessern. Zahlreiche Studien haben die Stärken von DNA-basierten Methoden als effektive Instrumente für das Routine-Monitoring aufgezeigt und bestätigt. Die zehn Studien und vorläufigen Ergebnisse, die innerhalb des GeDNA-Projektes entstanden sind, haben wesentlich dazu beigetragen, unser Verständnis für die Vorteile, aber auch die Herausforderungen des (e)DNA-Metabarcoding zu vertiefen. Mit diesem reichen Wissensschatz in der Hand ist es nun an der Zeit, den nächsten Schritt zu gehen und aktiv die Implementierung des (e)DNA-Metabarcoding in die routinemäßigen Monitoringsbewertungen zu planen. Die Einbindung in die Monitoringsabläufe wird dazu beitragen, Genauigkeit, Effizienz und Umfang unserer ökologischen Bewertungen zu steigern. Dies ist insbesondere relevant im Kontext der EU-Biodiversitätsstrategie für 2030, die darauf abzielt, Ökosysteme an Land und im Meer wiederherzustellen (EC 2020). In diesem Rahmen werden effektive regulatorische Maßnahmen und das Monitoring der Artenvielfalt von zentraler Bedeutung sein, um die Natur in Europa zu schützen und wiederherzustellen. Auch auf nationaler Ebene tragen die Erkenntnisse des GeDNA-Projektes dazu bei, die Ziele der Nationalen Wasserstrategie des Bundes zu erreichen. Trotz erheblicher Anstrengungen in den vergangenen Jahrzehnten ist die Erholung der Süßwasserökosysteme in Europa seit 2010 ins Stocken geraten (Haase et al. 2023). Die Bewältigung dieser Herausforderung erfordert die Identifikation und Eindämmung der Faktoren, die unsere Ökosysteme an der Erholung hindern. Die Einführung des (e)DNA-Metabarcoding verspricht neue und taxonomisch umfassendere Einblicke in die Biodiversität und den Gesundheitszustand unserer Süßwasserökosysteme zu liefern, was einen bedeutsamen Fortschritt in unserer Fähigkeit zur Bewahrung dieser essenziellen Ökosysteme für kommende Generationen darstellt.

8 Quellenverzeichnis

- Allan, J.D., Abell, R., Hogan, Z., Revenga, C., Taylor, B.W., Welcomme, R.L., Winemiller, K. (2005): Overfishing of Inland Waters. *BioScience* 55: S. 1041–1051. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[1041:OOIW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[1041:OOIW]2.0.CO;2)
- Altermatt, F., Little, C.J., Mächler, E., Wang, S., Zhang, X., Blackman, R.C. (2020): Uncovering the complete biodiversity structure in spatial networks: the example of riverine systems. *Oikos* 129: S. 607–618. <https://doi.org/10.1111/oik.06806>
- Amoatey, P., Baawain, M.S. (2019): Effects of pollution on freshwater aquatic organisms. *Water Environment Research* 91: S. 1272–1287. <https://doi.org/10.1002/wer.1221>
- Apothéloz-Perret-Gentil, L., Bouchez, A., Cordier, T., Cordonier, A., Guéguen, J., Rimet, F., Vasselon, V., Pawlowski, J. (2021): Monitoring the ecological status of rivers with diatom eDNA metabarcoding: A comparison of taxonomic markers and analytical approaches for the inference of a molecular diatom index. *Molecular Ecology* 30: S. 2959–2968. <https://doi.org/10.1111/mec.15646>
- Birk, S., Bonne, W., Borja, A., Brucet, S., Courrat, A., Poikane, S., Solimini, A., van de Bund, W., Zampoukas, N., Hering, D. (2012): Three hundred ways to assess Europe’s surface waters: An almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators* 18: S. 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.10.009>
- Boivin-Delisle, D., Laporte, M., Burton, F., Dion, R., Normandeau, E., Bernatchez, L. (2021): Using environmental DNA for biomonitoring of freshwater fish communities: Comparison with established gillnet surveys in a boreal hydroelectric impoundment. *Environmental DNA* 3: S. 105–120. <https://doi.org/10.1002/edn3.135>
- Brantschen, J., Blackman, R.C., Walser, J.-C., Altermatt, F. (2021): Environmental DNA gives comparable results to morphology-based indices of macroinvertebrates in a large-scale ecological assessment. *PLOS ONE* 16: e0257510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257510>
- Brys, R., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Mauvisseau, Q., Auwerx, J., Sweet, M., Mergeay, J. (2021): Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (*Misgurnus fossilis*). *Journal of Fish Biology* 98: S. 399–414. <https://doi.org/10.1111/jfb.14315>
- Buchner, D., Leese, F. (2020): BOLDigger – a Python package to identify and organise sequences with the Barcode of Life Data systems. *Metabarcoding and Metagenomics* 4: e53535. <https://doi.org/10.3897/mbmg.4.53535>
- Buchner, D., Macher, T.-H., Beermann, A.J., Werner, M.-T., Leese, F. (2021): Standardized high-throughput biomonitoring using DNA metabarcoding: Strategies for the adoption of automated liquid handlers. *Environmental Science and Ecotechnology* 8: 100122. <https://doi.org/10.1016/j.es.2021.100122>
- Buchner, D., Beermann, A.J., Laini, A., Rolaufts, P., Vitecek, S., Hering, D., Leese, F. (2019): Analysis of 13,312 benthic invertebrate samples from German streams reveals minor deviations in ecological status class between abundance and presence/absence data. *PLOS ONE* 14: e0226547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226547>
- Buchner, D., Beermann, A.J., Hoerren, T.P.B., Enss, J., Frenzel, M., Li, Y., Mueller, J., Pauls, S.U., Sorg, M., LTER-D Consortium, Haase, P., Leese, F. (2023): German-wide Malaise trap metabarcoding estimates over 33,000 insect species. *BioRxiv preprint*, 2023.05.04.539402. <https://doi.org/10.1101/2023.05.04.539402>
- Buss, D.F., Carlisle, D.M., Chon, T.-S., Culp, J., Harding, J.S., Keizer-Vlek, H.E., Robinson, W.A., Strachan, S., Thirion, C., Hughes, R.M. (2014): Stream biomonitoring using macroinvertebrates

around the globe: a comparison of large-scale programs. *Environmental Monitoring and Assessment* 187: 4132. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4132-8>

Bylemans, J., Gleeson, D.M., Hardy, C.M., Furlan, E. (2018a): Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray–Darling Basin (Australia). *Ecology and Evolution* 8: 8697–8712. <https://doi.org/10.1002/ece3.4387>

Bylemans, J., Gleeson, D.M., Lintermans, M., Hardy, C.M., Beitzel, M., Gilligan, D.M., Furlan, E.M. (2018b): Monitoring riverine fish communities through eDNA metabarcoding: Determining optimal sampling strategies along an altitudinal and biodiversity gradient. *Metabarcoding and Metagenomics* 2: 1–12. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.30457>

Civade, R., Dejean, T., Valentini, A., Roset, N., Raymond, J.-C., Bonin, A., Taberlet, P., Pont, D. (2016): Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. *PLOS ONE* 11: e0157366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157366>

Cordier, T., Lanzén, A., Apothéoz-Perret-Gentil, L., Stoeck, T., Pawlowski, J. (2019): Embracing environmental genomics and Machine Learning for routine biomonitoring. *Trends in Microbiology* 27: S. 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.012>

Cordier, T., Esling, P., Lejzerowicz, F., Visco, J., Ouadahi, A., Martins, C., Cedhagen, T., Pawlowski, J. (2017): Predicting the Ecological Quality Status of marine environments from eDNA metabarcoding data using supervised Machine Learning. *Environmental Science & Technology* 51: S. 9118–9126. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01518>

Coutant, O., Cantera, I., Cilleros, K., Dejean, T., Valentini, A., Murienne, J., Brosse, S. (2021): Detecting fish assemblages with environmental DNA: Does protocol matter? Testing eDNA metabarcoding method robustness. *Environmental DNA* 3: S. 619–630. <https://doi.org/10.1002/edn3.158>

Deiner, K., Bik, H.M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D.M., de Vere, N., Pfrender, M.E., Bernatchez, L. (2017): Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26: S. 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>

Di Muri, C., Handley, L.L., Bean, C.W., Li, J., Peirson, G., Sellers, G.S., Walsh, K., Watson, H.V., Winfield, I.J., Hänfling, B. (2020): Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. *Metabarcoding and Metagenomics* 4: e56959. <https://doi.org/10.3897/mbmg.4.56959>

Dris, R., Imhof, H., Sanchez, W., Gasperi, J., Galgani, F., Tassin, B., Laforsch, C. (2015): Beyond the ocean: contamination of freshwater ecosystems with (micro-)plastic particles. *Environmental Chemistry* 12: S. 539–550. <https://doi.org/10.1071/EN14172>

Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M.L.J., Sullivan, C.A. (2006): Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81: S. 163–182. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>

EEA (2012): European waters—assessment of status and pressures. 2012, EEA Report No 8/2012. Publications Office of the European Union Luxembourg. Permalink EU online: 2c13c637dfe84d37b8a9d39e2b1fb30f

EEA (2018): European waters—assessment of status and pressures. 2018, EEA Report No 7/2018. Publications Office of the European Union Luxembourg. Permalink EU online: 2c13c637dfe84d37b8a9d39e2b1fb30f

- Fahner, N.A., Shokralla, S., Baird, D.J., Hajibabaei, M. (2016): Large-Scale Monitoring of Plants through Environmental DNA Metabarcoding of Soil: Recovery, Resolution, and Annotation of Four DNA Markers. *PLOS ONE* 11: e0157505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157505>
- Francis, R.A. (2012): *A Handbook of Global Freshwater Invasive Species*. Routledge, 454 Seiten. <https://doi.org/10.4324/9780203127230>
- Frühe, L., Cordier, T., Dully, V., Breiner, H.-W., Lentendu, G., Pawlowski, J., Martins, C., Wilding, T.A., Stoeck, T. (2021): Supervised machine learning is superior to indicator value inference in monitoring the environmental impacts of salmon aquaculture using eDNA metabarcodes. *Molecular Ecology* 30: S. 2988–3006. <https://doi.org/10.1111/mec.15434>
- Haase, P., Bowler, D.E., Baker, N.J., Bonada, N., Domisch, S., Garcia Marquez, J.R., Heino, J., Hering, D., Jähnig, S.C., Schmidt-Kloiber, A., Stubbington, R., Altermatt, F., Álvarez-Cabria, M., Amatulli, G., Angeler, D.G., Archambaud-Suard, G., Jorrín, I.A., Aspin, T., Azpiroz, I., Bañares, I., Ortiz, J.B., Bodin, C.L., Bonacina, L., Bottarin, R., Cañedo-Argüelles, M., Csabai, Z., Datry, T., de Eyto, E., Dohet, A., Dörflinger, G., Drohan, E., Eikland, K.A., England, J., Eriksen, T.E., Evtimova, V., Feio, M.J., Ferréol, M., Floury, M., Forcellini, M., Forio, M.A.E., Fornaroli, R., Friberg, N., Fruget, J.-F., Georgieva, G., Goethals, P., Graça, M.A.S., Graf, W., House, A., Huttunen, K.-L., Jensen, T.C., Johnson, R.K., Jones, J.I., Kiesel, J., Kuglerová, L., Larrañaga, A., Leitner, P., L'Hoste, L., Lizée, M.-H., Lorenz, A.W., Maire, A., Arnaiz, J.A.M., McKie, B.G., Millán, A., Monteith, D., Muotka, T., Murphy, J.F., Ozolins, D., Paavola, R., Paril, P., Peñas, F.J., Pilotto, F., Polášek, M., Rasmussen, J.J., Rubio, M., Sánchez-Fernández, D., Sandin, L., Schäfer, R.B., Scotti, A., Shen, L.Q., Skuja, A., Stoll, S., Straka, M., Timm, H., Tyufekchieva, V.G., Tziortzis, I., Uzunov, Y., van der Lee, G.H., Vannevel, R., Varadinova, E., Várбірó, G., Velle, G., Verdonschot, P.F.M., Verdonschot, R.C.M., Vidinova, Y., Wiberg-Larsen, P., Welti, E.A.R. (2023): The recovery of European freshwater biodiversity has come to a halt. *Nature* 620: S 582-588. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06400-1>
- 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. (2019a): Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia* 826: S. 25–41. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3750-5>
- Harper, L.R., Lawson Handley, L., Carpenter, A.I., Ghazali, M., Di Muri, C., Macgregor, C.J., Logan, T.W., Law, A., Breithaupt, T., Read, D.S., McDevitt, A.D., Hänfling, B. (2019b): Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. *Biological Conservation* 238: 108225. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108225>
- Hering, D., Borja, A., Jones, J.I., Pont, D., Boets, P., Bouchez, A., Bruce, K., Drakare, S., Hänfling, B., Kahlert, M., Leese, F., Meissner, K., Mergen, P., Reyjol, Y., Segurado, P., Vogler, A., Kelly, M. (2018): Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research* 138: S. 192–205. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.003>
- Keck, F., Brantschen, J., Altermatt, F. (2023): A combination of machine-learning and eDNA reveals the genetic signature of environmental change at the landscape levels. *Molecular Ecology* 32: S. 4791-4800. <https://doi.org/10.1111/mec.17073>
- Kelly, M., Juggins, S., Guthrie, R., Pritchard, S., Jamieson, J., Rippey, B., Hirst, H., Yallop, M. (2008): Assessment of ecological status in U.K. rivers using diatoms. *Freshwater Biology* 53: S. 403–422. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01903.x>
- Kirtane, A., Kleyer, H., Deiner, K. (2023): Sorting states of environmental DNA: Effects of isolation method and water matrix on the recovery of membrane-bound, dissolved, and adsorbed states of eDNA. *Environmental DNA* 5: S. 582–596. <https://doi.org/10.1002/edn3.417>
- Klymus, K.E., Marshall, N.T., Stepien, C.A. (2017) Environmental DNA (eDNA) metabarcoding assays to detect invasive invertebrate species in the Great Lakes. *PLOS ONE* 12: e0177643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177643>

- Kusanke, L.M., Panteleit, J., Stoll, S., Korte, E., Sünger, E., Schulz, R., Theissing, K. (2020): Detection of the endangered European weather loach (*Misgurnus fossilis*) via water and sediment samples: Testing multiple eDNA workflows. *Ecology and Evolution* 10: S. 8331–8344. <https://doi.org/10.1002/ece3.6540>
- Lecointe, C., Coste, M., Prygiel, J. (1993): “Omnidia”: software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. *Hydrobiologia* 269–270: S. 509–513. <https://doi.org/10.1007/BF00028048>
- Leese, F., Altermatt, F., Bouchez, A., Ekrem, T., Hering, D., Meissner, K., Mergen, P., Pawlowski, J., Piggott, J., Rimet, F. (2016): DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Research Ideas and Outcomes* 2: e11321. <https://doi.org/10.3897/rio.2.e11321>
- Leese, F., Woppowa, L., Bálint, M., Höss, S., Krehenwinkel, H., Lötters, S., Meissner, K., Nowak, C., Rausch, P., Rduch, V., Rulik, B., Weigand, A.M., Zimmermann, J., Koschorreck, J., Züghart, W. (2023): DNA-basierte Biodiversitätsanalysen im Natur- und Umweltschutz: Welche Optionen haben wir für eine Standardisierung? Eine Handlungsempfehlung aus Forschung und Praxis. Bundesamt für Naturschutz. <https://doi.org/10.19217/skr666>
- Leese, F., Bouchez, A., Abarenkov, K., Altermatt, F., Borja, Á., Bruce, K., Ekrem, T., Čiampor, F., Čiamporová-Zaťovičová, Z., Costa, F.O., Duarte, S., Elbrecht, V., Fontaneto, D., Franc, A., Geiger, M.F., Hering, D., Kahlert, M., Kalamujić Stroil, B., Kelly, M., Keskin, E., Liska, I., Mergen, P., Meissner, K., Pawlowski, J., Penev, L., Reyjol, Y., Rotter, A., Steinke, D., van der Wal, B., Vitecek, S., Zimmermann, J., Weigand, A.M. (2018): Chapter Two - Why We Need Sustainable Networks Bridging Countries, Disciplines, Cultures and Generations for Aquatic Biomonitoring 2.0: A Perspective Derived From the DNAqua-Net COST Action. In: Bohan DA, Dumbrell AJ, Woodward G, Jackson M (Eds), *Advances in Ecological Research. Next Generation Biomonitoring: Part 1*. Academic Press, S. 63–99. <https://doi.org/10.1016/bs.aecr.2018.01.001>
- Leray, M., Knowlton, N., Machida, R.J. (2022): MIDORI2: A collection of quality controlled, preformatted, and regularly updated reference databases for taxonomic assignment of eukaryotic mitochondrial sequences. *Environmental DNA* 4: S. 894–907. <https://doi.org/10.1002/edn3.303>
- Loh, J., Wackernagel, M. (ed) (2004): *Living Planet Report 2004*. Gland, Schweiz: WWF. Available from: <https://vtechworks.lib.vt.edu/handle/10919/65909>
- Lynggaard, C., Bertelsen, M.F., Jensen, C.V., Johnson, M.S., Frøslev, T.G., Olsen, M.T., Bohmann, K. (2022): Airborne environmental DNA for terrestrial vertebrate community monitoring. *Current Biology* 32: S. 701-707.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.12.014>
- Macher, T.-H., Beermann, A.J., Leese, F. (2021a): TaxonTableTools: A comprehensive, platform-independent graphical user interface software to explore and visualise DNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources* 21: S. 1705–1714. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13358>
- Macher T-H, Buchner D, Leese F (2022) APSCALE: advanced pipeline for simple yet comprehensive analyses of DNA metabarcoding data. *Bioinformatics* 38: 4817–4819. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac588>
- Macher, T.-H. (2023): DNA metabarcoding for the ecological status assessment in streams - validation, plausibility check and intercalibration of the new assessment method. Dissertation. Universität Duisburg-Essen. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.33087.48805>
- Macher, T.-H., Schütz, R., Yildiz, A., Beermann, A., Leese, F. (2023a): Evaluating five primer pairs for environmental DNA metabarcoding of Central European fish species based on mock communities. *Metabarcoding and Metagenomics* 7: e103856. <https://doi.org/10.3897/mbmg.7.103856>

- Macher, T.-H., Schütz, R., Hörren, T., Beermann, A.J., Leese, F. (2023b): It's raining species: Rainwash eDNA metabarcoding as a minimally invasive method to assess tree canopy invertebrate diversity. *Environmental DNA* 5: S. 3–11. <https://doi.org/10.1002/edn3.372>
- Macher, T.-H., Schütz, R., Arle, J., Beermann, A.J., Koschorreck, J., Leese, F. (2021b): Beyond fish eDNA metabarcoding: Field replicates disproportionately improve the detection of stream associated vertebrate species. *Metabarcoding and Metagenomics* 5: e66557. <https://doi.org/10.3897/mbmg.5.66557>
- Macher, T.-H., Schütz, R., Beermann, A., Leese, F., Wagner, F., Arle, J., Koschorreck, J. (2023c): Umwelt-DNA-basiertes Monitoring an der Fischtreppe Dessau-Roßlau: Ein Vergleich mit fischereilichen Methoden (Environmental DNA-based monitoring of the fish ladder in Dessau-Roßlau: a comparison with fisheries-based methods). *113*: S. 47–55. <https://doi.org/10.1007/s35147-023-1814-6>
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., & Iwasaki, W. (2015): MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2(7), 150088. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>
- Miya, M., Sado, T., Oka, S., Fukuchi, T. (2022): The use of citizen science in fish eDNA metabarcoding for evaluating regional biodiversity in a coastal marine region: A pilot study. *Metabarcoding and Metagenomics* 6: e80444. <https://doi.org/10.3897/mbmg.6.80444>
- Murienne, J., Cantera, I., Cerdan, A., Cilleros, K., Decotte, J.-B., Dejean, T., Vigouroux, R., Brosse, S. (2019): Aquatic eDNA for monitoring French Guiana biodiversity. *Biodiversity Data Journal* 7: e37518. <https://doi.org/10.3897/BDJ.7.e37518>
- Nakagawa, H., Yamamoto, S., Sato, Y., Sado, T., Minamoto, T., Miya, M. (2018): Comparing local- and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods. *Freshwater Biology* 63: S. 569–580. <https://doi.org/10.1111/fwb.13094>
- Nicolosi Gelis, M.M., Sathicq, M.B., Jupke, J., Cochero, J. (2022): DiaThor: R package for computing diatom metrics and biotic indices. *Ecological Modelling* 465: 109859. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2021.109859>
- Nørgaard, L., Olesen, C.R., Trøjelsgaard, K., Pertoldi, C., Nielsen, J.L., Taberlet, P., Ruiz-González, A., De Barba, M., Iacolina, L. (2021): eDNA metabarcoding for biodiversity assessment, generalist predators as sampling assistants. *Scientific Reports* 11: 6820. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85488-9>
- Pawlowski, J., Bruce, K., Panksep, K., Aguirre, F.I., Amalfitano, S., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Baussant, T., Bouchez, A., Carugati, L., Cermakova, K., Cordier, T., Corinaldesi, C., Costa, F.O., Danovaro, R., Dell'Anno, A., Duarte, S., Eisendle, U., Ferrari, B.J.D., Frontalini, F., Frühe, L., Haegerbaeumer, A., Kisand, V., Krolicka, A., Lanzén, A., Leese, F., Lejzerowicz, F., Lyautey, E., Maček, I., Sagova-Marečková, M., Pearman, J.K., Pochon, X., Stoeck, T., Vivien, R., Weigand, A., Fazi, S. (2022): Environmental DNA metabarcoding for benthic monitoring: A review of sediment sampling and DNA extraction methods. *Science of The Total Environment* 818: 151783. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151783>
- Poikane, S., Zampoukas, N., Borja, A., Davies, S.P., van de Bund, W., Birk, S. (2014): Intercalibration of aquatic ecological assessment methods in the European Union: Lessons learned and way forward. *Environmental Science & Policy* 44: S. 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2014.08.006>
- Pont, D., Valentini, A., Rocle, M., Maire, A., Delaigue, O., Jean, P., Dejean, T. (2021): The future of fish-based ecological assessment of European rivers: from traditional EU Water Framework Directive compliant methods to eDNA metabarcoding-based approaches. *Journal of Fish Biology* 98: S. 354–366. <https://doi.org/10.1111/jfb.14176>

- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N. (2007): bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* 7: S. 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Rimet, F., Gusev, E., Kahlert, M., Kelly, M.G., Kulikovskiy, M., Maltsev, Y., Mann, D.G., Pfannkuchen, M., Trobajo, R., Vasselon, V., Zimmermann, J., Bouchez, A. (2019): Diat.barcode, an open-access curated barcode library for diatoms. *Scientific Reports* 9: 15116. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51500-6>
- Rivera SF, Rimet F, Vasselon V, Vautier M, Domaizon I, Bouchez A (2022): Fish eDNA metabarcoding from aquatic biofilm samples: Methodological aspects. *Molecular Ecology Resources* 22: S. 1440–1453. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13568>
- Roger, F., Ghanavi, H.R., Danielsson, N., Wahlberg, N., Löndahl, J., Pettersson, L.B., Andersson, G.K.S., Boke Olén, N., Clough, Y. (2022): Airborne environmental DNA metabarcoding for the monitoring of terrestrial insects—A proof of concept from the field. *Environmental DNA* 4: S. 790–807. <https://doi.org/10.1002/edn3.290>
- Sagova-Mareckova, M., Boenigk, J., Bouchez, A., Cermakova, K., Chonova, T., Cordier, T., Eisendle, U., Elersek, T., Fazi, S., Fleituch, T., Frühe, L., Gajdosova, M., Graupner, N., Haegerbaeumer, A., Kelly, A.-M., Kopecky, J., Leese, F., Nöges, P., Orlic, S., Panksep, K., Pawlowski, J., Petrussek, A., Piggott, J.J., Rusch, J.C., Salis, R., Schenk, J., Simek, K., Stovicek, A., Strand, D.A., Vasquez, M.I., Vrålstad, T., Zlatkovic, S., Zupancic, M., Stoeck, T. (2021): Expanding ecological assessment by integrating microorganisms into routine freshwater biomonitoring. *Water Research* 191: 116767. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116767>
- Sales, N.G., McKenzie, M.B., Drake, J., Harper LR, Browett SS, Coscia I, Wangenstein OS, Baillie C, Bryce E, Dawson DA, Ochu E, Hänfling B, Handley LL, Mariani S, Lambin X, Sutherland C, McDevitt AD (2020) Fishing for mammals: Landscape-level monitoring of terrestrial and semi-aquatic communities using eDNA from riverine systems. *Journal of Applied Ecology* 57: 707–716. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13592>
- Schmidt-Kloiber, A., Hering, D. (2015): www.freshwaterecology.info – An online tool that unifies, standardises and codifies more than 20,000 European freshwater organisms and their ecological preferences. *Ecological Indicators* 53: S. 271–282. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.02.007>
- Schneider, S. H., Root, T. L., & Mastrandrea, M. D. (2011): *Encyclopedia of climate and weather*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press Schneider, USA, 1478 S. DOI: 10.1093/acref/9780199765324.001.0001
- Stat, M., Huggett, M.J., Bernasconi, R., DiBattista, J.D., Berry, T.E., Newman, S.J., Harvey, E.S., Bunce, M. (2017): Ecosystem biomonitoring with eDNA: metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Scientific Reports* 7: 12240. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12501-5>
- Thomas, A.C., Howard, J., Nguyen, P.L., Seimon, T.A., Goldberg, C.S. (2018): eDNA Sampler: A fully integrated environmental DNA sampling system. *Methods in Ecology and Evolution* 9: S. 1379–1385. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12994>
- Thomas, A.C., Tank, S., Nguyen, P.L., Ponce, J., Sinnesael, M., Goldberg, C.S. (2020): A system for rapid eDNA detection of aquatic invasive species. *Environmental DNA* 2: S. 261–270. <https://doi.org/10.1002/edn3.25>
- Ushio M, Murata K, Sado T, Nishiumi I, Takeshita M, Iwasaki W, Miya M (2018) Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific Reports* 8: 4493. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22817-5>

Vamos E, Elbrecht V, Leese F (2017) Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics* 1: e14625. <https://doi.org/10.3897/mbmg.1.14625>

Vasselon V, Rimet F, Tapolczai K, Bouchez A (2017a) Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: Scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte island, France). *Ecological Indicators* 82: 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.06.024>

Vasselon V, Domaizon I, Rimet F, Kahlert M, Bouchez A (2017b) Application of high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding to diatom biomonitoring: Do DNA extraction methods matter? *Freshwater Science* 36: S. 162–177. <https://doi.org/10.1086/690649>

Zhao, B., van Bodegom, P.M., Trimbos, K.B. (2023): Environmental DNA methylation of *Lymnaea stagnalis* varies with age and is hypermethylated compared to tissue DNA. *Molecular Ecology Resources* 23, 81-91. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13691>

Zinger, L., Bonin, A., Alsos, I.G., Bálint, M., Bik, H., Boyer, F., Chariton, A.A., Creer, S., Coissac, E., Deagle, B.E., Barba, M.D., Dickie, I.A., Dumbrell, A.J., Ficetola, G.F., Fierer, N., Fumagalli, L., Gilbert, M.T.P., Jarman, S., Jumpponen, A., Kauserud, H., Orlando, L., Pansu, J., Pawlowski, J., Tedersoo, L., Thomsen, P.F., Willerslev, E., Taberlet, P. (2019): DNA metabarcoding—Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular Ecology* 28: 1857–1862. <https://doi.org/10.1111/mec.15060>

A Probenahme-Leitfäden

A.1 Makrozoobenthos

Leitfaden: Makrozoobenthos Probenahme für DNA-Metabarcoding



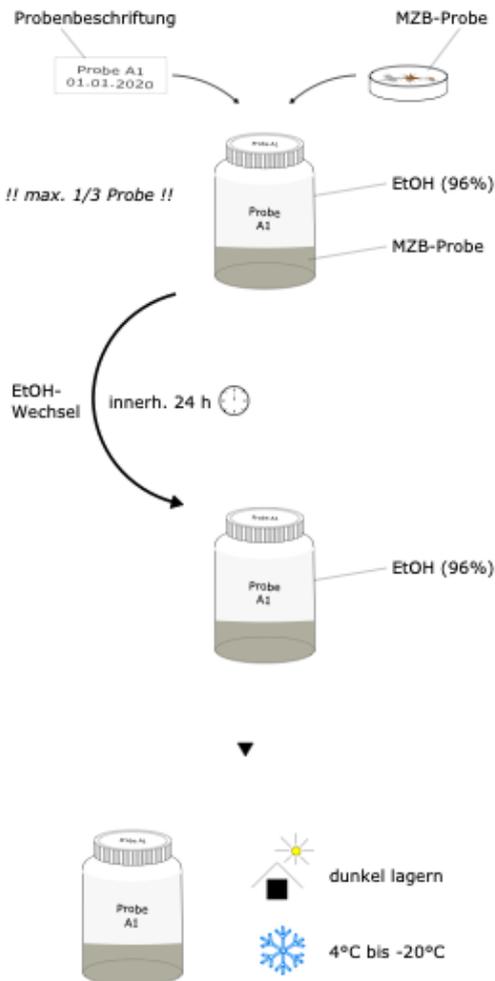
1) Probenahme

- a) Anwendung Ihres typischen Multihabitat-Protokolls (20 Teilproben etc.).
- b) Die Sortiermethode sollte dokumentiert werden.
- c) Nach jeder Probestelle muss das Netz gründlich mit Wasser gereinigt und kontrolliert werden, damit keine Tiere im Netz zurückbleiben.



2) Probenkonservierung

- a) Je nach Protokoll:
 - i) Lebensortsortierung im Feld auf mind. 350 Individuen.
 - ii) Konservierung der Probe bzw. Unterprobe in 96%-igem Ethanol
Verhältnis Probe: EtOH = 1:3 (nicht mehr Probel!).
Mit MEK, PET oder IPA vergällter Alkohol ist zulässig.
- b) Wichtig: Innerhalb von 24h EtOH-Wechsel im Labor. Ethanol vorsichtig abgießen (zur Sicherheit 500 µm Sieb unterhalten). Abgossenen Ethanol in geeignetem EtOH-Abfall entsorgen.
- c) Anschließend mögliche Tiere vom Sieb zurück ins Gefäß überführen. Sieb nach jedem Wechsel mit Wasser spülen, so dass keine Tiere/Gewebereste darauf zurückbleiben. Das Gefäß mit Ethanol auffüllen bis ein Verhältnis von Probe zu Ethanol von 1:3 erreicht ist.
- d) Die Proben müssen getrennt voneinander morphologisch bestimmt werden. Zwischen den Proben müssen die genutzten Pinzetten gesäubert werden, um Kontamination durch Gewebereste zu vermeiden (aber keine Bleiche notwendig).
- e) Für eine bessere Handhabung bei der morphologischen Bestimmung können Individuen für 1-2 h in Wasser oder 70 %-igen Ethanol transferiert werden.
- f) Falls Einzeltiere als Voucher aufbewahrt werden müssen, kann diesen Gewebe entnommen werden (z.B. 1 Bein). Das Gewebe ist getrennt in 96% EtOH zu lagern (z.B. in Schnappdeckelglas). Die Gefäße der Einzeltiere müssen eindeutig beschriftet werden (Name der Probe auf Zettel im Gefäß, s.u.).
- g) Lagern Sie die Proben dunkel und idealerweise kalt (4°C, -20°C). Überprüfen Sie die Kennzeichnung der Probe. Ein mit Laserdrucker, Tusche oder Bleistift beschriftetes Blatt muss in das Ethanol gegeben werden. Das Gefäß muss von außen mit einem ethanolfesten Stift beschriftet sein.



Leitfaden: Makrozoobenthos Probenahme für DNA-Metabarcoding



4) Versand

Senden Sie die Proben nach der Bestimmung an den Projektpartner an der Universität Duisburg-Essen (FedEx oder Kurier)

Materialien

- Ausrüstung für klassische Multihabitat-Beprobung:
- Kescher, Weisschalen, Pinzetten
- 96% Ethanol (techn. ausreichend)
- Methylethylketon (MEK) oder Isopropylalkohol (IPA) sind als Vergällungsmittel zur Konservierung geeignet
- Dichte und sterile Probengefäße (z.B. Kautex 250-mL)
- Sieb 500 µm
- Ethanolbeständige Stifte, Bleistift
- Ethanolbeständige Labels

Versand an:

Till-Hendrik Macher (AG Leese)
Universität Duisburg-Essen, Fakultät für Biologie
Universitätsstr. 5, 45141 Essen

Trackingnummer mitteilen
Email: till-hendrik.macher@uni-due.de

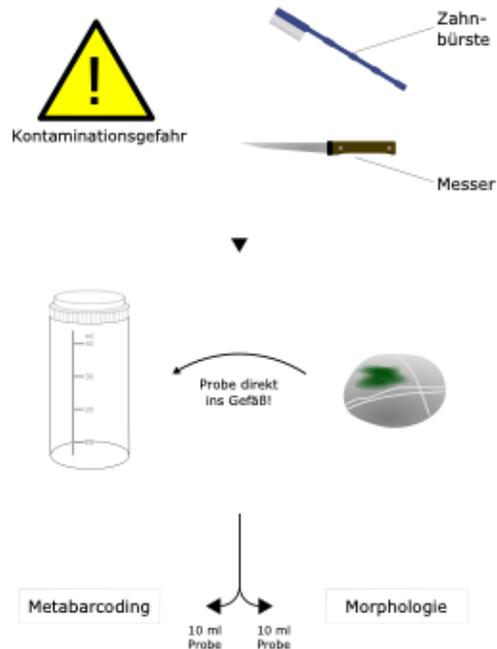
A.2 Diatomeen

Leitfaden: Diatomeen Probenahme für DNA-Metabarcoding



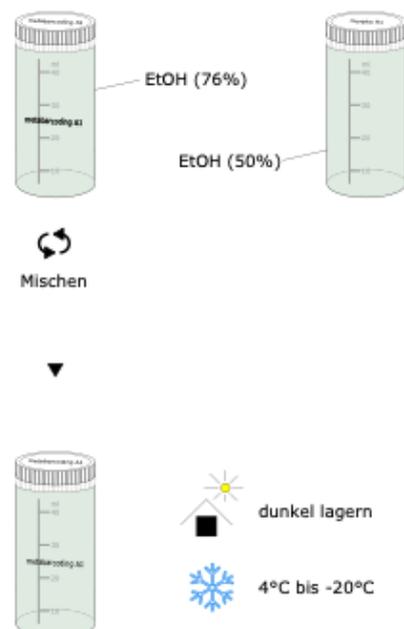
1) Probenahme

- a) Anwendung Ihres typischen Multihabitat-Protokolls (10 Teilproben etc.).
- b) Die zu beprobende Stelle von unterhalb der Probenahme-Stelle anzugehen, um Aufwirbelungen von Sediment zu verhindern.
- b) Die Probenahme erfolgt mit einer Einwegzahnbürste, die für jeden Probenahme gewechselt werden muss, um Kontaminationen zu verhindern. Eine Reinigung der Zahnbürsten (mit Bleiche o.ä.) ist nicht praktikabel. Ggfs. kann auch ein Taschenmesser genutzt werden, welches zwischen den Probenahmen gründlich gesäubert wird (Chlorbleiche).
- c) Der Aufwuchs ist vom Substrat direkt in das Gefäß zu füllen, um mögliche Kontaminationen durch eine Zwischenlagerung in z.B. Weißschalen zu vermeiden (sonst mit Chlorbleiche reinigen).
- d) Hartsubstrate sind zu präferieren. Alternativ können auch Totholz oder Sedimente beprobt werden. Makrophyten sind auch möglich.



2) Probenkonservierung

- a) Die Probe wird auf zwei Gefäße aufgeteilt:
 - Für die morphologische Bestimmung werden 10 ml Probe mit 10 ml 96%igem, unvergälltem Ethanol fixiert, so dass die Endkonzentration bei ca. 50% Ethanol liegt. Alternativ auch nach klassischem Protokoll.
 - Für die DNA-Metabarcoding-Analyse werden 10 ml Probe mit 40 ml 96%igem, unvergälltem Ethanol fixiert, so dass die Endkonzentration bei ca. 75% Ethanol liegt. Ethanol und Probe durch Invertieren mischen.
- b) Sedimentproben (Sonderfall s.o.), die mit einer Spritze gesammelt wurden, sind im Gefäß ins Labor zu bringen und sollen für einen Tag sedimentiert werden lassen. Am nächsten Tag kann das obere Wasser verworfen werden und die Proben gesammelt werden: 10 ml Probe für Metabarcoding und 10 ml für Morphologie (danach verfahren wie in 2a beschrieben).
- c) Lagern Sie die Proben dunkel und idealerweise kalt (4°C, -20°C). Überprüfen Sie die Kennzeichnung der Probe. Das Gefäß muss von außen (Deckel und Seitenwand) mit einem wasserfesten Stift beschriftet sein.



Leitfaden: Diatomeen Probenahme für DNA-Metabarcoding



3) Versand

Senden Sie die DNA-Metabarcoding Proben an den Projektpartner an der Universität Duisburg-Essen (FedEx oder Kurier)

Materialien

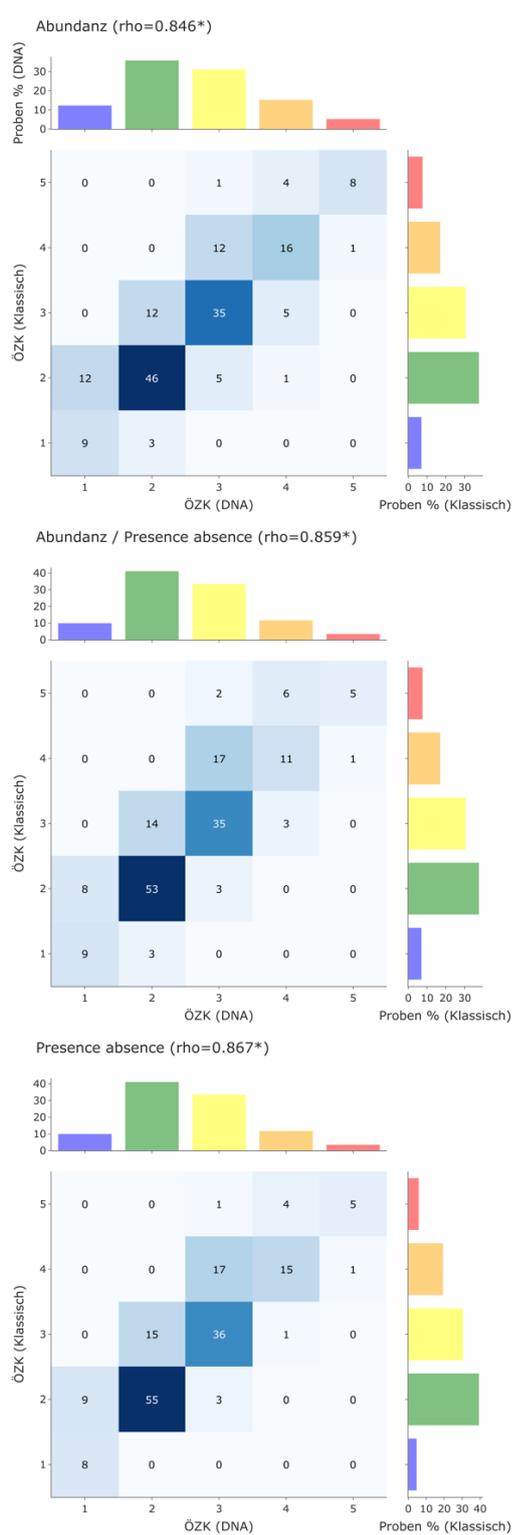
- Ausrüstung für klassische Diatomeen-Beprobung:
- Messer, sterile Einwegzahnbürsten
- Weißschalen sind nur nach gründlicher Säuberung mit Chlorbleiche nutzbar, sonst besteht Kontaminationsgefahr!
- 96% Ethanol, unvergällt
- Dichte und sterile 50 ml Probengefäße
- Wasserfeste Stifte

Versand an:

Till-Hendrik Macher (AG Leese)
Universität Duisburg-Essen, Fakultät für Biologie
Universitätsstr. 5, 45141 Essen

Trackingnummer mitteilen
Email: till-hendrik.macher@uni-due.de

A.3 Vergleich von Abundanz und Presence- / Absence-Daten



Anhang 3: Paarweiser Vergleich der ökologischen Zustandsklassen zwischen den beiden Methoden, die mittels Abundanz, Abundanz (traditionelle Methode) und Presence- / Absence-Daten (DNA-Metabarcoding) und Presence- / Absence-Daten für beide ermittelt wurden. Übereinstimmende Zustandsklassen liegen auf der Diagonalen.

A.4 Agenda des Abschlusstreffens



UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN
Offen im Denken

Bo
Botanischer Garten
Berlin

GeDNA
Abschlussveranstaltung

Für Mensch & Umwelt

**Umwelt
Bundesamt**

Programm

Tag 1, 09.10.2023		Tag 2, 10.10.2023	
12.00 Uhr	Registrierung, Kaffee	09.00	Zusammenfassung Tag 1
13.00 Uhr	Begrüßung	09.15	Diskussion
13.10 Uhr	Ergebnisse des GeDNA-Projektes <i>Florian Leese (UDE)</i>	09.45	Erfahrungen aus der Schweiz <i>Elvira Mächler (SimplexDNA)</i>
13.30	Erfahrungen mit DNA-Metabarcoding für die biologischen Qualitätsselemente Makrozoobenthos und Diatomeen <i>Till-Hendrik Macher (UDE)</i>		Saisonales Monitoring der Lippe <i>Robin Schätz (UDE)</i>
14.15	Angebote für den Daten-Workflow, Visualisierung und Bewertung <i>Till-Hendrik Macher (UDE)</i>		eRNA-Metabarcoding: Was ist der Mehrwert? <i>Till-Hendrik Macher (UDE)</i>
14.30	Diskussion		Ist eDNA immer und überall vorhanden? <i>Lina Frank (UDE)</i>
15:00	Pause	10:45	Diskussion
15.30 bis 17.00	Diskussion in Kleingruppen	11:00	Pause
	Leitfragen für die Diskussion zu DNA-basierten Monitoringansätzen	11:30	Weitere Initiativen
	– Wo stehen wir heute?		Bundeswasserstraßen <i>Sascha Krenek (BfG)</i>
	– Was sind die Herausforderungen?		4. Donauforschungsprogramm <i>Arne Beermann (UDE)</i>
	– Was sind die nächsten Schritte?	12.00	Harmonisierung und Standardisierung für DNA-Metabarcoding <i>Jan Koschorreck (UBA)</i>
	Gruppe 1: Fische	12.15 bis 13.00	Schlussdiskussion - Von der Forschung zum Monitoring <i>Moderation: Christoph Schulte (UBA)</i>
	Gruppe 2: Makrozoobenthos		
	Gruppe 3: Diatomeen		
	Gruppe 4: Qualitätssicherung, Datenbanken und Standardisierung		

Anhang 4: Agenda des GeDNA-Abschlusstreffens im Botanischen Garten Berlin.

Quelle: eigene Darstellung