

Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen

Richtlinien



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Bundesamt für Umwelt BAFU

Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen

Richtlinien

Impressum

Herausgeber

Bundesamt für Umwelt (BAFU)

Das BAFU ist ein Bundesamt des Eidgenössischen Departements für Umwelt, Verkehr, Energie und Kommunikation (UVEK).

Autoren

Jan Pawlowski^{1,2}, Laure Apothéloz-Perret-Gentil^{1,2},
Elvira Mächler^{3,4}, Florian Altermatt^{3,4}

¹ Universität Genf, Departement für Genetik und Evolution,
1211 Genf

² ID-Gene Ecodiagnostics, 1202 Genf

³ Eawag: Das Wasserforschungsinstitut des ETH-Bereichs,
Abteilung Aquatische Ökologie, 8600 Dübendorf

⁴ Universität Zürich, Institut für Evolutionsbiologie und Umwelt-
wissenschaften, 8057 Zürich

Kontakt

Jan.Pawlowski@unige.ch und Florian.Altermatt@eawag.ch

Begleitgruppe

Marie-Sophie Renevier, Yael Schindler Wildhaber, Arielle
Cordonier, Lukas De Ventura, Daniel Hefti, Christiane Illg,
Glenn Litsios, Philip Stauer, Patrick Steinmann

Externe Begutachter

Rosetta C. Blackman, Kristy L. Deiner, Florian Leese,
Kristian Meissner

Vorgeschlagene Zitierweise

Pawlowski J., Apothéloz-Perret-Gentil L., Mächler E. & Altermatt F.

2020: Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen
Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von
aquatischen Ökosystemen. Richtlinien. Bundesamt für
Umwelt, Bern. Umwelt-Wissen Nr. 2010: 77 S.

Übersetzung

Sprachdienst, BAFU

Gestaltung

Abbildungen: Apothéloz-Perret-Gentil L

Cavelti AG, Marken. Digital und gedruckt, Gossau

Umschlagfoto

Probenahme von Wasser für eine eDNA-Analyse

Foto: Eawag, Elvira Mächler

DOI

<https://doi.org/10.5167/uzh-187800>

Link zur PDF-Datei

www.bafu.admin.ch/uw-2010-d

Eine gedruckte Fassung liegt nicht vor.

Diese Publikation ist auch in französischer und englischer
Sprache verfügbar. Die Originalsprache ist Englisch.

© BAFU 2020

Inhaltsverzeichnis

Abstracts	5	5	Molekularlabor	33
Vorwort	6	5.1	Allgemeiner Ablauf	34
1 Einleitung	7	5.2	DNA-Extraktion	35
2 eDNA: Definitionen, Anwendungen und Perspektiven	10	5.3	PCR-Amplifikation	35
2.1 Definitionen	10	5.4	Einzelartnachweis	37
2.2 Mögliche Anwendungen	11	5.4.1	Standard-PCR	38
2.3 Vor- und Nachteile	13	5.4.2	Quantitative PCR (qPCR)	38
3 eDNA in Süßwasserökosystemen	15	5.4.3	Digitale PCR (dPCR)	39
3.1 eDNA-Untersuchung verschiedener Gewässer	16	5.5	Metabarcoding	39
3.1.1 Stehende Gewässer (lenitische Ökosysteme)	16	5.5.1	PCR für Metabarcoding	39
3.1.2 Fließgewässer (lotische Ökosysteme)	17	5.5.2	Hochdurchsatz-Sequenzierung	40
3.1.3 Grundwasser und Quellen	18	5.5.3	Datenanalyse	40
3.2 Taxonspezifische Merkmale im Zusammenhang mit der eDNA-Untersuchung	19	6 Referenzdatenbank für die taxonomische Zuordnung	42	
3.2.1 Amphibien	19	7 Datenmanagement	44	
3.2.2 Fische	20	8 Anwendungsbeispiele (Fallstudien)	45	
3.2.3 Säugetiere	20	8.1 Einzelartnachweis	45	
3.2.4 Insekten	21	8.1.1 Quaggamuschel	45	
3.2.5 Krebstiere	22	8.1.2 Schwarzmundgrundel	45	
3.2.6 Weichtiere	22	8.2 Vielfalt der Wirbeltiere (Beispiel Molche)	46	
3.2.7 Wenigborster	22	8.3 Makroinvertebraten	46	
3.2.8 Kieselalgen	23	8.3.1 eDNA im Wasser (umfassender Ansatz)	46	
3.2.9 Pathogene und Parasiten	23	8.3.2 Bulk-DNA (Mischprobe)	47	
3.2.10 Wasserpflanzen (Makrophyten und Phytoplankton)	23	8.4 Biotische Indizes	47	
4 Probenahme für eDNA-Analyse	26	8.4.1 Molekularer Diatomeen-Index Schweiz (MDI-CH)	47	
4.1 Arten von eDNA-Ausgangsmaterial	26	8.4.2 Genetic Oligochaete Index of Sediment Bioindication	48	
4.1.1 eDNA im Wasser	26	9 Schlussfolgerungen und Ausblick	50	
4.1.2 eDNA im Sediment	28	10 Probenahmeprotokolle	52	
4.1.3 eDNA im Biofilm	29	10.1 eDNA im Wasser	52	
4.1.4 Bulk-DNA (Mischprobe) von Makroinvertebraten	29	10.2 Sediment	57	
4.2 Vorsichtsmassnahmen für den Umgang mit eDNA-Proben	30	10.3 Biofilm	59	
4.3 Weitere technische Fragen im Zusammenhang mit eDNA-Probenahmen	32	11 Bewährte Praktiken und Dokumentation von Verfahren für eDNA-Ansätze	60	
		Glossar	62	
		Literaturhinweise	65	

Abstracts

Aquatic biomonitoring is currently transformed by environmental DNA (eDNA) based approaches. These new tools overcome some limitations of traditional biomonitoring and allow non-invasive sampling, broad taxonomic coverage, high sensitivity, and the possibility to automation. However, the disruptive character and rapid developments of the new technology challenge its implementation. This publication explains the principles of the eDNA technology and presents its advantages and limitations. It shows possible applications of eDNA tools in monitoring and assessment of aquatic ecosystems, and provides detailed protocols and best practices for processing eDNA samples.

Das Biomonitoring aquatischer Lebensräume wird derzeit durch Verfahren, die auf Umwelt-DNA (eDNA) basieren, verändert. Diese neuen Instrumente überwinden gewisse Beschränkungen herkömmlicher Biomonitoringmethoden und erlauben eine nichtinvasive Probenahme, eine breite taxonomische Auflösung, eine hohe Sensitivität und die Möglichkeit, Prozesse zu automatisieren. Allerdings stellen die komplett neue Herangehensweise und die rasche Entwicklung der neuen Technologie Herausforderungen für ihre Einführung in die Praxis dar. In dieser Publikation werden die Grundsätze der eDNA-Technologie erläutert und die Vorteile und Beschränkungen vorgestellt. Es werden mögliche Anwendungen von eDNA-Tools für das Monitoring und die Bewertung aquatischer Ökosysteme aufgezeigt und detaillierte Protokolle und bewährte Praktiken für die Verarbeitung von eDNA-Proben vorgestellt.

Les approches fondées sur l'ADN environnemental (ADNe) sont en passe de transformer la biosurveillance aquatique. Ces nouveaux outils permettent d'outrepasser les limites de la surveillance biologique traditionnelle : ils permettent d'effectuer un échantillonnage non invasif, de couvrir un large éventail taxonomique et offrent une sensibilité élevée ainsi que des possibilités d'automatisation. Cependant, le caractère révolutionnaire et les développements rapides de cette nouvelle technologie entravent sa mise en œuvre. La présente publication explique les principes des méthodes ADNe, en présente les avantages et les limites et formule des suggestions concernant les standards et les pratiques de routine. En outre, elle montre les utilisations possibles des outils fondés sur l'ADNe dans la surveillance et l'évaluation des écosystèmes aquatiques, expose des études de cas spécifiques et propose des protocoles détaillés ainsi que des exemples de bonnes pratiques pour le traitement des échantillons d'ADNe.

Il biomonitoraggio acquatico sta passando ad approcci basati sul DNA ambientale (eDNA). Questi nuovi strumenti superano determinati limiti del biomonitoraggio tradizionale e consentono un campionamento non invasivo, un'ampia copertura tassonomica, sensibilità elevate e la possibilità di automazione. Tuttavia, il carattere dirompente e il rapido sviluppo delle nuove tecnologie mette a dura prova la sua attuazione. La presente pubblicazione spiega i principi della tecnica eDNA e ne presenta vantaggi e limiti. Inoltre, illustra possibili applicazioni degli strumenti eDNA nel monitoraggio e nella valutazione di ecosistemi acquatici, fornisce protocolli dettagliati e buone pratiche per il trattamento di campioni di eDNA.

Keywords:

Biodiversity, environmental indicators, monitoring, method guidelines, eDNA, method standardization.

Stichwörter:

Biodiversität, Umweltindikatoren, Monitoring, Methodenrichtlinien, eDNA, Methodenstandardisierung

Mots-clés :

biodiversité, indicateurs environnementaux, surveillance, directives méthodologiques, ADNe, standardisation des méthodes

Parole chiave:

Parole chiave: biodiversità, indicatori ambientali, monitoraggio, linee guida metodologiche, eDNA, standardizzazione dei metodi.

Vorwort

In der Schweiz sind die aquatische Umwelt und die darin lebenden Arten derzeit einem grossen anthropogenen Druck ausgesetzt. So sind die Anteile ausgestorbener oder gefährdeter Arten bei den Wasserlebewesen am höchsten. Ziel des Gewässerschutzgesetzes vom 24. Januar 1991 (GSchG, SR 814.20) und der revidierten Gewässerschutzverordnung vom 28. Oktober 1998 (GSchV, SR 814.201) ist der umfassende Schutz seiner vielfältigen Funktionen sowie die nachhaltige Nutzung der Gewässer. Um die ökologischen Ziele zu erfüllen, ist die Beurteilung der biologischen Qualität der Fließgewässer von grösster Bedeutung.

Die Analyse und Bewertung der aquatischen Biozönose erfordert die Erfassung eines Datensatzes in ausreichender Quantität und Qualität, was mit den derzeit verfügbaren Methoden nicht immer möglich ist. Techniken der eDNA (Umwelt-DNA) können einen Beitrag leisten, dieses Problem zu lösen. Aus einfachen Wasser- oder Sedimentproben lassen sich viele wichtige Informationen über den biologischen Zustand von aquatischen Ökosystemen gewinnen. eDNA-Techniken haben viele Vorteile, es besteht ein wachsendes Interesse und viele Methoden werden weltweit entwickelt. Aufgrund dieser raschen Entwicklung ist es für Fachpersonen und Entscheidungsträger derzeit jedoch schwierig zu wissen, welche Methoden zur Verfügung stehen, welche Methoden bei biologischen Gewässeruntersuchungen anwendbar sind und wo Informationen über systematische Vorgehensweisen zu finden sind.

Die vorliegenden «Richtlinien für die Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen» sollen die Standardisierung und Umsetzung von eDNA-Methoden in Gewässeruntersuchungen und bei der Bewertung des Zustands von aquatischen Ökosystemen fördern und unterstützen. Die Richtlinien richten sich an Fachpersonen und Entscheidungsträger (Regierung, Kantone, Ingenieurbüros). Zu diesem Zweck gibt dieses Dokument einen Überblick über die verschiedenen verfügbaren Methoden, diskutiert die Vor- und Nachteile der eDNA-Methoden und gibt Anregungen zu empfohlenen Best Practices und Routinestandards.

Das BAFU dankt allen, die an der Veröffentlichung dieses Leitfadens mitgewirkt haben, insbesondere den Autoren, der Expertengruppe und den Vertretern der Kantone, die alle einen unschätzbaren Beitrag geleistet haben.

Stephan Müller
Abteilungsleiter Wasser
Bundesamt für Umwelt (BAFU)

1 Einleitung

Gut funktionierende und intakte aquatische Ökosysteme sind für das menschliche Wohlergehen von grundlegender Bedeutung. Sie erbringen eine Reihe von Ökosystemleistungen und beinhalten eine aussergewöhnliche Vielfalt an organismischem Leben. Doch der Einfluss des Menschen – Verschmutzung, Intensivierung der Landnutzung, invasive Arten oder die Wassernutzung zur Energiegewinnung – bedroht den Zustand und die Funktionsfähigkeit von Süswasserökosystemen lokal wie global (BenetEAU et al., 2019; Reid et al., 2019). Es ist daher äusserst wichtig, aquatische Ökosysteme zu verstehen, zu überwachen und zu schützen. In der Schweiz definiert das Bundesgesetz über den Schutz der Gewässer vom 24. Januar 1991 (Gewässerschutzgesetz, GSchG, SR 814.20) in den Artikeln 57 und 58 die Erhebung des Zustands von Gewässern als Aufgabe des Bundes bzw. der Kantone. Diese Erhebung umfasst spezifische Beurteilungen, ob der ökologische Zustand und die ökologischen Ziele für Gewässer gemäss der Gewässerschutzverordnung (GSchV, SR 814.201) erreicht werden. Laut Anhang 1 Ziffer 1 Absatz 1 GSchV sollen Lebensgemeinschaften von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen oberirdischer Gewässer naturnah sein sowie sich selbst regulieren und eine Vielfalt und eine Häufigkeit der Arten aufweisen, die typisch sind für nicht oder nur schwach belastete Gewässer des jeweiligen Gewässertyps. Dies erlaubt den Schutz von Gewässern vor negativen Einwirkungen, sodass eine nachhaltige Nutzung und ein guter ökologischer Zustand beibehalten werden können. Der Bund und die Kantone führen ein Monitoring durch, um sicherzustellen, dass die Anforderungen an die Wasserqualität oberirdischer Gewässer nach Anhang 2 Ziffer 1 GSchV eingehalten werden. Dazu braucht es in erster Linie verlässliche Daten zum Zustand, aber auch zu Veränderungen aquatischer Ökosysteme, sowie entsprechende Messwerte, welche die einzelnen Komponenten dieser Systeme beschreiben.

Ein angemessenes Monitoring aquatischer Ökosysteme ist daher unerlässlich. Eine solche Überwachung hat sowohl hinsichtlich der betrachteten Parameter als auch bezüglich der verwendeten Methoden eine lange Tradition. Aquatische Ökosysteme – Teiche, Seen und Fließgewässer – können anhand abiotischer Aspekte bewertet werden, einschliesslich der Wasserchemie und der phy-

sischen Wasserstruktur, oder unter dem Blickwinkel biologischer Aspekte, u. a. hinsichtlich der Diversität und der Zusammensetzung biologischer Lebensgemeinschaften, die für Zielkriterien repräsentativ sind. Wichtig ist, dass all diese Monitoringansätze davon ausgehen, dass durch das Messen weniger Schlüsselvariablen der Zustand und die mögliche Tendenz des Wandels des gesamten Ökosystems beschrieben werden können. Folglich handelt es sich bei den Zielkriterien um Annäherungen und vereinfachte Beschreibungen eines komplexeren Systems.

Die Entwicklung und die Verwendung von Monitoringansätzen für Zielkriterien reichen weit zurück und haben in den letzten Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewonnen. Zunächst dominierten einfache chemische Makronährstoffmessungen das Feld, danach wurden sie durch biologische Kriterien ergänzt, welche die Nährstofffracht von Süswassersystemen charakterisieren (z. B. Saprobienindex), später kamen Parameter hinzu, welche die strukturellen Veränderungen und die Verschmutzung mithilfe verschiedener Chemikalien beschreiben, sowie eine Reihe taxonomischer Gruppen, wie Fischen, Makroinvertebraten oder Kieselalgen, die diese Effekte festhalten. Nicht zuletzt ist der Einsatz von Monitoringansätzen und den erforderlichen spezifischen Instrumenten in den letzten Jahrzehnten stetig gewachsen, sowohl infolge der besonderen Bedürfnisse, die neue Zielkriterien erforderten (z. B. neue Treiber wie Mikroverunreinigungen), als auch wegen neu verfügbarer Methoden. Dies führte in der Schweiz wie anderswo zu einem Katalog von gemeinsamen Normen (z. B. BAFU 2019a), der sich in grossen Monitoringprogrammen wie in der *Nationalen Beobachtung Oberflächengewässerqualität NAWA* (BAFU, 2013; Kunz et al., 2016) oder im *Biodiversitätsmonitoring Schweiz BDM* (Koordinationsstelle BDM, 2014) deutlich widerspiegelt. Viele dieser Programme sind operativ und funktionieren gut (Wüthrich & Altermatt, 2019), bergen allerdings auch inhärente Beschränkungen und Herausforderungen, die meist durch die verwendeten Methoden bedingt sind. So beruhen die meisten Methoden auf der Probenahme, der Sortierung und der morphologischen Identifizierung von Organismen, was zeitintensiv ist und nur für eine kleine Anzahl an Organismengruppen durchgeführt werden kann. Auch eignen sich viele Techniken nur für

mit Watstiefeln begehbare Gewässer und nicht für grosse Flüsse und Seen und sie können nur schwer auf sehr kleine Fliessgewässer, Grundwasser oder Quellsysteme angewandt werden. Keine der momentan eingesetzten Techniken birgt eine Automatisierungsmöglichkeit (weder bei der Probenahme noch bei der Verarbeitung), was diese Ansätze bezüglich räumlicher oder zeitlicher Auflösung einschränkt. Bei der aquatischen Chemie hat sich gezeigt, dass eine hohe zeitliche Auflösung der Probenahme notwendig ist, um Ökosysteme in Flüssen und Bächen ausreichend zu beschreiben und zu verstehen.

Innerhalb der letzten vier bis acht Jahre hat sich eine neue Methode etabliert, die das Potenzial hat, einige dieser Beschränkungen zu überwinden und die biologischen Untersuchungen und die biologische Bewertung von aquatischen Ökosystemen zu revolutionieren: die sogenannte Umwelt-DNA (eDNA; aus dem Englischen «environmental DNA» abgeleitet). Man erkannte, dass aus Umweltproben wie Boden, Wasser, Sediment und Luft direkt Erbgut (DNA) von allen Organismen, d. h. nicht nur von Mikroben, gesammelt und extrahiert werden kann. Die Verwendung und die Möglichkeiten des eDNA-Ansatzes verzeichnen ein rasches Wachstum, die Techniken entwickeln sich rasant weiter. Zudem sind heute DNA-Sequenzierungen in einer Auflösung und zu Kosten möglich, die vor Kurzem noch nicht denkbar waren. Umwelt-DNA-basiertes Monitoring bietet zahlreiche Vorteile. Das Verfahren ist für makrobielle Organismen nichtinvasiv (es müssen keine Exemplare als Probe entnommen werden), taxonunabhängig (alle Organismen – Bakterien, Pflanzen und Tiere – können als Probe dienen) und birgt eine Automatisierungsmöglichkeit (Probenahme und Verarbeitung, was eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung ermöglicht).

Das Interesse für die Entwicklung und die Verwendung von eDNA hat zugenommen, insbesondere für Anwendungen in aquatischen Ökosystemen. In der heutigen Zeit sind einige dieser Ansätze bereits gut etabliert und in rechtsverbindliche Biomonitoringprogramme integriert (z. B. bei invasiven Karpfenarten in den USA [US Fish and Wildlife Service 2019] und bei gefährdeten Molchen im Vereinigten Königreich [www.gov.uk/guidance/great-crested-newts-surveys-and-mitigation-for-development-projects]). Gleichzeitig verschieben die Fortschritte in den Biotechnologien die Grenzen des technisch

Machbaren immer weiter. Parallel dazu wird die rechtliche und praktische Umsetzung diskutiert, getestet und standardisiert – sowohl regional (z. B. mit verschiedenen Pilotprojekten zur Verwendung von eDNA in der Schweiz auf kantonaler und nationaler Ebene) als auch international (z. B. mit Standards, die in einem europaweiten COST Action *DNAqua-Net* diskutiert werden, und einer entsprechenden Arbeitsgruppe im Europäischen Komitee für Normung [Leese et al., 2018]). Diese rasche Entwicklung hat nicht nur dazu geführt, dass die Planung und die Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten der Methode laufend erfolgen, sondern auch dazu, dass Hoffnungen, Erwartungen und Versprechen zum Potenzial des Verfahrens stark variieren: Einige sehen die eDNA-Methode als Lösung aller Biomonitoringprobleme, während andere eher die möglichen Einschränkungen und die noch immer voranschreitende Entwicklung der Methode hervorheben. Momentan verzeichnet der angewandte Bereich der eDNA eine rasante Entwicklung – einige Aspekte und Ansätze sind bereits teilweise umgesetzt, während andere eher Ideen und Visionen mit einem Versprechen für zukünftige Anwendungen sind.

Diese Situation stellt für die angewandte Umsetzung eine Herausforderung dar. Es muss entschieden werden, welches Verfahren einzusetzen ist, in welche Verfahren investiert werden soll, wie Monitoringprogramme geführt oder neu ausgerichtet werden sollen und welchen Versprechungen zu folgen ist. Ausserdem ist es wichtig, gemeinsame Normen zu beschliessen und sich darauf zu verständigen, um eine reproduzierbare und verlässliche Umsetzung zu gewährleisten. Um dies fachkundig und in einem angemessenen Rahmen zu tun, braucht es einen Überblick über die verschiedenen technischen Möglichkeiten, sowohl als Übersicht zum Stand der Technik als auch im Rahmen von Routineerhebungen. Zwar nimmt die Literatur zur eDNA exponentiell zu (z. B. Rees et al., 2014a; Thomsen & Willerslev, 2015; Deiner et al., 2017), doch viele Studien sind für Fachpersonen und Akteure ausserhalb des universitären Umfeldes nicht direkt zugänglich oder anwendbar. Neben der rein wissenschaftlichen Literatur wurde eine Reihe von nationalen Berichten und Richtlinien publiziert, die Aspekte neuer molekularer Biomonitoringverfahren abdecken. Sie sind jedoch entweder taxon- oder habitatspezifisch (z. B. Laramie et al., 2015; Carim et al., 2016; Holderegger et al., 2019) oder liefern

eher einen Überblick als Details zur spezifischen Umsetzung und zu technischen Aspekten (Herder et al., 2014; Winding et al., 2019). Eine ausführlichere Zusammenfassung und Richtlinien für Fachpersonen können helfen, die Standards in diesem Bereich festzulegen. Diese gewährleisten eine Konsistenz zwischen den Studien und legen die zu erreichenden Qualitätsniveaus fest. Schliesslich können praktische Empfehlungen, wie Fortschritte bei der Entscheidungsfindung erzielt werden können, sowie hinsichtlich der Umsetzung eines aquatischen Biomonitorings ebenfalls sinnvoll sein.

Dieser Bericht soll einen Überblick über die eDNA-Verfahren bieten, die für das (Bio-)Monitoring von Organismen in Süsswassersystemen existieren, und die Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren spezifisch erörtern. Zudem umfasst er normative Vorschläge zu bewährten Praktiken und den empfohlenen Routinestandards. Diese Empfehlungen entsprechen dem aktuellen Wissensstand, weitere Verbesserungen und Anpassungen sind zu erwarten. Im Fokus stehen Eukaryoten wie Fische, Amphibien, Makroinvertebraten oder Kieselalgen, aber viele Aussagen treffen auch für Bakterien zu. Die Empfehlungen für die bewährten Praktiken befinden sich auf einem relativ hohen und generell verallgemeinerbaren Level. Wir ergänzen diese Empfehlungen mit spezifischeren Protokollen, welche die bisher allgemein anerkannten und angewandten Praktiken auf diesem Gebiet widerspiegeln, die in einem sich rasch entwickelnden Umfeld als normativ betrachtet werden können. Ziel dieses Berichts ist es, dazu beizutragen, den Einsatz von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen zu standardisieren und umzusetzen und letztlich zu deren nachhaltigen Verwendung, Verwaltung und Schutz beizutragen.

2 eDNA: Definitionen, Anwendungen und Perspektiven

2.1 Definitionen

Was ist Umwelt-DNA?

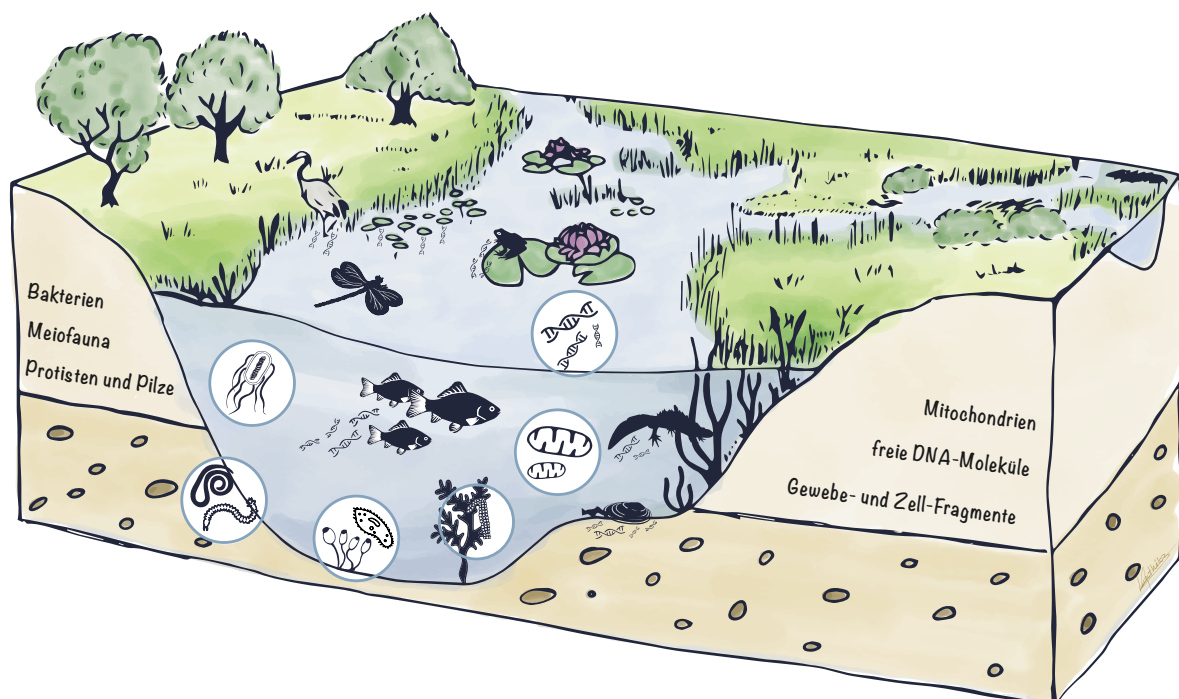
Umwelt-DNA (eDNA) ist ein Gemisch von Erbmateriale, das von Lebewesen und deren Überresten stammt und in verschiedenen Arten von Umweltproben vorhanden ist (Wasser, Sediment, Boden, Luft, siehe Abb. 1). Der grösste Teil der DNA in Umweltproben stammt von einzelligen Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Protisten), die allgemein sehr häufig vorkommen. Allerdings enthalten eDNA-Proben auch Erbmateriale von mehrzelligen Organismen, entweder von ganzen kleinen Organismen (Zooplankton, Meiofauna) oder von Spuren oder Überresten von grösseren Organismen (Wirbeltiere, Wirbellose oder Pflanzen). Diese genetischen Spuren von Tieren und Pflanzen, die manchmal als *extraorganismische* oder *makrobielle DNA* bezeichnet werden (Barnes & Turner, 2016), umfassen reproduktive Stadien wie Gameten, Gewebefragmente,

Epithelzellen oder Exkrete, die von den Organismen während ihres Lebenszyklus produziert oder abgesondert werden. In der Umwelt überdauern sie für eine gewisse Zeit – Stunden bis Tage in der freien Wassersäule (Sansom & Sassoubre, 2017), Jahrzehnte bis Jahrhunderte in Sedimenten (Monchamp et al., 2018) und Jahrtausende im Eis (Pedersen et al., 2015) oder im Sediment vom Meeresgrund (Lejzerowicz et al., 2015). Indem diese eDNA gesammelt und analysiert wird, können makrobielle Arten festgestellt und überwacht werden, auch wenn die Organismen selbst in den Umweltproben nicht enthalten sind.

In diesem Bericht wird eine weit gefasste Definition von eDNA verwendet, die DNA unterschiedlicher Herkunft umfasst, einschliesslich mikrobieller und makrobieller Arten. Diese Entscheidung wurde bewusst getroffen, weil einige routinemässige Biomonitoringprogramme auch

Abbildung 1

Alle Organismen tragen potenziell zur Umwelt-DNA (eDNA) bei, die aus unterschiedlichen Quellen stammen kann, etwa aus ganzen Zellen oder Gewebefragmenten, Organellen oder freien DNA Molekülen. eDNA kann aus Wasser, Boden, Sedimenten oder Luft gewonnen werden.



einzelige Bioindikatoren wie Kieselalgen verwenden. Der Bericht bezieht auch sogenannte Bulk-DNA mit ein. Dabei handelt es sich um DNA, die aus einer per Kicknetz oder durch Sieben gewonnenen Mischprobe von Makroinvertebraten extrahiert wurde. Die spezifische Herkunft der DNA wird im ganzen Bericht klar definiert.

Was ist DNA-Barcoding und DNA-Metabarcoding?

DNA-Moleküle enthalten die für jede Art spezifische Erbinformation. Ausgewählte kurze DNA-Fragmente, sogenannte **DNA-Barcodes**, können je nach ihrem Variabilitätsniveau verwendet werden, um Arten oder höhere Taxa zu identifizieren. Solche Fragmente umfassen in der Regel eine hypervariable Region und erlauben es, dieselbe Barcoderegion für mehrere Arten innerhalb einer taxonomischen Gruppe zu verwenden. Der DNA-Barcode sollte idealerweise variabel genug sein, um eng verwandte Arten zu unterscheiden (d. h. auf der zwischenartlichen Ebene variabel), innerhalb einer Art jedoch keine Variabilität aufweisen (d. h. auf innerartlicher Ebene nicht variabel). Es existieren weithin anerkannte Standard-Barcoding-Gene, die im Allgemeinen zur Identifizierung von Tieren (Hebert et al., 2003), Pflanzen (Hollingsworth, 2011), Pilzen (Schoch et al., 2012) oder Protisten (Pawlowski et al., 2012) verwendet werden.

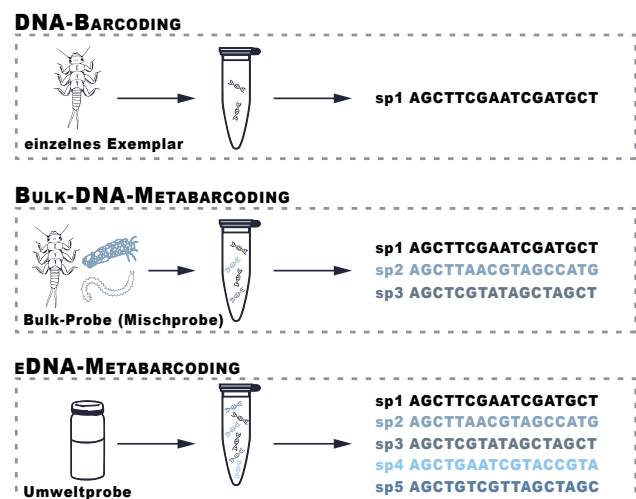
Jedem Barcode liegt typischerweise ein Belegexemplar bei, aus dem er gewonnen wurde. Die weltweite DNA-Barcode-Datenbank (www.boldsystems.org) wird von International Barcode of Life (<https://ibol.org>) geführt. In der Schweiz verwaltet SwissBOL (www.swissbol.ch) (siehe Kapitel 6) die DNA-Barcodes der Schweizer Fauna und Flora.

DNA-Metabarcoding unterscheidet sich vom DNA-Barcoding, indem eine Artengemeinschaft und nicht unbedingt eine einzelne Art analysiert wird (Abb. 2). Die Gemeinschaftsprobe kann aus Umwelt-DNA oder aus Bulk-Proben (Mischproben) gewonnen werden. Mischproben sind eine Sammelprobe von intakten Individuen, die aus der Umwelt stammen. Eine Probe kann je nach Spezifität des Barcoding-Gens und der Diversität der in der Umwelt vorhandenen Arten sehr viele verschiedene Metabarcodes enthalten. Die grösste Herausforderung besteht bei einer typischen Metabarcoding-Untersuchung darin, die Metabarcodes einzelnen Arten oder höheren taxonomischen

Abbildung 2

Schematische Erklärung von Barcoding, Bulk-DNA- und eDNA-Metabarcoding

Beim Barcoding wird DNA aus einem einzelnen Individuum extrahiert, und die DNA einer spezifischen Barcoderegion wird sequenziert. In Bulk-Proben (Mischproben) wird DNA aus den Geweben vieler Individuen extrahiert, die vielen Arten angehören können. Beim eDNA-Metabarcoding wird DNA direkt aus der Umweltprobe (Wasser, Boden, Sediment, Luft) extrahiert. Bei den letzten zwei Verfahren werden Sequenzen vieler verschiedener Taxa erzeugt, die bioinformatisch aufgetrennt werden müssen.



Kategorien zuzuweisen. Wie effizient diese taxonomische Zuweisung gelingt, hängt von der Vollständigkeit der Barcoding-Referenzdatenbank ab. Lücken in Barcoding-Referenzdatenbanken stellen das grösste Hindernis bei der ökologischen Interpretation von Metabarcoding-Daten dar (Weigand et al., 2019).

2.2 Mögliche Anwendungen

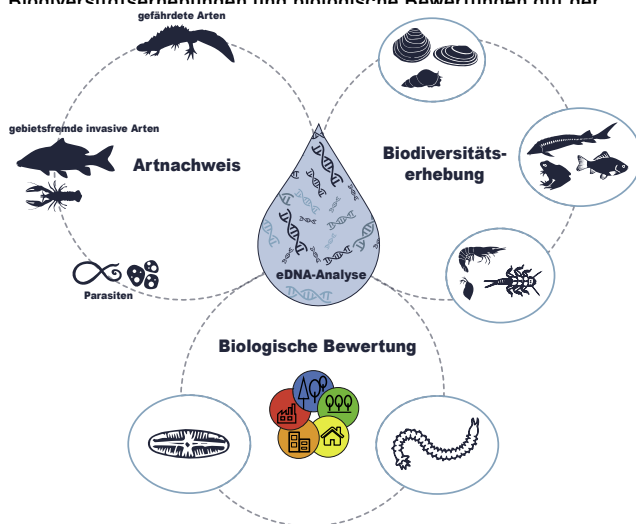
Umwelt-DNA wird im aquatischen Biomonitoring hauptsächlich für drei Zwecke eingesetzt (Abb. 3):

- Einzelartnachweis
- Biodiversitätserhebung (Zusammensetzung von Gemeinschaften)
- Biologische Bewertung (biotische Indizes)

Der **Einzelartnachweis** wird im Allgemeinen in der Naturschutzbiologie verwendet (Monitoring von seltenen/gefährdeten Arten) sowie beim Management und Monitoring biologischer Invasionen (Harper et al., 2017; Holderegger et al., 2019) oder beim Nachweis von Parasiten und Pathogenen (Krieg et al., 2019b). Allenfalls müssen dafür artenspezifische Primer entwickelt werden, die den Nachweis der Zielspezies erlauben. Ein spezifischer Vorteil der Einzelartnachweismethode besteht darin, dass die DNA-Menge mit qPCR und dPCR relativ genau quantifiziert werden kann. Dieser Ansatz hat sich in zahlreichen Studien zu invasiven und bedrohten Arten von Fischen, Amphibien und Weichtieren als äusserst wirksam erwiesen, aber auch in Studien zu Pathogenen und Parasiten, bei denen deren DNA-Spuren im Wasser und im Sediment nachgewiesen wurden (Jerde et al., 2011; Mächler et al., 2014; Bass et al., 2015). Die Anwendung dieses Ansatzes auf Krebstiere (insbesondere auf Krebse, siehe Krieg et al. [2019a]) und auf Taxa mit einem Aussenskelett (Exoskelett) wie Käfer scheint schwieriger zu sein – wahrscheinlich weil diese Tiere und Taxa weniger DNA in die Umwelt freisetzen, was dazu führt, dass sich ihre eDNA unter den Nachweisgrenzen dieser Methoden bewegt. Die Besonderheiten der Verwendung von eDNA für den Einzelartnachweis bei Wasserlebewesen wurden von Goldberg et al. (2016) und vielen anderen erörtert.

Die **Biodiversitätserhebung** ist ein weiterer üblicher Anwendungsbereich für eDNA. In diesem Fall wird die eDNA-Metabarcoding-Methode verwendet, um Informationen zu Zusammensetzung, Struktur und Diversität einer Gemeinschaft von Organismen zu erhalten. Dieser Methode liegen Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologien (high throughput sequencing; HTS) zugrunde, die Millionen von DNA-Sequenzen erzeugen und möglicherweise die Identifizierung sämtlicher in einer Probe enthaltener Arten erlauben, einschliesslich seltener und unscheinbarer Arten. Der Metabarcoding-Ansatz hat erwiesenermassen Artenlisten hervorgebracht, die ebenso vollständig sind wie bei herkömmlichen Methoden, die auf Probenahmen mit Elektrofischerei (Hänfling et al., 2016) oder Kicknetz beruhen (Fernández et al., 2018; Mächler et al., 2019). Die meisten eDNA-basierten Biodiversitätserhebungen in aquatischen Ökosystemen nutzen Wasser- oder Sedimentproben. Allerdings wurde die Analyse von DNA aus Bulk-Proben (Mischproben) bei Wasserinsekten und Makrozoobenthos als unkompliziertere Lösung für eine kurzfristige Umsetzung empfohlen (Blackman et al., 2019). Doch während die aus Mischproben resultierenden Schätzungen mit den herkömmlichen Verfahren eher vergleichbar sind als eDNA-basierte Ansätze, bestehen auch Einschränkungen der herkömmlichen Methoden weiter, beispielsweise der grosse Zeitaufwand bei der Probenahme oder grössenbedingte systematische Fehler bei der Probenahme.

Abbildung 3
Mögliche eDNA-Anwendungen umfassen den Einzelartnachweis, Biodiversitätserhebungen und biologische Bewertungen auf der



Metabarcoding-Daten können auch verwendet werden, um **biotische Indizes** für eine Umweltverträglichkeitsprüfung abzuleiten (erörtert in Pawlowski et al., 2018). In Europa sind rund 300 Bewertungsmethoden anerkannt (Birk et al., 2012), wovon in der Schweiz momentan vier angewandt werden (Fische, Schager & Peter, 2004; wirbellose Wassertiere, Stucki, 2010; Pflanzen, Känel et al., 2017; Kieselalgen, Hürlimann & Niederhauser, 2007). Insbesondere bei den Kieselalgen (siehe Kapitel 8.4.1) wurden beträchtliche Anstrengungen unternommen, um diese Indizes auf der Grundlage von eDNA-Daten zu berechnen. Die grössten Herausforderungen stellen die Unvollständigkeit der DNA-Barcode-Referenzdatenbanken (Weigand et al., 2019) und die Interpretation quantitativer eDNA-Daten dar. Die Lösungen zur Überwindung dieser Hindernisse sind vielversprechend, und einige molekulare Indizes befinden sich in der Entwicklungsphase (Apothéoz-Perret-Gentil et al., 2017).

2.3 Vor- und Nachteile

Die Verwendung eDNA-basierter Verfahren hat im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden, die auf der direkten Probenahme von Organismen und der morphologischen Identifizierung beruhen, viele Vorteile (Tabelle 1). So erlaubt die eDNA u. a. eine nichtinvasive Probenahme, die Identifizierung von unscheinbaren und unvollständigen

Individuen oder eine Erweiterung des Spektrums von Zeigertaxa. Allerdings hat die Methode auch einige gewichtige Nachteile, die es zu beachten gilt. Da sich die Methode rasch weiterentwickelt, werden einige Nachteile wohl verschwinden, während andere inhärenter sein könnten. Beispielsweise eignen sich eDNA-basierte Ansätze allenfalls schlecht, um die Häufigkeit von Organismen abzuschätzen, und sie können keine Angaben zur Alters- oder Grös-

Tabelle 1

Die Vor- und Nachteile der eDNA im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren

Viele Punkte sind insbesondere relevant für Organismen, die vom Tierschutzgesetz abgedeckt sind (z. B. Fische, Zehnfusskrebse und Amphibien).

	eDNA	Herkömmliche Probenahme/Morphologische Bestimmung
Zeit pro Probe	Schneller bei grosser Anzahl Proben	Konstant (d. h. nur geringe zeitliche Optimierung möglich)
Kosten pro Probe	Nehmen mit der Anzahl der Proben ab (nur Metabarcoding)	Konstant
Sensitivität	Häufig sehr hoch, indem Spuren von Arten, Jungtiere und Reproduktionsphasen nachgewiesen werden	Allgemein tief, erfordert grosse Anstrengungen bei der Probenahme, um eine vollständige Artenliste zu erhalten
Taxonomische Bandbreite	Allgemein breit, kann auf viele taxonomische Gruppen angewandt werden	Auf Taxa beschränkt, die sich morphologisch unterscheiden lassen
Nachweisbarkeit	Sehr hoch, eignet sich für den Nachweis seltener, invasiver und pathogener Arten	Erfordert eine intensive Probenahme
Probenahme	Nichtinvasiv, ausser bei Mischproben	Normalerweise invasiv (Elektrofischerei, Kicknetz)
Feldbeobachtungen	Erfordern den Einsatz einer speziellen Feldausrüstung (z. B. tragbares PCR-Gerät)	Möglich bei grossen Tieren sowie bei Pflanzen
Probenverarbeitung	Komplex, könnte automatisiert werden	In der Regel einfache Handgriffe, jedoch manuell (keine Automatisierung möglich)
Kontamination	Hochempfindlich, daher potenzielles Risiko	Niedriges Risiko
Infrastruktur	Erfordert ein spezialisiertes Molekularlabor	Kann mit einfacher Ausrüstung erfolgen
Artenbestimmung	Basierend auf einer meist öffentlichen Referenzdatenbank Kann kryptische Arten und genetische Sorten nachweisen	Basiert auf persönlichen taxonomischen Kenntnissen und vorhandener Literatur
Qualitative Daten	Artenliste/geclusterte Sequenzen (operationelle taxonomische Einheiten, OTUs), darunter lebende Organismen und deren Überreste	Liste von lebenden Arten, Populationsstruktur und Gesundheitszustand
Quantitative Daten	Relative Häufigkeit von Reads (Metabarcoding) oder DNA-Quantifizierung (qPCR)	Absolute Häufigkeit an Exemplaren in der Probe
Datenanalyse	Erfordert spezielle bioinformatische Pipelines für die Sequenzanalyse	Nutzt relativ einfache Statistiktools
Dateninterpretation	Muss verschiedene technische Verzerrungen und eDNA-spezifische Merkmale berücksichtigen (Persistenz, Transport)	Abhängig von persönlichen Kenntnissen und fundiertem ökologischem Wissen
Standardisierung	Standards müssen festgelegt werden	Standards bestehen bereits

senstruktur einer Population liefern. Weiter erlauben es eDNA-Verfahren nicht, Arten zu identifizieren, die sich kürzlich hybridisiert oder auseinanderentwickelt haben (z. B. Weissfischarten der Gattung *Coregonus*), da diese nur durch Multilocus-Genotypen oder durch ein starkes Kopplungsungleichgewicht identifiziert werden können. In diesen Fällen ist die Information zur Identität der Art physisch getrennt auf mehreren Chromosomen gespeichert, und nur Gewebeproben von einzelnen Individuen sind diagnostisch. Dieser Bericht stellt die Vorteile und die besten technologischen Anwendungen gemäss heutigem Stand vor und beschreibt sie. Er hebt aber auch hervor, wo und inwiefern bei der Interpretation und dem Vergleich mit herkömmlichen Bewertungen Vorsicht geboten ist.

3 eDNA in Süßwasserökosystemen

Der eDNA-Pool in aquatischen Ökosystemen stammt sowohl von mikrobiellen als auch von makrobiellen Organismen, einschliesslich kleiner Tiere (Zooplankton, benthische Meiofauna). Die Interpretation von eDNA-Daten kann von Art und Herkunft abhängen. Bei mikrobiellen und meiofaunalen Komponenten kann DNA von Organismen in Umweltproben direkter mit der Biologie, dem Vorkommen und der Ökologie lebender Organismen in Zusammenhang gebracht werden, da von diesen in den eDNA-Proben ganze Individuen vorhanden sein können. Bei makrobiellen Organismen stammt die DNA hingegen aus den zellulären Überresten, die im Wasser vorhanden oder an Partikeln im Sediment gebunden sind. In diesem Fall hängt die Nachweisbarkeit der eDNA nicht von den Organismen selbst, sondern von umweltbezogenen und biologischen Faktoren ab. Diese können in drei Hauptkategorien eingeteilt werden: Produktion, Abbau und Transport (Abb. 4). Sie wirken sich direkt auf die Nachweisbarkeit makrobi-

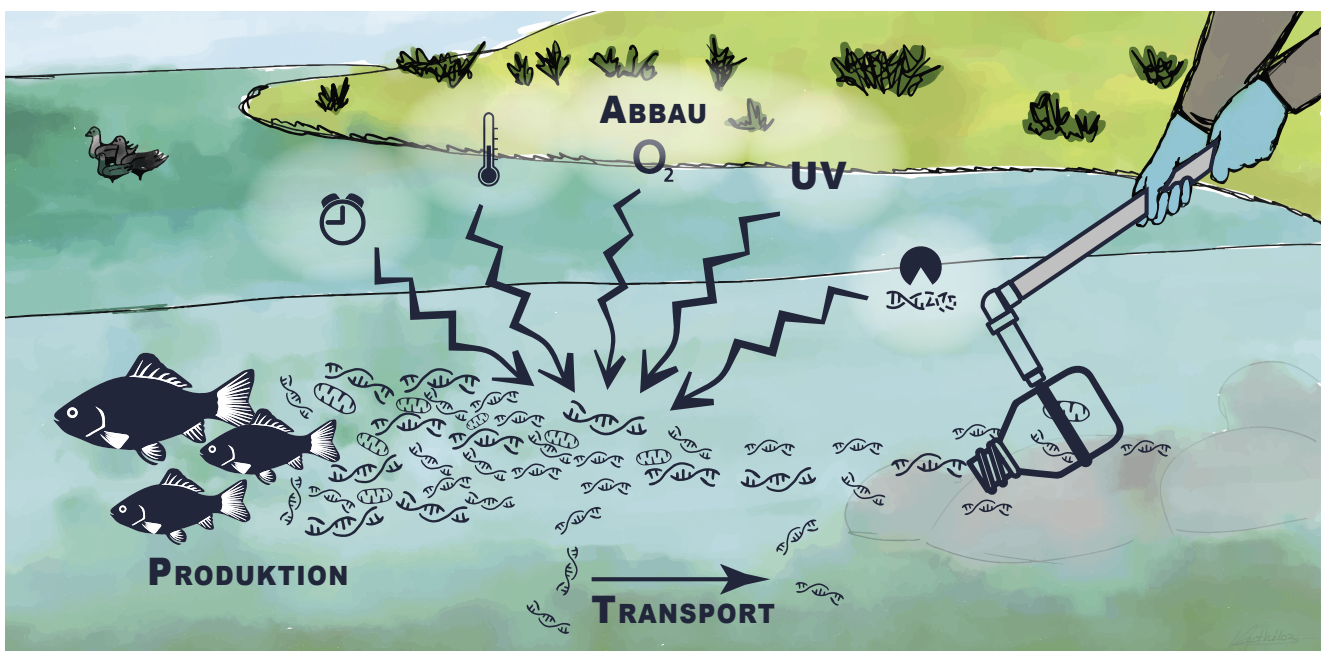
eller eDNA aus und in einem geringeren Ausmass auch auf diejenige mikrobieller und meiofaunaler eDNA.

Die **Produktion**, d. h. die Ausscheidung von DNA in die Umwelt, hängt weitgehend von der Häufigkeit und von der Dichte eines Taxons und dessen biologischen und physiologischen Merkmalen ab. Fische und Amphibien geben grössere DNA-Mengen an die Umwelt ab, während Gliederfüsser – vermutlich wegen ihres Exoskeletts – weit weniger DNA freisetzen. Im Allgemeinen hängt die Menge an freigesetzter eDNA auch von artenspezifischen Stoffwechselraten ab und kann während des Lebenszyklus variieren (z. B. während der Fortpflanzungsperiode zunehmend; Maruyama et al., 2014; Bylemans et al., 2016). Die Schwankung bei der Produktion von eDNA durch verschiedene Taxa kann räumlich und zeitlich stark variieren und die quantitative Interpretation von eDNA-Daten schwierig gestalten.

Abbildung 4

Die Produktion und der Verbleib makrobieller eDNA in aquatischen Lebensräumen

eDNA entsteht, wenn Organismen ihre DNA in die Umwelt abscheiden (z. B. Fische, die Schleim absondern). Diese eDNA unterliegt dann verschiedenen Abbauprozessen (Temperatur, mikrobielle Zersetzung usw.) und kann durch passive Strömung im Gewässer transportiert werden. Diese drei Schritte (Produktion, Abbau und Transport) können die Interpretation der eDNA-Daten beeinflussen.



Der **Abbau** von eDNA hängt von verschiedenen physikalisch-chemischen und biologischen Faktoren ab, darunter Temperatur, UV, pH, Ionen und mikrobielle Aktivität (Strickler et al., 2015; erörtert in Barnes & Turner, 2016). Einige Studien zeigen, dass makrobielle eDNA unter kälteren, dunkleren und alkalischeren Bedingungen länger besteht (Goldberg et al., 2015). Ausserdem wird angenommen, dass bakterielle Aktivität sich ebenfalls stark auf den Abbau von eDNA auswirkt, häufig im Zusammenhang mit physikalisch-chemischen Parametern wie Temperatur oder Phosphorbedarf. Eine offensichtliche Auswirkung des eDNA-Abbaus ist die geringere Anzahl Moleküle, die nachgewiesen werden können. Es hat sich gezeigt, dass die extraorganismische eDNA im Allgemeinen nicht länger als 14 bis 60 Tage in der Wassersäule verbleibt (Goldberg et al., 2015), teilweise auch deutlich kürzer. Allerdings kann der Abbau auch zu gewissen chemischen Veränderungen von DNA-Molekülen führen, welche die korrekte Artenbestimmung mit eDNA-Daten beeinträchtigen können. Der eDNA-Abbau muss auch nach der Probenahme und der Probenverarbeitung berücksichtigt werden. Proben müssen etwa so gelagert und verarbeitet werden, dass die Erhaltung der eDNA sichergestellt ist. Im Allgemeinen bedingt dies die Lagerung von Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder in geeigneten Pufferlösungen.

Der **Transport** von makrobieller eDNA bezieht sich auf die passive Fortbewegung von intrazellulärer, extrazellulärer oder partikelgebundener DNA in der Umwelt (z. B. durch Strömung oder Wind), sodass makrobielle eDNA an einem anderen Ort entnommen werden kann als sie entstanden ist. Der Transport wurde insbesondere für lotische Ökosysteme untersucht. Es wurde beispielsweise geschätzt, dass eDNA in Bächen über mindestens 10 Kilometer (Deiner & Altermatt, 2014; Civade et al., 2016) und über bis zu 100 Kilometer in grossen Flüssen – mit einer geschätzten Beförderungszeit von rund 42 Stunden für diese Distanz (Pont et al., 2018) – befördert werden kann. Es wird davon ausgegangen, dass makrobielle eDNA sich wie feinteiliges organisches Material verhält und dass ihre Transportdistanz von den hydraulischen Eigenschaften des Fliessgewässers abhängt (Pont et al., 2018). Da eDNA möglicherweise über lange Distanzen befördert werden kann, liefert ihre Analyse Informationen zur Biodiversität über grössere räumliche Skalen und umfasst auch Informationen auf Ebene der (Teil-)Einzugsgebiete (Deiner et

al., 2016). Umgekehrt kann der Transport die detaillierte Interpretation von Orten, wo eine Art effektiv vorkommt, behindern. Bei hochmobilen Arten wie vielen Fischen stellt der Transport kein Problem dar, aber für Lebensraumspezialisten kann dies bei der Interpretation von DNA-Ergebnissen zu Herausforderungen führen. Der Transport von makrobieller eDNA kann ebenfalls durch andere Arten beeinflusst werden, speziell wenn letztere über den Kot die DNA von anderen Organismen ausscheiden.

Die **Nachweisbarkeit** umfasst Produktion, Abbau und Transport, hängt aber auch von der Probenahmestrategie ab, wie etwa von der Nähe der Probenahmestelle zum Lebensraum der Art oder vom Volumen des Probenmaterials. Ein erfolgreicher Nachweis hängt auch von molekularen Protokollen ab, insbesondere von der Effizienz der DNA-Extraktionsverfahren und der Spezifität der PCR-Primer.

3.1 eDNA-Untersuchung verschiedener Gewässer

Die Untersuchung von eDNA hängt von der Art des untersuchten aquatischen Ökosystems ab. Zwar ähneln sich die Probenahmeverfahren insgesamt, aber es gibt kein Standardverfahren für die eDNA-Probenahme sämtlicher Gewässerarten, da sich diese in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften unterscheiden. Probenahmeverfahren müssen an die jeweils untersuchte Gewässerart angepasst werden. Im folgenden Kapitel werden einige eDNA-Merkmale vorgestellt, die für lenitische und lotische Ökosysteme typisch sind (in Tabelle 2 zusammengefasst).

3.1.1 Stehende Gewässer (lenitische Ökosysteme)

Stehende Gewässer, insbesondere Teiche, gehören zu den ersten Gewässern, denen Proben entnommen wurden, um mittels eDNA Arten nachzuweisen (Ficetola et al., 2008), vermutlich wegen ihrer kleinen und genau definierten Grösse. In der Schweiz gibt es mit über 1500 Seen, die eine Fläche von über 0,5 ha aufweisen, und noch viel mehr Teichen zahlreiche stehende Gewässer, aber es existiert kein offizielles und standardisiertes Verfahren für das Biomonitoring von Seen oder Teichen. Die Grösse dieser Gewässer variiert stark, was die makrobielle eDNA sowie die Art der Probenahme stark beeinflussen könnte. Der Fokus liegt auf den zwei Extremfällen – kleinen Teichen

und grossen Seen –, im Wissen, dass in der Natur ein Gradient zwischen diesen Ökosystemen besteht.

Teiche

Kleine Teiche sind nicht so gut dokumentiert und werden daher momentan im Regelungsrahmen in der Schweiz vernachlässigt. Auch im Rahmen der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie werden Teiche nicht berücksichtigt, wahrscheinlich weil sich die aktuellen Probenahmeverfahren für andere aquatische Lebensräume für Teiche nicht eignen. Der Einsatz eines eDNA-basierten Monitorings in diesen Systemen könnte dies ändern.

Teiche sind hinsichtlich ihrer Wassermassen höchst variabel und können in gewissen Fällen gar periodisch austrocknen. Ausserdem weisen Teiche häufig eine Schichtung auf, da sich das Wasser nur in geringen Mengen vertikal oder horizontal bewegt. Dies führt zu drei wichtigen Punkten, die bei der eDNA-Probenahme aus Teichen zu beachten sind (Harper et al., 2019a). Erstens ist die makrobielle eDNA wegen des stehenden Wassers ungleichmässig verteilt, und für eine repräsentative Probenahme müssen mehrere Proben über den ganzen Teich verteilt entnommen werden. Zweitens führt die geringe Fließgeschwindigkeit mit der Zeit zu einer Ansammlung von DNA, gleichzeitig sind aber die Temperaturen kleiner Gewässer höchst variabel und besonders im Sommer hoch, was zu einem schnelleren Abbau von eDNA führt. Drittens weisen Teichsysteme häufig eine hohe Trübung auf, die oft aus gelösten organischen Stoffen oder Einträgen vom Land resultiert. Diese hohe Trübung stellt für die Filtration von Wasser eDNA und die Verwendung von Ausfällverfahren eine Herausforderung dar. Filter mit grösseren Poren oder ein vorgängiger Filterschritt mit grösseren Poren können helfen, diesen Nachteil abzufedern. Organische Schwebstoffe können die PCR stark behindern und eine erfolgreiche Amplifikation im nachgelagerten Laborverfahren erschweren. In Teichsystemen wird daher dringend empfohlen, eine interne Positivkontrolle zu verwenden, um mögliche PCR-Inhibition erkennen zu können.

Seen

Die Schweiz zählt viele Seen, und diese gehören zu den grössten und tiefsten in Mitteleuropa. Die Untersuchung der Diversität dieser Gewässer wird stark durch deren Zugänglichkeit (Tiefen von 200m oder mehr) und Grös-

se eingeschränkt. Unterschiede in der Grösse und Tiefe der Seen beeinflussen die Verteilung der eDNA im Wasser. Tiefere Seen bilden im Sommer und im Winter Wasserschichten, gefolgt von einer Vermischungsphase im Frühling und im Herbst. Diese saisonal schwankenden Wasserbewegungen können die Verteilung der makrobiellen eDNA in der Wassersäule beeinflussen. So gelingt der Nachweis einiger Arten, insbesondere benthischer Fische, nur durch eine Probenahme in der Nähe ihres Lebensraums (Hänfling et al., 2016). Deshalb müssen Proben in verschiedenen Tiefen entnommen werden.

3.1.2 Fließgewässer (lotische Ökosysteme)

Weil bei Fließgewässern wie Flüssen oder Bächen eine eindeutige Fließrichtung vorliegt, lässt die in diesen Wassersystemen gewonnene makrobielle eDNA im Vergleich zu stehenden aquatischen Ökosystemen einen unterschiedlichen räumlichen Rückschluss zu (Deiner & Altermatt, 2014; Deiner et al., 2015). Die Wasserbewegung transportiert eDNA durch das System und wird durch den Abfluss beeinflusst (Carraro et al., 2018). Zwar führen diese Transportprozesse (und der damit eng und zeitlich verzahnte Abbau) dazu, dass eDNA-Verfahren in Fließgewässern für genau lokalisierte (punktgenaue) Bewertungen weniger geeignet sind, aber gleichzeitig birgt dieser Transport das Potenzial, Biodiversitäts-Charakteristika auf Ebene des Einzugsgebiets in der Grössenordnung von mehreren Quadratkilometern zu erschliessen (Deiner et al., 2016; Altermatt et al., 2020; Carraro et al., 2020).

Im Gegensatz zu stehenden Gewässern, die eine chronologisch geschichtete und dauerhafte Sedimentschicht aufweisen, welche die Rekonstruktion von Biodiversität und Umweltveränderungen über die letzten Jahrzehnte bis Jahrhunderte erlaubt, ist das Sediment in lotischen Systemen weitaus dynamischer. Es wird regelmässig aufgewirbelt und wurde daher selten für eDNA-Untersuchungen verwendet.

Bäche

Die eDNA in Fließgewässern kann durch die Landnutzung rund um das Gewässer beeinflusst werden (Mansfeldt et al., 2020). Der Eintrag aus Böden und Blättern, die in die Gewässer gelangen, führen nicht nur zu einem terrestrischen Signal bezüglich nachweisbarer Organismen, sondern auch zur Inhibition durch Huminsäuren bei der

PCR. Dies bedingt, dass die DNA im Labor gereinigt wird. Durch Gletscher gespeiste Bäche in den Alpen führen viele Schwebstoffe. Ausserdem können ihre saisonalen Regimes zwischen Winter und Schneeschmelze stark variieren. Bei Bächen in tieferen Regionen kann diese Schwankung vernachlässigt werden. Gleichzeitig nimmt aber beispielsweise die Zahl von Abwasserreinigungsanlagen in tiefergelegenen Gebieten zu. Deren Ausläufe können in den Bächen die Spuren der Artgemeinschaften aus der Abwasserreinigungsanlage hinterlassen (Mansfeldt et al., 2020).

Flüsse

Mit zunehmender Grösse und steigendem Volumen des Wasserflusses ergeben sich in Flüssen Herausforderungen für den Nachweis makrobieller eDNA. Probenahmen vom Ufer aus führen allenfalls zu nicht repräsentativen Proben, und die Probenahmestrategie muss eventuell auf den Lebensraum der Organismen abgestimmt werden. Das bedingt, dass Proben in der Mitte und an der Sohle des Flusses entnommen werden müssen. Der Nachweis von benthischen Fischen ist beispielsweise wahrscheinlicher, wenn Wasser nahe der Flusssohle entnommen wird (Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm, 2016). Allenfalls müssen bei Flüssen im Vergleich zu Bächen oder Teichen auch grössere Wasservolumen gesammelt und filtriert werden (10 – 100 Liter oder mehr). Doch dies kann wegen der Sedimente, welche die Filter verstopfen, zur Herausforderung werden. Die Transportdistanz und die Depositionsgeschwindigkeit von DNA-haltigen Partikeln müssen bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden, da sie zur Verbreitung von eDNA über grössere Distanzen beitragen können (Deiner & Altermatt, 2014).

3.1.3 Grundwasser und Quellen

Grundwasser ist die wichtigste Trinkwasserquelle der Schweiz. Es wird momentan im Rahmen des Programms *Nationale Grundwasserbeobachtung* (NAQUA) (BAFU, 2019b) beobachtet, aber es werden keine biologischen Indikatoren erhoben. Abgesehen von einigen artenspezifischen Studien, die auf eDNA aus dem Grundwasser basieren, gibt es nur wenige Publikationen, die sich mit der Mikrobengemeinschaft dieses Lebensraums befassen (Danielopol et al., 2000; Sohlberg et al., 2015), obwohl sich diese Methode vielleicht am besten für eine biologische Charakterisierung von Grundwasserlebensräumen eignet. Die Entnahme repräsentativer Proben kann eine

Herausforderung darstellen, da einige Grundwasserarten schwer zugänglich sein können. Allerdings können Trinkwasserbrunnen als guter Zugangspunkt genutzt werden. Oft sind die Dauer und die räumliche Ausdehnung des Wassertransports im Untergrund weniger bekannt, doch die kalte und dunkle Umgebung eignet sich vermutlich ideal, um eDNA länger zu konservieren.

Quellen sind an der Oberfläche sichtbar, wurden aber bisher in den nationalen Beobachtungsprogrammen weitgehend ausser Acht gelassen. Sie bieten Lebensräume für hochspezialisierte Flora und Fauna. Standardisierte Verfahren zur Klassifizierung von Quellen auf nationaler Ebene wurden neulich eingeführt (Küry et al., 2019). Für diese Klassifizierungen könnte sich eDNA-Metabarcoding als äusserst nützlich erweisen, da es die breite Palette an Organismen abdeckt, welche die Lebensräume in Quellen bewohnen (Amphibien, Plattwürmer, Weichtiere, Krebstiere, Eintagsfliegen, Steinfliegen, Libellen und Köcherfliegen, siehe Lubini et al., 2016). Quellen und Oberläufe können auch viele Einträge aus terrestrischen Habitaten verzeichnen, die wahrscheinlich zu einem vermehrten Vorkommen von eDNA von Organismen terrestrischer Herkunft führen.

Tabelle 2

Ausgewählte besondere Aspekte im Zusammenhang mit der eDNA-Untersuchung verschiedener Gewässer

Ökosystem	Besondere Aspekte	eDNA-Eigenschaften und mögliche Lösungen zur Abschwächung
Teiche	Schichtung	Ungleichmässige Verteilung – mehrere Stellen beproben
	Geringe Fliessgeschwindigkeit	Akkumulation über die Zeit
	Hohe Trübung	Filtration, PCR-Inhibition
	Hohe Temperaturen	Rascherer Abbau
	Austrocknen	Keine Wasser-eDNA vorhanden
	Kleines Gebiet	Hohe eDNA-Konzentration
Seen	Grösse und saisonale Schichtung	Ungleichmässige zeitliche Verteilung
	Tiefe der spezifischen Habitate	Probenahmen in verschiedenen Tiefen
	Algenblüten	Filtration, PCR-Inhibition
	Schichtung des Sediments	eDNA über die Zeit konserviert
Bäche	Transport	Räumliche Inferenz hängt von lokaler Bewegung des Gewässers ab
	Eintrag von organischem Material aus Boden und Blättern	PCR-Inhibition durch Huminsäuren
	Transport flussabwärts	Integration des Einzugsgebiets
Flüsse	Gross	Grössere Probenahmevolumen/spezifische Probenahmestrategien
	Transport über lange Distanzen	Verbreitung und räumliche Verteilung
	Tiefe der spezifischen Habitate	Probenahme an der Oberfläche und an der Sohle
	Transport flussabwärts	Integration des Einzugsgebiets
Grundwasser	Kann schwer zugänglich sein	Proben können nur in Quellen/Grundwasserbrunnen entnommen werden
	Kalte und dunkle Umgebung	Gute Konservierung
	Transportdauer und -distanz unbekannt	Nichtdefinierte Herkunft und Dynamik
	Kaum bekannte Biodiversität	Grosse Lücken in DNA-Referenzdatenbank
Quellen	Tiefe Temperatur	DNA-Konservierung
	Kaum bekannte Biodiversität	Lücken in Referenzdatenbank

3.2 Taxonspezifische Merkmale im Zusammenhang mit der eDNA-Untersuchung

Die eDNA-Ansätze wurden auf viele taxonomische Gruppen angewandt und fokussierten sich entweder auf den Nachweis einzelner Arten oder auf die Erhebung ganzer Gemeinschaften. Bei der Vorbereitung einer eDNA-Studie mit Fokus auf bestimmte Taxa gilt es, einige wichtige Fragen zu berücksichtigen:

- Sind die betreffenden Taxa in der Umweltprobe gut vertreten?
- Welche Art von Material sollte entnommen werden?
- Gibt es bestehende Probenahmeprotokolle?

- Welche genetischen Marker und Primersets sollten verwendet werden?
- Wie vollständig ist die Datenbank der DNA-Referenzbarcodes?

Nachfolgend werden spezifische Aspekte für verschiedene taxonomische Gruppen zur Verwendung in eDNA-Untersuchungen vorgestellt und diskutiert (Tabelle 3). Im Anhang werden für einige dieser Gruppen detaillierte Protokolle und bewährte Praktiken bereitgestellt.

3.2.1 Amphibien

Amphibien eignen sich sehr gut für eDNA-Studien, weil sie vermutlich grössere Mengen von DNA in die Umwelt freisetzen und daher relativ einfach nachgewiesen wer-

den können. Ausserdem sind alle in der Schweiz vorhandenen Arten in den jeweiligen DNA-Referenzdatenbanken abgedeckt. Amphibien gehören zu den ersten Artengruppen, auf die Verfahren mit makrobieller eDNA angewandt wurden (Ficetola et al., 2008). Es besteht grosses Interesse, eDNA für diese Gruppe zu verwenden, da der Nachweis über eDNA nachweislich sensitiver ist und tiefere Falsch-Negativ-Raten aufweist als herkömmliche Probenahmeverfahren (Cruickshank et al., 2019).

eDNA wird häufig für den Nachweis spezifischer Amphibienarten wie des gefährdeten Nördlichen Kammmolchs in England verwendet (Biggs et al., 2015; Harper et al., 2017; Rees et al., 2014b). Der eDNA-Nachweis von Amphibien wurde in Bächen und Teichen getestet, je nach bevorzugtem Lebensraum der entsprechenden Art. Die eDNA von Amphibien wird hauptsächlich aus dem Wasser extrahiert, aber die Probenahmeverfahren variieren je nach Studie. In Teichhabitaten wird das Ausfällen von eDNA wegen Schwebstoffen in der Wassersäule manchmal bevorzugt, aber auch die Filtration kann eingesetzt werden (siehe Kapitel 4.1.1). Der Ansatz stösst an seine Grenzen bei Artenkomplexen wie Wasserfröschen der Gattung *Pelophylax* oder bei Kreuzungen (z. B. *Triturus cristatus* und *carnifex* in der Schweiz), die anhand von eDNA nicht unterschieden werden können. Auch werden Arten mit semiaquatischer (*Salamandra salamandra*) oder terrestrischer Lebensart (*S. atra* oder *Hyla arborea*) weniger häufig in Wasserproben nachgewiesen (Holderegger et al., 2019).

Genetische Marker, die häufig für den Nachweis von amphibischer eDNA verwendet werden, sind mitochondriale 12S und 16S. Es gibt spezifische 12S-Primer für Frösche und Salamander (Valentini et al., 2016) und 12S-Primer für Molche (Harper et al., 2018). Die Barcoding-Datenbank ist für alle europäischen Arten relativ vollständig.

3.2.2 Fische

Ähnlich wie Amphibien eignen sich auch Fische für den Nachweis per eDNA, weil sie beträchtliche Mengen an DNA ins Wasser abgeben, in den Datenbanken relativ gut abgedeckt sind und herkömmliche Überwachungsmethoden (insbesondere Elektrofischerei) sehr ressourcenintensiv, invasiv und nicht auf grössere Gewässer

anwendbar sind. Der Einsatz von eDNA zum Nachweis und zur Bestandsaufnahme von Fischarten nimmt zu und wird im Biomonitoring immer häufiger als Alternative zu Elektrofischerei oder anderen invasiven herkömmlichen Methoden (z. B. Kiemennetzfischerei) verwendet. eDNA von Fischen wird nicht nur in der Wassersäule gefunden, sondern auch in Sedimenten, wo sie länger überdauern kann (Turner et al., 2014). Mehrere Studien zeigen, dass benthische Arten nur in Proben nachgewiesen werden können, die in der Nähe des entsprechenden Lebensraums entnommen wurden, und zwar für See- und Flusssysteme (Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm, 2016; Hänfling et al., 2016). In grossen Flüssen kann eDNA von Fischen über Hunderte von Kilometern flussabwärts befördert werden (Pont et al., 2018).

Beim Metabarcoding von eDNA von Fischen werden häufig 12S und 16S als genetische Marker eingesetzt. Diese werden verwendet, weil es fischspezifische Primer gibt (z. B. 12S-Mifish-Primer, Miya et al., 2015), die eine Amplifikation und eine Sequenzierung von DNA mit einem geringen Anteil an Nichtzielsequenzen ermöglichen. Diese Markerregionen sind aber bei erst kürzlich entstandenen Arten nicht diagnostisch, so dass in diesen Gruppen keine Arten unterschieden werden können (z. B. *Coregonus* sp.). Die Barcoderegion COI, die für klassisches DNA-Barcoding verwendet wird (basierend auf Gewebeprobe), hätte eine leicht bessere (aber noch immer unvollständige) Auflösung, wird aber für das eDNA-Metabarcoding von Fischen kaum genutzt, weil kein geeignetes fischspezifisches Primerset existiert. Die Datenbank der europäischen (und schweizerischen) Fische ist für den klassischen COI-Barcode zwar fast vollständig (Geiger et al., 2014; Knebelsberger et al., 2015), doch bestehen noch immer Lücken in den Fischdatenbanken für 12S und 16S, die für Metabarcoding eingesetzt werden.

3.2.3 Säugetiere

Obwohl beim Monitoring aquatischer Ökosysteme Säugetiere in der Regel nicht im Vordergrund stehen, finden sich ihre Spuren im Wasser, entweder weil sie einen semiaquatischen Lebensstil pflegen oder mit aquatischen Lebensräumen in Kontakt kommen. DNA von Säugetieren kann insbesondere über ihren Kot in das aquatische Ökosystem gelangen, aber auch durch direkten Kontakt (Durchquerung aquatischer Ökosysteme, Trinken). Studien in Wildtierpär-

ken zeigen, dass in Teichen, an denen grosse Säugetiere tranken, deren DNA verlässlich in der Wasser-eDNA nachgewiesen werden kann. Es ist aber schwieriger, sie in natürlichen Ökosystemen verlässlich und adäquat zu erfassen (Harper et al., 2019b; Thomsen et al., 2012). Die eDNA könnte insbesondere beim Nachweis kleiner Säugetiere wie beispielsweise der Ostschermaus (*Arvicola terrestris*) hilfreich sein, die von Kamerafallen nur schlecht erfasst wird (Harper et al., 2019b; Sales et al., 2019). Ushio et al. (2017) konnten in Wasser-eDNA, die in einem Wald in Japan gesammelt wurde, eine breite Palette an Arten nachweisen (z. B. Hirsche [*Cervus nippon*], Mäuse [*Mus musculus*], Wühlmäuse [*Myodes rufocanus*], Waschbären [*Procyon lotor*], Ratten [*Rattus norvegicus*] und Spitzmäuse [*Sorex unguiculatus*]).

Für den Nachweis von eDNA existiert für den Fischotter (*Lutra lutra*, Thomsen et al., 2012) ein artenspezifisches Testverfahren. Es gibt PCR-Primer für das Metabarcoding von Säugetierarten, die 12S und 16S verwenden (MiMammal, Ushio et al., 2017; 12S-V5, Kitano et al., 2007; Riaz et al., 2011), und sie wurden erfolgreich für den Nachweis von Säugetier-DNA in Wasser (z. B. Ushio et al., 2017; Harper et al., 2019b) und Sediment (Sales et al., 2019) eingesetzt.

3.2.4 Insekten

Wasserinsekten werden häufig verwendet, um die Wasserqualität in Flusssystemen zu bewerten, weshalb das Monitoring dieser Insekten per eDNA auf grosses Interesse stösst. Wasserinsekten – oder Gliederfüsser ganz allgemein – haben sehr vielfältige Lebenszyklen und sind aus taxonomischer Sicht sehr divers. Daher werden in vielen Biodiversitätsmonitoring-Programmen nur ausgewählte Gruppen eingesetzt (z. B. bestimmte Insektenordnungen). Die DNA-Quellen von Insekten (wie von anderen Wasserlebewesen) in der eDNA-Probe können stark variieren und u. a. Kot, Schleim und Gameten umfassen. Insbesondere in lotischen Systemen hat sich gezeigt, dass solche eDNA über grosse Distanzen befördert werden kann (z. B. Deiner & Altermatt, 2014), was einen Vergleich zu klassischen, oft punktuellen Probenahmen (Kicknetzprobenahmen) erschweren kann. Dies sowie eine relativ hohe Unsicherheit bei klassischen Probenahmeverfahren gestaltet Vergleiche mit eDNA-Proben schwierig. Viele Studien haben Wasser-eDNA analysiert, um Insek-

tengemeinschaften zu überwachen, doch die Ergebnisse herkömmlicher und molekularer Ansätze stimmten nicht immer überein (Fernández et al., 2018; Mächler et al., 2019). eDNA scheint sich zu eignen, um die Vielfalt von Insekten in grösseren Teileinzugsgebieten abzudecken (d. h. für Gamma-Diversitätsschätzungen), jedoch weniger für stark punktuelle Analysen (Deiner et al., 2016). Daher könnten die Informationen, die mit eDNA und mit herkömmlichen Methoden gewonnen wurden, eine unterschiedliche räumliche Inferenz aufweisen und nicht direkt vergleichbar sein, sondern sich eher ergänzen. Der grösste Vorteil von Untersuchungen der Insekten-eDNA besteht darin, dass Proben über ein viel grösseres taxonomisches Spektrum entnommen werden, was bei Ordnungen, die morphologisch schwer zu unterscheiden sind, wie beispielsweise den Fliegen (Diptera), eine bessere Auflösung ermöglicht.

Als Alternative zur Verwendung von Wasser-eDNA zur Untersuchung von Insekten kann DNA auch direkt aus den Organismen extrahiert werden, die in einer Kicknetzprobe gesammelt und als Bulk-DNA-Gewebeprobe konserviert wurden. Bulk-DNA liefert im Vergleich zu herkömmlichen Bewertungsverfahren der Wasserqualität kongruentere Ergebnisse (Elbrecht et al., 2017). In diesem Fall wird die Kicknetzprobenahme gemäss der Beschreibung des Moduls für Makroinvertebraten (BAFU, 2019a) durchgeführt, und die Proben werden in molekular reinem Ethanol direkt vor Ort konserviert. Eine Weiterverarbeitung dieser Proben erfolgt entweder anhand von zerkleinertem Gewebe oder von DNA, die aus dem Konservierungsmittel extrahiert wurde (Martins et al., 2019; Zizka et al., 2019). In beiden Fällen ist die Häufigkeit (Abundanz) der einzelnen Insektenarten anhand der Metabarcoding-Daten schwer zu erfassen, und meist kann nur die Artenvielfalt abgeschätzt werden (Beentjes et al., 2018; Buchner et al. 2019). Eine Bulk-DNA-Probenahme und die anschliessende DNA-Extraktion könnte zwar Datensätze erzeugen, die mit herkömmlichen Probenahmeverfahren besser vergleichbar sind, doch der Arbeitsaufwand und die invasive Probenahme bleiben unverändert. Dadurch würden einige Einschränkungen der herkömmlichen Ansätze auch in einem neuen Verfahren weiterbestehen (Blackman et al., 2019).

Die für Insekten empfohlene Barcoderegion ist noch in Diskussion. In der Regel verwendete Primer basieren auf

den Barcoderegionen 16S (Taberlet et al., 2018), 18S (Fernández et al., 2018) oder COI (z. B. Leray et al., 2013; Geller et al., 2013; Elbrecht & Leese, 2017; Wangenstein et al., 2018). Es herrscht noch keine Einigkeit über die spezifische Barcoderegion oder über die jeweils zu verwendenden Primer. Die Barcoderegion COI wird meist bevorzugt, weil sie in den DNA-Referenzdatenbanken, insbesondere für Mischproben, besser repräsentiert ist. Neue und spezifischere Insekten-Primer werden momentan entwickelt.

3.2.5 Krebstiere

Der Nachweis von Zehnfusskrebse (Crustacea, Decapoda) ist von besonderem Interesse (Krieg et al., 2019a), weil alle einheimischen Arten von verschiedenen invasiven Arten und deren Pathogenen bedroht sind. Diverse eDNA-Studien verwenden qPCR, um einzelne Krebsarten nachzuweisen, aber die Ergebnisse sind uneinheitlich. In Seen in den USA hat der eDNA-Nachweis von *Orconectes rusticus* eine gute Übereinstimmung mit herkömmlichen Probenahmeverfahren ergeben, aber es gab keine gute Korrelation zur relativen Häufigkeit (Dougherty et al., 2016). Andere Studien (z. B. zu *Procambarus clarkii*, Tréguier et al., 2014) resultierten in einer tiefen Übereinstimmung mit bewährten Ansätzen, insbesondere wenn die Dichten gering waren. Es gibt Testverfahren für den einheimischen Edelkrebs (*Astacus astacus*, Agersnap et al., 2017; Krieg et al., 2019a) und für zwei invasive Arten, den Signalkrebs (*Pacifastacus leniusculus*, Dunn et al., 2017; Mauvisseau et al., 2018; Krieg et al., 2019a) und den Roten Amerikanischen Sumpfkrebs (*Procambarus clarkii*, Tréguier et al., 2014; Geerts et al., 2018; Mauvisseau et al., 2018; Riascos et al., 2018). Unterschiede in der saisonalen Aktivität der Organismen scheinen beim eDNA-Nachweis von Krebstieren eine wichtige Rolle zu spielen (Krieg et al., 2019a). Artenspezifische Verfahren existieren auch für andere Krebstiere wie Flohkrebse und Wasserflöhe (Egan et al., 2013; Deiner & Altermatt, 2014; Mächler et al., 2014).

Artenspezifische Marker sind hauptsächlich auf die COI-Barcoderegion ausgelegt. Es wurden noch keine Metabarcoding-Primer veröffentlicht, die speziell für Krebstiere entwickelt und an ihnen getestet wurden. Die eDNA von Krebstieren kann aber mit COI-Primern nachgewiesen werden (z. B. Deiner et al., 2016; Blackman

et al., 2017; Fernández et al., 2019). Allerdings sind die Ergebnisse bisheriger eDNA-Studien zu Krebstieren nicht schlüssig, was allenfalls darauf hindeutet, dass Krebstiere relativ wenig DNA ins Wasser freisetzen.

3.2.6 Weichtiere

Im Gegensatz zu Krebstieren können Weichtiere im Wasser und im Sediment in der Regel leicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich scheiden Weichtiere grössere DNA-Mengen ins Wasser ab (z. B. durch Schleim und die Nahrungsaufnahme durch Filtrieren bei Muscheln). Viele Studien belegen die Eignung von eDNA für den Einzelartnachweis. Dieser Ansatz ist weitverbreitet, um die invasiven Wandermuscheln und Quaggamuscheln (*Dreissena polymorpha* und *D. rostriformis bugensis*) in den Vereinigten Staaten und in Europa nachzuweisen (Mahon et al., 2011; De Ventura et al., 2017; Gingera et al., 2017; Williams et al., 2017). Es liegen weitere eDNA-Testverfahren für invasive Arten wie *Potamopyrgus antipodarum* (Goldberg et al., 2013) und *Corbicula* sp. (Clusa et al., 2017; Cowart et al., 2018) vor, aber auch für bedrohte Weichtierarten wie die Grosse Flussmuschel (*Unio tumidus*, Deiner & Altermatt, 2014) oder die Flussperlmuschel (*Margaritifera margaritifera*, Stoeckle et al., 2016).

Spezifische Primer für Weichtiere basieren auf 16S (Klymus et al., 2017), aber Weichtierarten lassen sich auch über COI finden (Deiner et al., 2016; Fernández et al., 2018, 2019).

3.2.7 Wenigborster

Aquatische Wenigborster reagieren bekanntlich empfindlich auf Veränderungen der Umwelt und werden als Bioindikatoren für die ökologische Qualität des Sediments empfohlen. Allerdings wird ihr Einsatz in routinemässigem Biomonitoring dadurch erschwert, dass es Probleme bei der taxonomischen Identifizierung auf der Basis von morphologischen Merkmalen gibt. Jüngste Studien untersuchen die Möglichkeit, ihre taxonomische Zusammensetzung durch das Metabarcoding von Mischproben oder Sediment-eDNA zu analysieren. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass der auf Wenigborstern basierende Index der Sedimentqualität vergleichbar ist mit dem Index, der auf morphologischer Untersuchung basiert (siehe Kapitel 8.4.2).

3.2.8 Kieselalgen

Die Untersuchung von Gemeinschaften benthischer Kieselalgen mithilfe von eDNA ist in Europa relativ weit fortgeschritten, und das Hauptziel besteht in der Beurteilung der Wasserqualität in Fließgewässern (Kermarrec et al., 2014; Visco et al., 2015; Zimmerman et al., 2015; Apothéoz-Perret-Gentil et al., 2017; Vasselon et al., 2017a; Keck et al., 2018). Die Probenahme erfolgt gemäss dem Probenahmeverfahren beim herkömmlichen Kieselalgenmonitoring: Es wird ein repräsentativer Teilsatz von Steinen gesammelt, die ausreichend weit in das Wasser eingetaucht sind. Der Biofilm wird dann mit einer Einwegzahnbürste entfernt und in einer Pufferlösung gelagert. Die Kieselalgen-DNA wird also nicht aus dem Wasser entnommen (wie in den meisten vorherigen Beispielen), sondern aus dem Biofilm, der die Steine bedeckt und lebende Kieselalgen umfasst. In der Schweiz wird mithilfe der NAWA-Kampagnen (BAFU, 2013) sowie eines europäischen Projekts (SYNAQUA; siehe Kapitel 8.4.1; Lefrançois et al., 2017) momentan der Molekulare Diatomeen-Index Schweiz entwickelt.

Für die Bewertung von Kieselalgengemeinschaften werden zwei verschiedene Marker verwendet: die V4-Region der nuklearen 18S und das Chloroplasten-Gen *rbcl* (Visco et al., 2015; Vasselon et al., 2017a). Die meisten der in Europa häufigen Kieselalgenarten sind in der *rbcl*-Datenbank enthalten (Rimet et al., 2019).

3.2.9 Pathogene und Parasiten

Umfangreiche Arbeiten konzentrieren sich auf den Nachweis von Parasiten und Pathogenen aquatischer Organismen (mehrheitlich bei Fischen, Amphibien und Krebsen; Krieg et al., 2019b). Allerdings gestaltet sich der Nachweis dieser Parasiten und Pathogene mit herkömmlichen Verfahren sehr zeitintensiv. Daher werden eDNA-Verfahren als wertvolle Alternative betrachtet, vor allem, weil die meisten Parasiten sporenähnliche Fortpflanzungsstadien aufweisen, die direkt aus dem Wasser entnommen werden können (Bass et al., 2015). Um etwa die Proliferative Nierenkrankheit (PKD) nachzuweisen, mussten bisher Fische gefangen und seziiert werden, um den Parasiten zu finden. Die eDNA bietet sich als nichtinvasives Verfahren an, um das Pathogen ohne Entnahme des Wirts zu lokalisieren, und liefert sogar quantitative Schätzungen des Sporenvorkommens. Testverfahren für einzelne Arten wurden entwickelt, um Erreger aufzuspüren für PKD (Carraro et

al., 2018; Hutchins et al., 2018), Saprolegniose (Rocchi et al., 2016), Krebspest (Strand et al., 2014; Robinson et al., 2018) und Chytridiomykose (Kirshtein et al., 2007; Hyman & Collins, 2012). In der Schweiz wirken sich diese vier Krankheiten stark auf die Umwelt aus, und spezifische Verfahren werden momentan untersucht (Krieg et al., 2019b). Für Pilz- und Scheinpilzarten (Oomycetes) werden ITS oder 18S als Marker verwendet, während COI für die Nesseltierart *Tetracapsuloides bryosalmonae* (PKD-Erreger) zum Einsatz kommt.

3.2.10 Wasserpflanzen (Makrophyten und Phytoplankton)

In aquatischen Ökosystemen werden Pflanzen als eine weitere Gruppe von Lebewesen überwacht. Makrophyten werden sowohl in lenitischen als auch in lotischen Systemen überwacht, Phytoplankton nur in lenitischen Systemen. Obwohl beide Gruppen von allgemeinem Interesse sind, gibt es auch für die herkömmlichen Verfahren nur relativ wenige standardisierte Überwachungsinstrumente (Känel et al., 2017). Einige Studien entwickelten artenspezifische Primer für invasive Arten wie *Myrophyllum aquaticum* (Scriver et al., 2015), *Elodea densa* (Fujiwara et al., 2016), *E. canadensis* und *E. nuttallii* (Gantz et al., 2018) oder *Hydrilla verticillata* (Matsushashi et al., 2016; Gantz et al., 2018).

Makrophyten, und Pflanzen ganz allgemein, brauchen eine Kombination verschiedener Genregionen, um eine ausreichende taxonomische Auflösung sowohl auf höheren als auch auf niedrigeren taxonomischen Ebenen zu erlangen (Hollingsworth et al., 2011). Der Einsatz mehrerer Marker stellt jedoch eine Herausforderung für eDNA-Analysen dar oder ist gar unmöglich, weil verschiedene Markerregionen physisch nicht mehr einem einzelnen Organismus zugeordnet werden können. Trotzdem stellen *rbcl*, ITS2 (Fahner et al., 2016; Kuzmina et al., 2018) oder *trnL* (Taberlet et al., 2007) vielversprechende Regionen für Metabarcoding-Primer für Pflanzen dar, wobei die Artenauflösung beschränkt sein könnte. Alternativ könnten Barcoderegionen wie *matK* und *trnL* für artenspezifische Nachweise geeignet sein (z. B. Scriver et al., 2015; Matsushashi et al., 2016). Selten werden Analysen von Phytoplanktongemeinschaften mit eDNA durchgeführt, doch das Chloroplasten-Gen 23S scheint sich für die Beurteilung der Vielfalt zu eignen (Cannon et al., 2016; Craine et al., 2018).

Tabelle 3
Beispiele publizierter eDNA-Studien für ausgewählte taxonomische Gruppen

Taxon	Zielart oder -gruppe	Mögliche Anwendung	Methode	Referenzen
Amphibien	Nordamerikanischer Ochsenfrosch (<i>Rana catesbeiana</i>)	Nachweis gebietsfremder invasiver Arten	PCR	Ficetola et al., 2008
	Nördlicher Kammolch (<i>Triturus cristatus</i>)	Nachweis gefährdete Tierart	qPCR Metabarcoding	Rees et al., 2014b; Biggs et al., 2015; Harper et al., 2017, 2018; Buxton et al., 2018
	Teichmolch (<i>Lissotriton vulgaris</i>)	Nachweis gefährdete Tierart	qPCR Metabarcoding	Smart et al., 2015; Charvoz, 2019
	Feuersalamander (<i>Salamandra salamandra</i>)	Nachweis gefährdete Tierart	qPCR	Preissler et al., 2018
		Nachweis gesamte Vielfalt	Metabarcoding	Valentini et al., 2016
Fische	Schwarzmundgrundel (<i>Neogobius melanosomus</i>)	Nachweis gebietsfremder invasiver Arten	PCR qPCR	Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm, 2016; Nevers et al., 2018
	Europäischer Aal (<i>Anguilla anguilla</i>)	Nachweis gefährdete Tierart	qPCR	Seymour et al., 2018
	Silberkarpfen (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	Nachweis gebietsfremder invasiver Arten	qPCR	Amberg et al., 2015; Erickson et al., 2017
	Europäischer Schlammpeitzger (<i>Misgurnus fossilis</i>)	Nachweis gefährdete Tierart	qPCR	Sigsgaard et al., 2015
		Nachweis gesamte Vielfalt	Metabarcoding	Hänfling et al. 2016; Pont et al., 2018
Säugetiere	Fischotter (<i>Lutra lutra</i>)	Nachweis gefährdete Tierart	qPCR	Thomsen et al., 2012
		Nachweis gesamte Vielfalt	Metabarcoding	Harper et al., 2019b; Sales et al., 2019
Wasserinsekten	Asiatische Tigermücke und Asiatische Buschmücke (<i>Aedes albopictus</i> , <i>A. japonicus japonicus</i>)	Nachweis Krankheitsüber-träger	qPCR	Schneider et al., 2016
	Grosse Moosjungfer (<i>Leucorrhinia pectoralis</i>)	Nachweis gefährdete Tierart	qPCR	Thomsen et al., 2012
	Eintagsfliegen, Steinfliegen und Köcherfliegen	Nachweis gesamte Vielfalt	Metabarcoding	Hajibabaei et al., 2011; Mächler et al., 2019
	Zuckmücken	Nachweis gesamte Vielfalt	Metabarcoding	Carew et al., 2013; Bista et al., 2017
		Nachweis gesamte Vielfalt	Metabarcoding	Deiner et al., 2016; Fernández et al., 2018; Macher et al., 2018
		Biotischer Index	Metabarcoding	Elbrecht et al., 2017

Taxon	Zielart oder -gruppe	Mögliche Anwendung	Methode	Referenzen
Krebse	Amerikanischer Rostkreb <i>(Orconectes rusticus)</i>	Nachweis gebietsfremder invasiver Arten	qPCR	Dougherty et al., 2016
	Signalkreb <i>(Pacifastacus leniusculus)</i>	Nachweis gebietsfremder invasiver Arten	qPCR	Dunn et al., 2017; Mauvisseau et al., 2018
	Roter Amerikanischer Sumpfkreb <i>(Procambarus clarkii)</i>	Nachweis gebietsfremder invasiver Arten	qPCR	Tréguier et al., 2014; Riascos et al., 2018
	Edelkreb <i>(Astacus astacus)</i>	Nachweis gefährdete Tierart	qPCR	Agersnap et al., 2017
Weichtiere	Wandermuschel <i>(Dreissena polymorpha)</i> Quaggamuschel <i>(D. bugensis)</i>	Nachweis gebietsfremder invasiver Arten	PCR qPCR	Egan et al., 2015; De Ventura et al., 2017
	Neuseeländische Deckelschnecke <i>(Potamopyrgus antipodarum)</i>	Nachweis gebietsfremder invasiver Arten	PCR qPCR	Clusa et al., 2016; Goldberg et al., 2013
	Grobgerippte Körbchenmuschel <i>(Corbicula fluminea)</i>	Nachweis gebietsfremder invasiver Arten	PCR qPCR	Clusa et al., 2017; Cowart et al., 2018
	Chinesische Teichmuschel <i>(Sinanodonta woodiana)</i>	Nachweis gebietsfremder invasiver Arten	PCR	Clusa et al., 2017
		Nachweis gesamte Vielfalt	Metabarcoding	Klymus et al., 2017
Wenigborster		Nachweis gesamte Vielfalt	Metabarcoding	Weigand & Macher, 2018
	Aquatische Arten	Biotischer Index	Metabarcoding	Vivien et al., 2019
Kieselalgen	Benthische Arten in Flüssen und Bächen	Biotischer Index	Metabarcoding	Visco et al., 2015; Apothéloz-Perret-Gentil et al., 2017; Vasselon et al., 2017a
Pathogene und Parasiten	<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>	Nachweis PKD-Erreger	qPCR	Carraro et al., 2018; Hutchins et al., 2018
	<i>Saprolegnia parasitica</i>	Nachweis des Erregers von Süßwasser-Saprolegniose	qPCR	Rocchi et al., 2016
	<i>Aphanomyces astaci</i>	Nachweis Krebspesterreger	qPCR	Strand et al., 2014; Robinson et al., 2018
	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Nachweis Chytridiomykose-Erreger	qPCR	Kirshtein et al., 2007; Hyman & Collins, 2012
Wasserpflanzen	Wasserpest <i>(Elodea spp.)</i>	Nachweis gebietsfremder invasiver Arten	qPCR	Gantz et al., 2018
	Phytoplankton	Nachweis gesamte Vielfalt	Metabarcoding	Cannon et al., 2016; Craine et al., 2018

4 Probenahme für eDNA-Analyse

4.1 Arten von eDNA-Ausgangsmaterial

Die Wahl der zu verwendenden eDNA-Methode wird von der Art des Ökosystems und von der zu untersuchenden taxonomischen Gruppe bestimmt. Verschiedene Lebensräume und Taxa bedingen unterschiedliche Arten von Proben und unterschiedliche Protokolle (Tabelle 4). Es gibt insgesamt vier Arten von Umweltproben, in denen DNA für aquatisches Biomonitoring isoliert werden kann:

- Wasser (Kapitel 4.1.1)
- Sediment (Kapitel 4.1.2)
- Biofilm (Kapitel 4.1.3)
- Bulk-DNA (Mischprobe) (Kapitel 4.1.4)

Tabelle 4

Die (e)DNA-Quellen, klassifiziert nach taxonomischen Gruppen

Die bevorzugte Verwendung verschiedener Nachweisquellen wird mit den folgenden Kennzeichnungen angegeben: +++ bevorzugte Quelle, ++ gute Quelle, + mittelmässige Quelle und – keine ideale Quelle. Es gilt zu beachten, dass die Entwicklung neuer Methoden künftig zu einer Änderung dieser Interpretation führen kann. Daher sollte die aktuelle Literatur immer beigezogen werden.

Taxa	Wasser	Sediment	Biofilm	Mischprobe
Amphibien	+++	+	–	–
Fische	+++	+	–	–
Säugetiere	+++	+	–	–
Wasserinsekten	++	++	–	+++
Krebstiere	+	+	–	+++
Weichtiere	+++	+++	–	++
Wenigborster	+	++	–	+++
Kieselalgen	+	+	+++	–
Pathogene und Parasiten	+++	+	–	–
Makrophyten und Phytoplankton	+++	+	–	–

Nur die wichtigsten Bioindikator-Taxa werden hier aufgeführt. Im Anhang werden für einige dieser Gruppen detaillierte Protokolle und bewährte Praktiken bereitge-

stellt. eDNA kann allerdings auch verwendet werden, um eine grössere Vielfalt von Meiofauna, Zooplankton, Pilzen und verschiedenen Mikroorganismen zu analysieren. So könnte eDNA etwa eingesetzt werden, um die Vielfalt und die Zusammensetzung von Protisten wie Wimper- oder Rädertierchen zu beurteilen. Sie können sehr gute Indikatoren für den ökologischen Zustand eines Systems sein, werden jedoch wegen fehlender Erfahrung und verfügbarer Methoden beim herkömmlichen Biomonitoring nicht oder kaum eingesetzt. Einige dieser Organismengruppen könnten spezifische Protokolle bedingen, die in diesem Dokument nicht enthalten sind, aber die allgemeinen Grundsätze werden ähnlich sein.

4.1.1 eDNA im Wasser

Es werden zwei gängige Verfahren genutzt, um eDNA aus Wasserproben zu gewinnen:

- Filtration
- Ausfällen

Häufig wird die Filtration gegenüber dem Ausfällen bevorzugt, weil grössere Wassermengen verarbeitet werden können. Es gibt allerdings einige Situationen, in denen sich das Ausfällen besser eignen kann.

Filtration

Bei der Filtration sammelt sich die DNA auf der Filtermatrix an. Dabei handelt es sich hauptsächlich um DNA, die sich noch in Zellen oder Organellen befindet oder die an Partikeln gebunden ist. Bisher wurden verschiedene Filtrationsmethoden publiziert, wobei keine einheitliche beste Methode bestimmt wurde. Die Methoden unterscheiden sich durch Filtermaterial und -verfahren. Bei der Vorbereitung eines Filtrationsverfahrens stellen sich insbesondere folgende Fragen:

- Welche Art der Filterausrüstung ist zu verwenden?

Es gibt verschiedene Arten von Filtrationsverfahren, einschliesslich der manuellen Filtration und der Filtration mit einer Schlauch- oder Vakuumpumpe (Abb. 5). Die manuelle Filtration benötigt einen minimalen Materialeinsatz

Abbildung 5

Drei Filtrationsarten, um eDNA aus dem Wasser zu gewinnen

Eine direkt auf einer Spritze aufgesteckte Filterkapsel (links), eine peristaltische Pumpe (Mitte) und eine Vakuumpumpe (rechts).

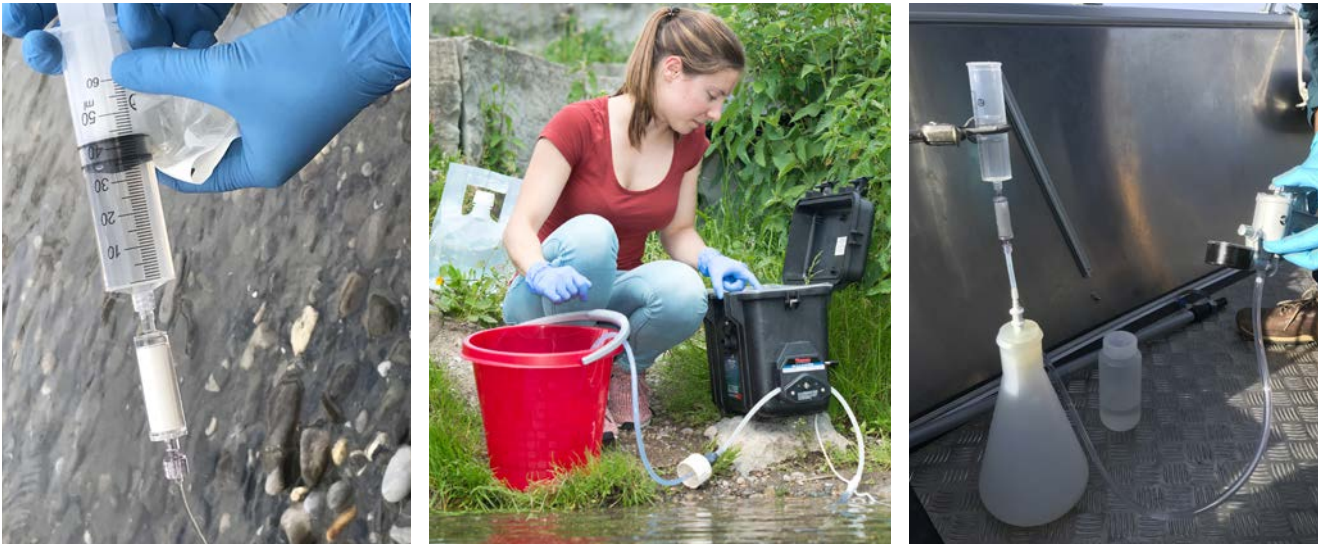


Foto Mitte: Eawag, Peter Penicka

(eine Spritze und einen Filter). Sie ist daher auch an abgelegenen Probenahmestellen einfach durchzuführen. Das einfachste Filtrationsverfahren erfolgt mit Einwegspritzen (in der Regel 50- oder 100-ml-Spritzen) und entsprechenden Filtern. Allerdings erfordert es je nach Porengröße und im Gewässer vorhandenen Schwebstoffen einiges an Muskelkraft. Für die Filtration können Kartuschenpressen eingesetzt werden. Alternativ wird bei der Filtration grösserer Volumen (d. h. von mehreren Litern) häufig eine peristaltische Pumpe verwendet. Diese Filtration braucht weniger Muskelkraft, dafür wird die Pumpe meist mit einer Autobatterie betrieben, die nur schwer an abgelegene Orte transportiert werden kann. Zwischen den Probenahmestellen müssen alle Schläuche dieser Pumpen ersetzt werden, um Kreuzkontaminierungen zu reduzieren. Schliesslich können für die Filtration kleiner bis grosser Volumen auch Vakuumpumpen eingesetzt werden. Sie sind effizient, erfordern jedoch eine komplexere Ausrüstung. Ausserdem müssen Schläuche und Filtertassen zwischen den Probenahmestellen ausgetauscht werden. Vakuumpumpen können sowohl im Labor als auch im Feld eingesetzt werden.

- Welche Filterporengröße eignet sich am besten?
- Wird die Verwendung von gekapselten oder offenen Filtern empfohlen?

Am häufigsten werden Membranfilter gewählt, und die spezifischen Produkte widerspiegeln die im Handel erhältlichen Typen. eDNA-spezifische Filter werden momentan entwickelt. Die Porengröße eines Filters kann bestimmen, welche Art von eDNA gesammelt wird. In eDNA-Studien werden meist Porengrößen zwischen 0,22 und 0,6 μm verwendet. Werden kleinere Porengrößen eingesetzt (z. B. 0,22 μm) können die meisten Zellen und Organellen eingefangen werden. Diese Grösse wird in der Regel für den DNA-Nachweis von Mikroorganismen verwendet. Bei kleineren Porengrößen ergibt sich jedoch ein Abstrich hinsichtlich der Wassermenge, die filtriert werden kann, bis der Filter verstopft. Dies kann teilweise durch die Nutzung von Filtern mit einem grösseren Durchmesser behoben werden. Kontaminationsprobleme treten häufig auf bei Filtern, die offen sind und die in ein spezifisches Filtersystem (Filterkapsel) eingesetzt werden müssen. Momentan wird die Verwendung von schon herstellerseitig gekapselten Filtern wie Sterivex® oder analogen Produkten wegen der einfachen Handhabung und des geringen Kontaminationsrisikos bevorzugt.

- Sollte der Filtrationsvorgang im Feld oder im Labor erfolgen?

Im Allgemeinen kann im Feld oder im Labor filtriert werden. Die Filtration im Feld ist das Risiko einer Kreuzkontamination tiefer und der Transport der Proben ist einfacher (auf <5 °C gekühlt für einige Stunden oder in einer Longmire-Gewebepufferlösung gelagert). Bei der Filtration im Labor können grosse Volumen verarbeitet werden (insbesondere bei Filtrationsverfahren, die Elektropumpen erfordern), er ist aber nur umsetzbar, wenn die Laboreinrichtungen innert kurzer Zeit erreicht werden können (höchstens in wenigen Stunden), um den Abbau der makrobiellen eDNA oder Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaften zu vermeiden. Bei der Filtration im Labor ist auch grössere Vorsicht gefragt, da alle Proben am selben Ort bearbeitet werden und es zusätzliche Vorkehrungen braucht, um Kreuzkontaminationen zu verhindern.

- Wie viel Wasser muss für die Filtration gesammelt werden?

Allgemein gilt: Je mehr Wasser entnommen wird, desto wahrscheinlicher ist es, eine Art nachzuweisen. Allerdings steigt mit dem filtrierten Wasservolumen auch die Menge an möglicher PCR-Inhibitoren, und die Filtration grossen Volumens stellt eine logistische Herausforderung dar. Daher ist die Entscheidung über das Filtrationsvolumen pragmatischer Natur und ist auch abhängig vom beprobten Lebensraum.

Bei Bächen wird Wasser am besten an verschiedenen Orten vom Ufer aus entnommen. Die meisten Studien, die eDNA aus Bächen filtrierten, haben zwischen 0,5 und 2 Liter Wasser entnommen. Dies ist häufig ausreichend, um grosse Teile der Diversität abzudecken. Bei Flüssen und Seen und insbesondere, um seltene Arten nachzuweisen, werden oft zwischen 1 und 100 Liter pro Ort filtriert. Allerdings können so grosse Mengen nur mit peristaltischen Pumpen gesammelt werden und nicht mit einer spritzenbasierten Filtration. In Gewässern gemässigter Klimazonen, scheint die gängige Praxis, rund 2 Liter verschiedener Teilproben eines bestimmten Ortes zu filtrieren, eine gute Lösung zu sein.

Ausfällen

Während die Filtration dem Ausfällen häufig vorgezogen wird, weil grössere Volumen verarbeitet werden können und im Feld nicht mit Chemikalien hantiert werden muss, werden alle Filtrationsverfahren von Schwebstoffen beeinträchtigt, was beim Ausfällen weniger zum Tragen kommt. Daher kann das Ausfällen in einigen Fällen sinnvoller sein, da sich Schwebstoffe dabei nicht auf die Extraktion auswirken. Beim Ausfällen wird grundsätzlich ein Salz-Ethanol-Gemisch verwendet, um die im Wasser enthaltene DNA/RNA auszufällen. Dieses Gemisch wird anschliessend zentrifugiert, um die DNA in einem Pellet zu sammeln. Da die meisten Zentrifugen auf kleine Röhrchen ausgelegt sind, ist das Ausfällen häufig auf ein Gesamtvolumen von 50 ml beschränkt. Diese Beschränkung kann umgangen werden, indem mehrere Proben gesammelt werden, es ist jedoch umständlich grosse Volumen zu sammeln, und das Verfahren stellt (ausser bei Teichen) momentan nicht die Methode der Wahl dar.

Ausfällen wird vor allem für den Nachweis von Amphibien in Teichen verwendet. Biggs et al. (2015) haben gezeigt, dass es 20 Teilproben von 30 ml braucht, um für den Nördlichen Kammmolch eine Nachweisrate von annähernd 100 % in Teichen zu erreichen. Natural England empfiehlt eDNA-Sammeln, für den Nördlichen Kammmolch 20×30 ml zu sammeln, die Teilproben zu vermischen und davon 6×15 ml zu verwenden (dies wird für Teiche mit einer Grösse von rund 1 ha empfohlen). In der Schweiz wird das eDNA-Metabarcoding von Amphibien mit ausgefallter eDNA gewerblich angeboten (siehe Holderegger et al., 2019). Die empfohlene Anzahl Proben steigt mit der Teichgrösse. Die Anzahl 50-ml-Proben beträgt 3 bis 5 für Teiche < 50 m², 6 bis 10 für Teiche von 50 bis 500 m² und 10 bis 20 für Teiche > 500 m². Alle Teilproben werden vermischt und letztlich werden 3×15 ml dieser Mischung für das Ausfällen verwendet. Allerdings raten andere Autoren dazu, weniger Teilproben zu entnehmen, dafür ein grösseres Volumen pro Probe (siehe Hänfling et al., 2016).

4.1.2 eDNA im Sediment

Komplexe organische und anorganische Partikel im Sediment können DNA binden und stabilisieren. Daraus resultiert eine längere Konservierungsdauer von DNA im Sediment im Vergleich zu DNA im Wasser. Indem ein Sedimentkern als Probe genommen wird, kann ein Blick in die

Vergangenheit geworfen werden. Darin ist die DNA aus Jahrhunderten bis Jahrtausenden archiviert (Monchamp et al., 2018).

Die Probenahme im Sediment erfolgt vorzugsweise in tiefen Seen, wo sich die Sedimente ablagern können und nicht ständig aufgewirbelt werden. Allerdings kann Sediment-eDNA auch als wichtige Informationsquelle zur taxonomischen Zusammensetzung von Meiofauna (Nematoden, Wenigborster) und Protisten (z. B. Wimperntierchen) dienen, die als Bioindikatoren für organische Anreicherung und andere Umweltauswirkungen in grossen Flüssen oder Seen eingesetzt werden.

Das Probematerial, das für das Sammeln von Sediment-eDNA verwendet wird, hängt von der Tiefe und der Zugänglichkeit der Probenahmestellen ab (Abb. 6). Sedimentprobenahmen in tiefen Seen erfolgen in der Regel mit schwerem Gerät wie Bohrern oder Bodengreifern. Ufersedimentproben können mit Einwegspatellöffeln oder mit einer Spritze mit abgeschnittener Spitze entnommen werden. Letztere Methode erlaubt genaue volumetrische Proben von Sedimentschichten.

Abbildung 6

Kernproben von ufernahen Stellen können mit einer Einwegspritze, bei der die Spitze abgeschnitten wurde, entnommen werden



Das Volumen der Sedimentproben hängt vom Extraktionsverfahren ab. Die kommerziellen Kits sind auf höchstens 5 bis 10 g Sediment abgestimmt. Die meisten verfügbaren Sediment- oder Bodenkits sind auf Mikroorganismen ausgelegt und können nur 0,2- bis 0,5-g-Proben verarbeiten. Die manuelle Verarbeitung von Sedimentproben ist auch durch die Grösse der Zentrifugenröhrchen beschränkt. Die Konservierung von Sedimentproben in Ethanol vor der DNA-Extraktion ist ebenfalls möglich und wird in mikrobiellen Analysen oft verwendet (Lanzén et al., 2017). Die einfachste Methode besteht jedoch darin, Sedimentproben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu lagern.

4.1.3 eDNA im Biofilm

Bakterien und einzellige Algen bilden auf der Oberfläche von Steinen einen epilithischen Biofilm. Diese Biofilme stehen in direkter Berührung mit dem Wasser, weshalb die biofilmbildende Gemeinschaft direkt auf Veränderungen der Wasserqualität reagiert. Im Vergleich zum Sediment verbleibt nur ein kleiner Anteil toter Organismen am Ort, der grösste Teil wird mit der Wasserströmung weggespült. Momentan werden Biofilmproben vor allem verwendet, um Kieselalgen in Fließgewässern nachzuweisen und so den biologischen Qualitätsindex zu erschliessen. Die Methodik für die Biofilm-Probenahme für Kieselalgen wird im Kieselalgenmodul für die Bioindikation von Bächen (Hürliemann & Niederhauser, 2007) ausgeführt und im Fallbeispiel für Kieselalgen (Kapitel 8.4.1) zusammengefasst. Diese Methode ist standardisiert und wird auch in anderen europäischen Ländern verwendet und anerkannt.

4.1.4 Bulk-DNA (Mischprobe) von Makroinvertebraten

Eine Mischprobenahme beinhaltet eine Probenahme nach einem herkömmlichen Verfahren (z. B. eine Kicknetzprobe für Makroinvertebraten gemäss dem relevanten Modul-Stufen-Konzept, Stucki, 2010; BAFU, 2019a) und die anschliessende DNA-Extraktion aus den homogenisierten Proben oder dem absoluten Ethanol molekularbiologischer Qualität, das zur Konservierung der Probe verwendet wird. Dieser Ansatz wurde insbesondere für Makroinvertebraten und vor allem für Wasserinsekten verwendet. Der Vorteil einer Untersuchung von Bulk-DNA ist die ziemlich exakte räumliche Abdeckung und die geringere Interferenz mit chemischen oder physikalischen Eigenschaften der beprobten Umgebung. Nachteilig ist, dass das Probenahmeverfahren (Sammeln und Vorsortierung

von Wirbellosen) nicht automatisiert werden kann, zeitaufwendig ist und dieselben Beschränkungen hinsichtlich Spezifität und Wiederholbarkeit wie das herkömmliche Probenahmeverfahren aufweist (Blackman et al., 2019).

DNA kann auf zwei verschiedene Arten aus einer Mischprobe gewonnen werden. Die DNA wird entweder direkt aus dem Gewebe der Individuen gewonnen oder sie wird aus der Konservierungslösung (Ethanol) der Probe extrahiert. Die Extraktion aus Gewebe bedingt eine Aussortierung der Individuen aus der Gesamtprobe, was zeitintensiv sein und Fehler induzieren kann, weil einige kleine Exemplare oder Larvenstadien übersehen werden. Anschliessend müssen die Gewebe der Individuen getrocknet und homogenisiert werden, bevor die DNA aus diesem Gewebemix extrahiert wird.

Die Extraktion von DNA aus der Konservierungslösung ist direkter und basiert auf der Tatsache, dass die im Ethanol gelagerten Exemplare ihre DNA in das Ethanol abgeben und die DNA anschliessend durch Filtration oder Ausfällen gesammelt werden kann. Dieser Ansatz ist relativ neu und vielversprechend, aber es gibt noch nicht viele wissenschaftliche Ergebnisse (Zizka et al., 2019). Bisher haben die meisten Studien absolutes Ethanol in Konzentrationen von 80 % oder höher verwendet, um die Proben einige Wochen vor der Filtration zu lagern. Eine Lagerung in Formaldehyd oder in Farbstoffen wie Bengalrosa ist zu vermeiden, da sie mit der routinemässigen Weiterverarbeitung interferieren und diese behindern, obwohl eine rasche Fixierung in Formalin vor der Sortierung der Exemplare bei Wenigborstern möglich war (Vivien et al., 2016). Der Erhalt ganzer Individuen für weitere morphologische Analysen und das Auslassen eines ersten Sortierungsschritts stellen die wichtigsten Vorteile für die Verwendung von Konservierungsstoffen als DNA-Quelle für Metabarcoding-Analysen dar.

4.2 Vorsichtsmassnahmen für den Umgang mit eDNA-Proben

Labormethoden für den Nachweis von eDNA sind dahingehend optimiert, um geringe Spuren von DNA zu identifizieren, weshalb diese Verfahren extrem kontaminationsanfällig sind. Fachpersonen müssen sich dieses Risikos bewusst sein und verschiedene Massnahmen bei diversen Probe-

nahmeschritten einhalten, um die Wahrscheinlichkeit einer Verunreinigung der Proben zu minimieren (Abb. 7).

Material

Als allgemeiner Grundsatz müssen jegliches Material und jegliche Ausrüstung, die in Kontakt mit der eDNA-Probe kommen, entweder Einwegmaterial sein oder von jeglichen DNA-Spuren gesäubert werden. Idealerweise werden während der Probenahme Einweghandschuhe getragen. Dies verhindert nicht nur eine Kontamination mit menschlicher DNA, die möglicherweise mit dem Sequenzierungoutput interferiert und diesen dominieren könnte, sondern reduziert auch eine Kreuzkontaminierung zwischen den Probenahmestellen.

Empfohlen werden versiegelte Instrumente für den einmaligen Gebrauch (wie Spritzen oder Einwegspatellöffel), die an einer bestimmten Probenahmestelle geöffnet und verwendet werden. Allerdings könnten einige Instrumente für den einmaligen Gebrauch zu teuer sein, weshalb sie an mehreren Stellen wiederverwendet werden müssen. Mehrwegmaterial muss zwischen den verschiedenen Probenahmestellen gereinigt werden, am besten mit Natriumhypochlorit (Chlorbleiche, 5- bis 10%ige Lösung). Grössere Chlorbleichemengen sollten aber im Feld nicht verwendet werden. Kommerzielle Produkte wie «DNA away» oder «DNA-Exitus Plus» sind Dekontaminationslösungen, die im Feld sicher eingesetzt werden können; sie sind aber teurer. Für eine Dekontamination reicht ein Spülen mit Ethanol oder Wasser nicht aus (auch nicht mit deionisiertem Wasser). Einige Kreuzkontaminierungen könnten damit allenfalls reduziert werden, weil sie verdünnt werden, aber DNA wird auf diese Weise nicht abgebaut. Es wird jedoch empfohlen, die gereinigte Ausrüstung mit ddH₂O zu spülen, bevor eDNA-Proben gesammelt werden, um jegliche Rückstände von Chlorbleiche oder Reinigungsmitteln zu beseitigen.

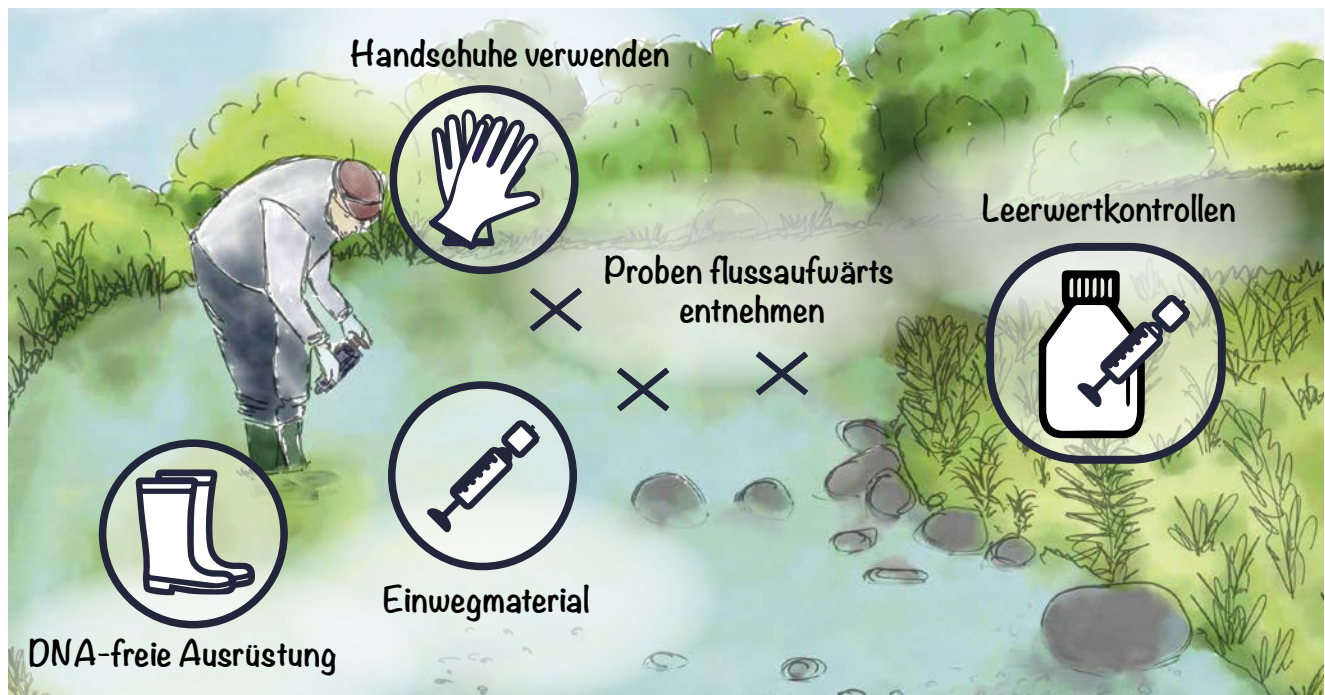
Kontrollen

Die grösste Herausforderung aller eDNA-Studien sind falsch-positive und falsch-negative Datensätze. Falsch-positiv bedeutet der Nachweis eines eDNA-Signals ohne Vorhandensein des Organismus und/oder seiner DNA in der Umwelt. Bei einem falsch-negativen Datensatz fehlt das eDNA-Signal, obwohl der Organismus und/oder seine DNA in der Umwelt vorhanden ist. Falsch-positive Ergebnisse können auf Verunreinigungen bei der Probe-

Abbildung 7

Massnahmen zur Vermeidung einer Kontamination bei der Probenahme

Jegliche Ausrüstung muss von DNA gesäubert werden. Um Verunreinigungen zu verhindern, sind Einweghandschuhe und -instrumente zu verwenden. Mit Leerwertkontrollproben können mögliche Kontaminationen aufgedeckt werden.



nahme, bei der Extraktion und beim Sequenzierungsschritt zurückzuführen sein. Falsch-negative Ergebnisse können aus Mängeln bei der Extraktion, bei der PCR oder bei den Sequenzierungsschritten oder aber auch durch die Teilprobenahme resultieren. Um falsch-positive/falsch-negative Ergebnisse auszuschliessen oder wenigstens zu wissen, dass sie vorhanden sind, stellen Kontrollen und Replikation einen wichtigen Teil aller eDNA-Studien dar.

Kontrollen erlauben die Identifikation von Verunreinigungen und sollten in sämtliche Schritte der Probenahme und der Analyse integriert werden. Dies ist insbesondere erforderlich, wenn Ausrüstung, die eng mit der Probe in Kontakt kommt (z. B. Filtergehäuse, Silikonschläuche) wiederverwendet wird. Bei eDNA-Probenahmen im Wasser stellt die Verwendung einer Leerwertkontrolle mit DNA-freiem Wasser, z. B. mit Reinstwasser, das mit UV-Licht behandelt wurde, ein bewährtes Vorgehen dar. In Laboratorien ausserhalb des akademischen Umfelds ist eine effiziente UV-Ausrüstung kaum verfügbar, weshalb die Verwendung von im Handel erhältlichem Mineral- oder deionisiertem

Wasser als vereinfachte Negativkontrolle zulässig ist. Die Kontrollen sollten mindestens zu Beginn und am Ende jeder eDNA-Probenahmekampagne durchgeführt werden. Dies würde etwa die Filtration von DNA-freiem Wasser im Feld (an einer Probenahmestelle) am Beginn und am Ende jedes Probenahmetages einschliessen. Als Mindeststandard können Negativkontrollen beim ersten Schritt gesammelt werden und zusammen mit den Feldproben für den gesamten Arbeitsprozess verarbeitet werden. Wichtig ist, dass die Kontrollen nach demselben Protokoll wie die echten Proben entnommen werden müssen, abgesehen davon, dass das filtrierte (oder ausgefällte) Wasser keine DNA enthält und keine Umwelt-Wasserprobe ist. Die Negativkontrolle sollte anschliessend gemäss demselben Verfahren wie die anderen Proben verarbeitet werden. Normalerweise werden bei Probenahmen im Sediment oder bei Biofilm keine Kontrollen durchgeführt.

Probenahmeplan

Feldarbeit erfordert einiges an Planung, insbesondere wenn gleichzeitig mehrere Standorte abgedeckt werden. Idealer-

weise sollte das Gewässer selbst während der Probenahme nicht betreten werden. Sollte dies jedoch nicht möglich sein, sind zwei Punkte zu beachten. Erstens muss sämtliches Material (Wattstiefel usw.), das in Kontakt mit der beprobten Umgebung steht, wie oben beschrieben gereinigt werden. Zweitens sollte die Probenahme so durchgeführt werden, dass Kontaminationen minimiert werden. In Flüssen sollten die Probenahmestellen in flussaufwärts gerichteter Reihenfolge besucht werden. Dabei wird mit der Stelle am untersten Punkt des Einzugsgebiets begonnen, um eine Mobilisierung von DNA weiter oben im Einzugsgebiet zu vermeiden. Ähnlich sollten Proben in Strömungsrichtung flussaufwärts der Person genommen werden, die im oder nahe am Wasser steht, sodass das entnommene Wasser nicht mit der Person oder der Ausrüstung in Kontakt war bzw. nicht an ihr vorbeigeströmt ist.

4.3 Weitere technische Fragen im Zusammenhang mit eDNA-Probenahmen

- Wie viele eDNA-Replikate sind zu entnehmen?

Um die Verlässlichkeit von eDNA-Daten zu gewährleisten, werden in der Regel mehrere Replikate verwendet. Wenn etwa eine Art in mehreren Replikaten nachgewiesen wird, ist es wahrscheinlicher, dass diese Art in der Umwelt effektiv vorkommt und dass es sich nicht um ein falsch-positives Ergebnis handelt. Um statistisch gültig zu sein, sollte eine Probenahmekampagne daher mehrere unabhängige Replikate pro Probenahmestelle umfassen. eDNA-Studien haben gezeigt, dass es für eine zutreffende Interpretation ein gewisses Replikationsniveau braucht (z.B. Mächler et al., 2019). Allerdings ist die Durchführung einer Replikation zeit- und kostenintensiv, und das Kosten-Nutzen-Verhältnis muss stimmen. In vielen Fällen werden als minimales Replikationsniveau drei unabhängige Replikate pro Probenahmestelle verwendet. An Stellen mit äusserst ungleichmässigen eDNA-Verteilungen, z. B. in Teichen, oder in sehr grossen Gewässern wie Seen braucht es mehr Teilproben und Replikate. Die Anzahl Replikate kann also vom Ziel der Studie abhängig sein (Erhebung einer Gemeinschaft oder Nachweis seltener Arten). Die Replikation auf Ebene der Probenahme kann entweder durch ein Zusammenführen vor der DNA-Extraktion (normalerweise günstiger, aber weniger empfehlenswert) oder

durch ein Zusammenführen, das erst nach der Sequenzierung erfolgt, geschehen, damit alle Replikate unabhängig (in beliebiger Reihenfolge) sequenziert werden. Letzteres Vorgehen wird empfohlen und erlaubt eine Schätzung der Nachweisgrenzen auf Basis der einzelnen Proben.

- Wie werden eDNA-Proben am besten transportiert und gelagert?

Bei einer unsachgemässen Lagerung kann eDNA in Wasserproben oder auf Filtern infolge mikrobieller Aktivität relativ rasch abgebaut werden. Daher besteht das beste Vorgehen darin, die DNA unmittelbar nach der Probenahme zu extrahieren. Allerdings ist das nicht immer möglich, weshalb Proben transportiert und häufig länger gelagert werden müssen. Die Proben sind in Kühlbehältern zu transportieren, und die eDNA-Proben sollten keinen hohen Temperaturen ausgesetzt sein (z. B. in einem Auto im Sommer). Für Filter, ausgefalltes Wasser, Sediment und sogar für das Wasser selbst ist ein Tiefkühlen bei -20 °C optimal. Es braucht eine konstante tiefe Temperatur. Ein Auftauen und ein erneutes Einfrieren sind strikt zu vermeiden. Wenn die Probe direkt in ein Konservierungsmittel oder einen Puffer gegeben wird (wie z. B. bei Biofilmen oder Mischproben), kann die Probe längere Zeit bei 5 °C transportiert und gelagert werden oder sogar bei (höchstens) Zimmertemperatur, da der Puffer/das Konservierungsmittel die DNA stabilisiert. Es wird trotzdem immer empfohlen, diese Proben zumindest im Kühlschrank oder in einem Kühlraum zu lagern, um den Prozess des DNA-Abbaus zu verlangsamen. Filter können mit Silikagel und einem Exsikkator getrocknet werden, allerdings wurde dieses Vorgehen noch nicht ausreichend getestet.

- Wann und wo sollten Proben entnommen werden?

Die beprobten Mikrohabitate sollten nach dem bevorzugten Habitat der Art gewählt werden. So sollte eDNA an der Sohle entnommen werden statt an der Oberfläche, wenn die Nachweisbarkeit von benthischen Arten maximiert werden soll (Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm, 2016). Probenahmen während der Winterruhe und in inaktiven Phasen sind ungünstig (z. B. während des Winterschlafs von Zielorganismen, De Souza et al., 2016).

5 Molekularlabor

Bei der Analyse von eDNA-Proben werden geringe bis sehr geringe DNA-Mengen untersucht. Um falsche Resultate infolge Verunreinigungen zu vermeiden, müssen alle Laborarbeiten anhand strenger Protokolle und Verfahren durchgeführt werden. In diesem Kapitel werden das Vor-

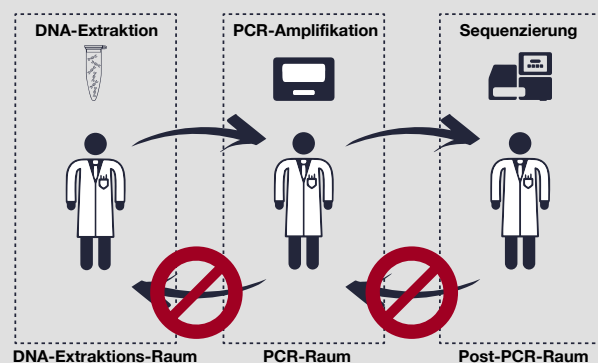
gehen und die einzelnen Schritte im Labor beschrieben. Die Arbeiten müssen in einer Laborumgebung erfolgen, die spezifisch auf das Arbeiten mit eDNA ausgelegt ist (Abb. 9), und mit geeigneten Negativ- und Positivkontrollen ergänzt werden. Die empfohlenen Vorgehenswei-

Wichtige Vorkehrungen für die Arbeit im Naslabor

Abbildung 8

Für alle Laborschritte muss ein Arbeitsfluss in einer Richtung bestehen

Die DNA-Extraktion muss physisch getrennt von allen nachfolgenden Schritten erfolgen. Weder Material noch Personen dürfen sich in die entgegengesetzte Richtung bewegen.



Dedizierter Post-PCR-Raum

Da die DNA-Konzentration in einer Probe – insbesondere in Wasserproben – sehr gering sein kann, braucht es höchste Aufmerksamkeit, um Verunreinigungen zu vermeiden. Zusätzlich zu den allgemein bewährten Praktiken (vorsichtig arbeiten, Labormantel tragen) sind bei der Arbeit mit eDNA einige besondere Vorkehrungen zu treffen. Am wichtigsten ist, dass die Prä-PCR-Arbeit und sämtliche damit verbundene Ausrüstung physisch von der Post-PCR-Arbeit getrennt sind. Daher müssen die DNA-Extraktion und die Vorbereitung der PCR in Räumen erfolgen, die vom Post-PCR-Prozess getrennt sind. PCR-Maschinen sind entweder im Post-PCR-Raum oder in einem dedizierten Raum zu platzieren.

Arbeitsfluss in einer Richtung

Ein Arbeitsfluss in einer Richtung von einer geringen zu einer hohen DNA-Konzentration sollte eingehalten werden, um die Kontamination mit amplifizierter DNA aus vorherigen Testverfahren zu reduzieren (Abb. 8). Diese Regel gilt für Menschen und Material. Daher muss das Laborpersonal es absolut vermeiden, an einem Tag von Räumlichkeiten mit hoher DNA-Konzentration zu solchen mit geringen DNA-Konzentrationen zu wechseln. Nach Arbeiten im Post-PCR-Prozess darf am selben Tag nicht wieder im Extraktionsraum gearbeitet werden. Auch dürfen keine PCR-Produkte in die Prä-PCR-Labors gebracht werden (auch nicht für eine PCR-Positivkontrolle). Idealerweise gibt es zwei Prä-PCR-eDNA-Räume, um Arbeiten mit «hohen» oder «tiefen» DNA-Konzentrationen zu trennen (z. B. Trennen von Bulk-Extraktionen aus Wasser- und Sedimentproben).

Einwegmaterial

Jegliches Verbrauchsmaterial, das in den verschiedenen Schritten verwendet wird, darf nur für eine bestimmte Anwendung eingesetzt werden. Eine der häufigsten Kontaminationsquellen sind die Mikropipetten. Es ist daher sehr wichtig, über mindestens ein Pipettenset für jeden Raum zu verfügen («tiefe DNA»-Extraktion, «hohe DNA»-Extraktion, Vorbereitung der PCR, spezifische Pipette, um DNA zu den PCR-Reaktionen hinzuzufügen) und in allen Prozessschritten Filterspitzen zu verwenden. Die gleiche Regel gilt für die Ausrüstung, die anwendungsspezifisch sein muss (z. B. Zentrifuge, Halter für Zentrifugenröhrchen und Kühlschrank). Negativkontrollen beim Prä-PCR-Schritt, insbesondere während der PCR-Amplifikation, sind erforderlich, um geeignetes Material und eine passende Verarbeitung zu gewährleisten. Wichtig: Jegliches Material, die ganze Ausrüstung und sämtliche Arbeitsplätze müssen nach der Laborarbeit mit UV-Licht oder Chlorbleiche dekontaminiert werden.

Abbildung 9

Reinlabor für die Extraktion von eDNA

Das Reinlabor (links) muss physisch von Räumen getrennt sein, in denen Post-PCR-Produkte verarbeitet werden. Es sollte einen Luftüberdruck aufweisen, Wände und Möbel müssen regelmässig gereinigt werden, und der Zugang ist geschultem Personal vorbehalten. Arbeiten im Labor (rechts) erfolgen mit Laborschutzkleidung und unter sterilen Bedingungen, um Verunreinigungen der Proben zu verhindern.



Fotos: Eawag, Roman Alther

sen umfassen eine Trennung der Schritte, die der PCR vor- und nachgelagert sind (eDNA-Extraktion und PCR müssen in separaten Räumen mit einem Arbeitsfluss in einer Richtung durchgeführt werden), sowie das Tragen von Schutzkleidung und -ausrüstung (Sterilbank). Die Laborinfrastruktur und -ausrüstung müssen auf die spezifischen Arbeitsschritte ausgelegt sein und bedingen ein vordefiniertes Reinigungsverfahren. Idealerweise verfügt das Reinlabor über einen Luftüberdruck, um Kontaminationen zu reduzieren.

5.1 Allgemeiner Ablauf

Die Standard-eDNA-Untersuchung besteht aus verschiedenen Verarbeitungsschritten, um Erbinformation von Organismen oder ihren DNA-Spuren in Umweltproben (Wasser, Sediment, Biofilm) oder Mischproben zu erhalten.

Die Verarbeitung von eDNA-Proben kann in drei Schritten im Nasslabor unterteilt werden:

1. **DNA-Extraktion:** Die DNA-Moleküle (extrazelluläre DNA und DNA lebender Organismen, aus ihren Zellen und Organellen) werden aus Umweltproben isoliert.

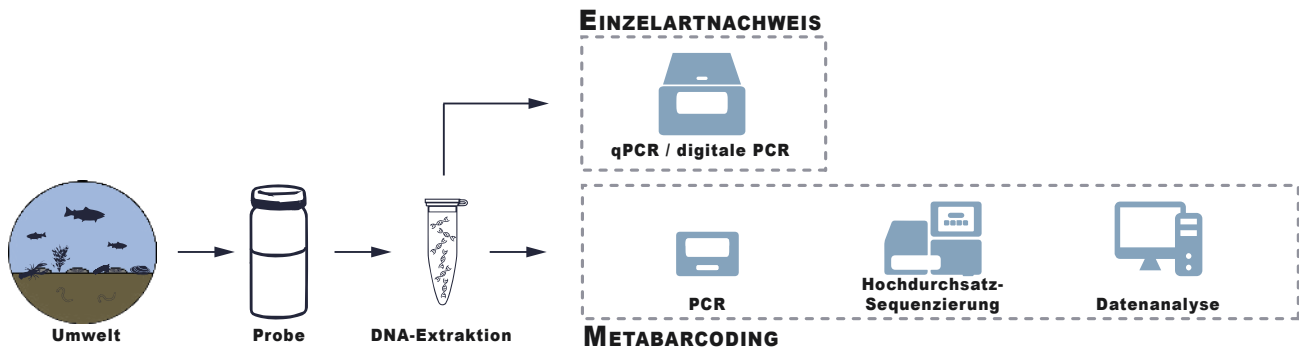
2. **Amplifikation der Polymerase-Kettenreaktion (PCR):** Es werden in einer Reihe von enzymatischen Reaktionen mehrere Kopien einer bestimmten Genomregion erzeugt.
3. **Hochdurchsatz-Sequenzierung (HTS):** Die amplifizierten PCR-Produkte werden als Vorlage für eine massiv-parallele DNA-Sequenzierung verwendet, die Millionen von Sequenzen erzeugt (dieser Schritt betrifft nur das Metabarcoding).

Die Methoden, die für die Verarbeitung von eDNA-Proben eingesetzt werden, richten sich nach dem Zweck der ökologischen Studie oder der biologischen Bewertung (Abb. 10).

- Soll eine **einzelne Art** gefährdeter oder invasiver Taxa, von Parasiten oder Pathogenen **nachgewiesen werden**, ist der geeignetste Ansatz die Standard-PCR, die quantitative PCR (qPCR) oder die digitale PCR (dPCR) (Kapitel 5.4).
- Ist das Ziel die **Analyse der Zusammensetzung einer Gemeinschaft** für eine Biodiversitätserhebung oder eine Beurteilung der ökologischen Qualität, ist das effizienteste Vorgehen das Metabarcoding, d. h. eine Hochdurchsatz-Amplikonsequenzierung.

Abbildung 10

Ablauf einer eDNA-Analyse für Einzelartnachweise und Metabarcoding



In beiden Fällen gelten für eDNA-Probenahme und DNA-Extraktion dieselben Protokolle. Die gleichen eDNA-Proben können für den Artnachweis und für Biodiversitätserhebungen verwendet werden. Allerdings weichen die Schritte nach der DNA-Extraktion, einschliesslich der Schritte im Molekularlabor und der Datenanalyse, voneinander ab.

Die Wahl der Methode hängt auch vom Zugang zu Ausrüstung und Know-how ab. Methoden für den PCR-basierten Einzelartnachweis sind schneller, preiswerter und einfacher, während HTS-basiertes Metabarcoding eine spezialisiertere Ausrüstung und grösseres Know-how in Bezug auf die Erzeugung und die Interpretation von Sequenzdaten erfordert. Der Vorteil dieser Methoden, Informationen zu mehreren Arten gleichzeitig zu gewinnen, ist eine wichtige Überlegung bei der Planung einer Biomonitoring-Studie. Der Einzelartnachweis wird nur für wenige Zielorganismen (z. B. seltene oder invasive Arten, spezifische Pathogene) mit bewährten Einzelart-Primern empfohlen.

5.2 DNA-Extraktion

Die Art der DNA-Extraktion hängt stark von der Art der Probe ab, aber der allgemeine Ablauf ist immer derselbe: Der erste Schritt ist die Lyse des Probematerials, um DNA in Zellen oder Organellen (Mitochondrien oder Chloroplasten) zu isolieren. Die Lyse kann entweder mit chemischen Bestandteilen im Lysepuffer oder durch den mechanischen Aufschluss von Zellwänden und Membranen erfolgen, in der Regel, indem Glasperlen der Probe zugesetzt werden und die Probe mithilfe eines Vortexers oder einer Kugel-

mühle geschüttelt wird. Beim zweiten Schritt werden alle organischen und anorganischen Komponenten ausser der DNA entfernt. Da einige Arten von Umweltproben PCR-Inhibitoren enthalten, schliesst dieser Schritt normalerweise die Entfernung solcher Inhibitoren ein, um eine ordnungsgemässe DNA-Amplifikation zu gewährleisten. Schliesslich wird das DNA-Extrakt entweder auf einer Silicamembran, mit magnetischen Perlen oder durch Ausfällen gereinigt.

Auf dem Markt gibt es diverse Kits verschiedener Marken für unterschiedliche Arten der DNA-Extraktion, um eDNA aus Wasserproben zu extrahieren (z. B. Qiagen, Macherey-Nagel). Ausserdem gibt es selbsterstellte Protokolle, die hauptsächlich auf einer Phenol-Chloroform-Extraktion beruhen. Häufige Methoden für das Sammeln und die Extraktion werden von Tsuji et al. (2019) erörtert. Obwohl die Extraktionsverfahren in einigen spezifischen Fällen nicht als beschränkende Faktoren betrachtet werden (Vasselon et al., 2017b), kann die Verwendung verschiedener Extraktionsverfahren zu signifikant unterschiedlichen Artnachweisen führen (Deiner et al., 2015, 2018). Daher muss während eines Projektes dasselbe Protokoll konsequent eingesetzt werden, um die Reproduzierbarkeit und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

5.3 PCR-Amplifikation

Grundsatz

Die DNA-Menge der Zielorganismen kann in Umweltproben relativ gering sein. Daher muss die DNA-Barcode-Zielregion vor der Sequenzierung mithilfe der

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, viele Kopien der Barcoderegion anzufertigen, indem zwei kurze synthetische Oligonukleotide, Primer genannt, in Kombination mit einer Polymerase verwendet werden. Die PCR umfasst drei Hauptschritte, die in 25 bis 50 Zyklen wiederholt werden. Der erste Denaturierungsschritt dient dazu, die Doppelstrang-DNA in der Regel bei einer hohen Temperatur (94–98 °C) aufzuspalten. Beim zweiten Schritt hybridisieren die Primer mit der DNA-Zielregion bei einer Temperatur, die von den Primersequenzen sowie vom verlangten Spezifitätsgrad abhängt (meist zwischen 45 und 60 °C). Im letzten Schritt, der Elongation, wird die Barcoderegion durch die Polymerase mit freien Nukleotiden aufgefüllt. Die Temperatur ist abhängig vom Enzym, liegt in der Regel aber bei 72 °C. Jeder dieser drei Schritte dauert je nach verwendeten Primern oder eingesetzter Polymerase 30 bis 60 Sekunden. Als Ergebnis der PCR-Reaktion nimmt die Anzahl amplifizierter DNA-Fragmente, auch Amplikone genannt, exponentiell zu, sodass ausreichend Material für die Sequenzierung generiert wird.

PCR-Primer

Die Wahl der PCR-Primer ist für den Nachweis von Arten in eDNA-Proben ausschlaggebend. Beim Einzelartnachweis müssen die Primer für die Zielart spezifisch sein, um falsch-positive Nachweise zu vermeiden. Die Primer müssen sich für ihre Anwendung bewährt haben (an Nicht-Zielarten, einer Reihe von Umweltproben und idealerweise in Probenahmekampagnen über einen längeren Zeitraum getestet), damit die Ergebnisse vom Endbenutzer interpretiert werden können. Für dieses Vorgehen werden Standard-PCR-, quantitative oder digitale PCR-Verfahren angewandt, um die DNA zu amplifizieren. Beim Gemeinschaftsansatz müssen die Primer generisch genug sein, um alle Arten, die zur Zielgruppe gehören, zu amplifizieren, idealerweise aber nicht über diese Gruppe hinaus.

Die Primer müssen sich mit der DNA-Barcodingregion hybridisieren, die je nach Art variiert. Die Entwicklung der Primer hängt von der Ziel-Organismengruppe und der gewünschten Genregion ab die amplifiziert werden sollen (einen ausführlichen Überblick bieten Taberlet et al., 2018). Es gibt zwei Hauptarten von Barcoding-Markern: proteincodierende Gene (z. B. COI, rbcL) und ribosomale Gene (z. B. 18S, 16S, 12S, ITS, 23S). Diese zwei Gen-

arten sind unterschiedlich aufgebaut. Proteincodierende Gene sind in der Regel über das gesamte Gen einheitlich, um die richtige Translation der Aminosäuren sicherzustellen. Da aber der genetische Code redundant ist, können die erste und die dritte Codonbase je nach Art variieren. Diese Besonderheit ist nützlich, um eine sehr gute Bestimmung auf Ebene der Art zu gewährleisten. Es kann aber auch schwierig sein, die typischen Signaturen für einen höheren taxonomischen Rang in proteincodierenden Genen zu finden. Daher funktionieren die COI-Primer sehr gut für das Einzelart-Barcoding, jedoch weniger gut für das Metabarcoding. Ribosomale Gene sind hingegen aus einem Mosaik von konservierten und variablen Regionen aufgebaut. Es ist daher einfacher, genetische Signaturen für höhere taxonomische Gruppen in der konservierten Region zu finden, welche die Synthese sowohl von hochspezifischen als auch von universelleren Primern erlaubt. Im Allgemeinen werden anschliessend eine oder zwei Regionen für die Identifikation auf Ebene der Art oder der Gattung verwendet. Einige Studien nutzen einen Mix von verschiedenen Primerpaaren, die auf verschiedene variable Regionen in derselben PCR-Reaktion abzielen. Das wird Multiplex-PCR genannt. Allerdings kann dieses Vorgehen bei nicht optimaler Umsetzung zu einigen Verzerrungen führen und die Wirksamkeit der PCR-Reaktion reduzieren. Es wird daher empfohlen, ein Primerpaar pro PCR-Reaktion zu verwenden, ausser wenn sorgfältige Tests für ein Multiplex-Verfahren durchgeführt wurden.

PCR-Replikate

Für jede eDNA-Probe werden normalerweise verschiedene PCR-Reaktionen durchgeführt, die PCR-Replikate genannt werden. Für eine PCR-Reaktion wird nur eine Teilprobe der gesamten extrahierten eDNA verwendet, normalerweise 1 bis 10 % der Probe. Eine Art kann in einer PCR-Reaktion zufälligerweise durch die Maschen fallen (was zu einem falsch-negativ Ergebnis führt). PCR-Replikate steigern die Wahrscheinlichkeit, dass die DNA von Zielarten in den Proben gefunden wird. Bei Metabarcoding-Studien gelten zwei PCR-Replikate als Mindestanforderung für einen guten Überblick der anvisierten Biodiversität. Wenn das Ziel allerdings darin besteht, eine bestimmte Art nachzuweisen (gezielter Ansatz), sollte die Anzahl Replikate erhöht werden. Das empfohlene Vorgehen für den Nachweis einzelner Arten in einer Gemeinschaftsanalyse sieht 7 bis 15 PCR-Replikate für jede

Probe vor. Alternativ kann mehr DNA pro Reaktion hinzugefügt werden, um weniger Replikate zu benötigen.

5.4 Einzelartnachweis

Um gewisse ökologische Fragen zu beantworten, ist der Nachweis einer einzelnen Art insbesondere bei gebietsfremden, invasiven, schwer erfassbaren und geschützten Arten von grösserem Interesse als der Nachweis einer ganzen Gemeinschaft. Einzelartnachweise wurden für viele Studien und für alle Organismengruppen verwendet (siehe Tabelle 3). Sobald ein artenspezifisches eDNA-Testverfahren eingeführt und im Labor sorgfältig geprüft wurde, können nach der Extraktion relativ rasch Ergebnisse geliefert werden.

In Europa gibt es momentan nur ein einziges artenspezifisches eDNA-Verfahren (z. B. Thomsen et al., 2012; Rees et al., 2014b), das bereits auf einer Rechtsgrundlage eingesetzt wird (d. h. mit einem gesetzlichen Auftrag). Der eDNA-Nachweis des Nördlichen Kammolchs (*Triturus cristatus*) wurde von der britischen Regulierungsbehörde Natural England offiziell als gültiger Nachweis der physischen Präsenz der Art anerkannt, um getestete Habitate unter Schutz zu stellen. Der Fokus auf einer einzelnen Art wird dem Verfahren für eine ganze Gemeinschaft vorgezogen, weil die Analyse kürzer dauert und pro Probe weniger Kosten anfallen. Wichtig: Ein artenspezifisches Verfahren erlaubt nur den Nachweis der entsprechenden Art und liefert keine Informationen zu anderen, auch eng verwandten Arten, wenn nicht spezifisch nach ihnen gesucht wird.

Für optimale Ergebnisse sollten alle Schritte von der eDNA-Probenahme über die Extraktion bis zur PCR für die betreffende Art optimiert sein. Die Entwicklung eines artenspezifischen PCR-Testverfahrens ist zeitaufwendig und daher teuer. In der wissenschaftlichen Literatur wurden viele Testverfahren publiziert, aber das Testausmass dieser Verfahren hinsichtlich Spezifität und Sensibilität (Nachweisgrenze, LOD) variiert stark. Zudem sollte das geografische Gebiet berücksichtigt werden, in dem das Verfahren validiert wurde, da es sich allenfalls nicht für andere Regionen eignet. Zeigt die Zielart lokale Schwankungen in der ausgewählten Barcodingregion oder unterscheidet sich der lokale Artenpool und enthält dieser

Arten, für die das Verfahren nicht getestet wurde, ist von einer geografischen Inkongruenz auszugehen. Um Fachpersonen zu helfen, das Entwicklungsstadium und die damit verbundenen Unsicherheiten eines ausgewählten Testverfahrens zu verstehen, haben Goldberg und ihr Team (2016) massgebliche Überlegungen veröffentlicht. Die Einführung einer Validierungsskala für Testverfahren wird momentan diskutiert (Details finden sich unter www.edna-validation.com) und kann dazu beitragen, verbleibende Unsicherheiten und die Interpretation verschiedener entwickelter Verfahren zu verstehen.

Interpretation von PCR-Ergebnissen für eine einzelne Art

Es ist wichtig zu erkennen, dass molekulare Methoden im Vergleich zu herkömmlichen Methoden keine äquivalenten Ergebnisse liefern. Die herkömmliche Probenahme beinhaltet das Sammeln von Individuen und liefert daher Angaben zur Anzahl der Exemplare. eDNA-Ergebnisse hingegen spiegeln die Anzahl amplifizierter Genkopien (reads) wider und können nicht direkt mit der Zahl der Exemplare korreliert werden. Die PCR ist ein hoch stochastischer Prozess, und eine positive Amplifikation hängt davon ab, ob das DNA-Zielmolekül in der Reaktion vorhanden ist oder nicht. Wegen des stochastischen Charakters werden verschiedene PCR-Replikate pro Probe umgesetzt, wobei die Anzahl von der Methode abhängt. Falls die Replikate alle oder grossmehrheitlich positiv sind, liegt ein solider Nachweis vor, dass die Art in der beprobten Umgebung höchstwahrscheinlich vorhanden ist. Sind von den PCR-Replikaten nur einer oder wenige positiv, ist der Nachweis ungewiss, und es braucht mehr Nachforschungen. Dies kann entweder durch die Erhöhung der Anzahl PCR-Replikate erfolgen oder mit herkömmlichen Beprobungs-Methoden. Wenn alle Replikate schliesslich negativ sind und das Vorkommen der Art nicht belegt werden kann, heisst dies nicht zwingend, dass die Zielart nicht vorhanden ist. Diese Interpretation von «negativen Nachweisen» gilt auch für alle anderen Methoden.

Aktuell werden drei verschiedene PCR-Verfahren verwendet, um artenspezifische DNA zu amplifizieren, die den Nachweis von Zielarten zulässt: Standard-, quantitative und digitale PCR. Die Standard-PCR liefert Ergebnisse, die Aussagen zum Vorkommen/Fehlen einer Zielart umfassen, während quantitative und digitale PCR basierend auf eDNA-Konzentrationen Schätzungen zur Häufigkeit einer Art erlauben. In den folgenden Kapiteln werden die Merkmale jedes Verfahrens diskutiert, und künftige Möglichkeiten werden hervorgehoben.

5.4.1 Standard-PCR

Ein Standard-PCR-Verfahren besteht aus einer Amplifikation, bei der ein artenspezifischer Vorwärts- und/oder Rückwärtsprimer eingesetzt wird. Die Reaktion erfolgt in einer Standard-PCR-Maschine, d. h. in einem Thermocycler, der in der Lage ist, rasch zwischen den verschiedenen Temperaturen einer PCR zu wechseln. Das Produkt einer Standard-PCR wird am Ende aller Zyklen validiert und in der Regel mit einem Agarosegel, in einer Kapillarelektrophorese oder auf einem Sequenzierer dargestellt, wenn fluoreszenzmarkierte Primer verwendet wurden (Goldberg et al., 2011). Alle drei Optionen erlauben die Überprüfung des Produkts je nach Sequenzlänge eines Amplikons oder des emittierten Lichts. Sie beweisen aber nicht, dass das erzeugte Produkt den Basenpaaren der erwarteten Sequenz entspricht.

Basierend auf einem artenspezifischen Standard-PCR-Verfahren wurden verschiedene Studien publiziert (z. B. Deagle et al., 2003; Jerde et al., 2011; Mahon et al., 2013; Keskin, 2014; Mächler et al., 2014; Piaggio et al., 2014). Allerdings liefert Standard-PCR nur Angaben zum Vorkommen bzw. zum Fehlen der Art. Weil die Kosten pro Probe tief sind, war die Standard-PCR lange Zeit sehr beliebt. Es wird erwartet, dass die Standard-PCR wegen den sinkenden Preisen anderer PCR-Verfahren abgelöst wird.

5.4.2 Quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative PCR (qPCR) ermöglicht die Quantifizierung der ursprünglichen DNA-Konzentration einer Probe, was eine Standard-PCR nicht zu leisten vermag. Diese Möglichkeit ist besonders relevant, da eine positive Korrelation zwischen der nachgewiesenen eDNA-Konzentration und der Häufigkeit oder der Biomasse der Zielart hergestellt werden kann (z. B. Takahara et al., 2012; Jane et al.,

2015; Klymus et al., 2015). Eine qPCR kann anhand zweier Strategien durchgeführt werden: nur mit Fluoreszenzfarbe oder einer fluoreszenzmarkierten Sonde. Beide Strategien basieren auf der fluoreszierenden Quantifizierung des PCR-Produkts und müssen daher in einer qPCR-Maschine durchgeführt werden, die Fluoreszenz detektieren kann.

Die Fluoreszenzfarben, die bei der ersten qPCR-Strategie verwendet werden, emittieren mit der Akkumulation der PCR-Produkte Licht. Ähnlich wie bei der Standard-PCR verwendet ein Testverfahren einen artenspezifischen Vorwärts- und/Rückwärtsprimer und zusätzlich wird eine Fluoreszenzfarbe dem PCR-Gemisch beigefügt. Deshalb ist ein qPCR-Verfahren, das eine Fluoreszenzfarbe verwendet, nicht spezifischer als eine Standard-PCR-Reaktion, da es auf sämtliche doppelsträngige DNA abzielt. Das Licht würde unabhängig davon emittiert, ob das erzeugte Produkt über die artenspezifische Sequenz verfügt oder nicht. Dies kann zu falsch-positiven Ergebnissen oder zur Überschätzung der eDNA-Konzentration führen. Daher besteht das beste Vorgehen darin, das Produkt als bestätigenden Schritt zu sequenzieren.

Bei der zweiten Strategie wird eine fluoreszenzmarkierte Sonde verwendet, bei der es sich um eine zusätzliche Nukleotidsonde handelt, die sich während der PCR mit der Zielsequenz verbindet und erst bei der Amplifikation Fluoreszenz freisetzt und ein nachweisbares Signal erzeugt. Ähnlich wie die Primer muss der bestimmte Marker der artenspezifischen Sequenz entsprechen, um eine Nicht-Zielamplifikation zu vermeiden. Die Entwicklung eines sondenbasierten Verfahrens stellt eine grössere Herausforderung dar, weil die drei Elemente (Sonde, Vorwärts- und Rückwärtsprimer) zusammen im selben Verfahren auftreten, jedoch nicht miteinander interferieren oder sich gegenseitig blockieren dürfen. Da die Quantifizierung auf der Übereinstimmung dieser drei Elemente basiert, ist das Verfahren spezifischer und empfindlicher. Ausserdem ist mit der Sondenstrategie ein Multiplexing möglich, indem unterschiedliche Fluorophore für die verschiedenen nachzuweisenden Arten verwendet werden (je nach qPCR-Gerät sind bis zu fünf Kombinationen möglich).

Bei beiden qPCR-Strategien kann die DNA-Quantifizierung relativ oder absolut sein. Eine relative Quantifizierung

erlaubt es, Proben, die gleichzeitig zusammen analysiert wurden, zu vergleichen. Eine absolute DNA-Quantifizierung ist aussagekräftiger und wird häufig bevorzugt. Um eine absolute Quantifizierung durchzuführen, muss über alle Proben eine Verdünnungsreihe laufen, die auf einem Standard mit bekannter DNA-Konzentration beruht. Das strenge Testen eines Verfahrens und der Verdünnungsreihen des Ziels erlaubt es, die niedrigste nachweisbare Menge an Ziel-DNA (die sogenannte Nachweisgrenze, LOD) und die niedrigste Konzentration zu bestimmen, die noch immer ausreichende Präzision und Sicherheit für die Quantifizierung liefert (sogenannte Quantifizierungsgrenze, LOQ) (Klymus et al., 2019).

Quantitative sondenbasierte PCR-Verfahren sind momentan der Goldstandard für Einzelartnachweise (z. B. Thomssen et al., 2012; Goldberg et al., 2013; Laramie et al., 2015; Mauvisseau et al., 2018). Untersuchungen zeigen, dass qPCR etwas weniger genau und teurer sein kann als digitale PCR (z.B. Hunter et al., 2017). Daher ist zu erwarten, dass qPCR-Verfahren künftig weniger verwendet werden, sobald sich die digitale PCR etabliert hat und besser verfügbar ist.

5.4.3 Digitale PCR (dPCR)

Digitale PCR stellt die neuste Entwicklung der PCR-Verfahren dar, mit entsprechend verschiedenen Technologien und vielen neuen Anwendungen. Der dPCR-Ansatz wurde bereits in eDNA-Studien angewandt (Nathan et al., 2014; Doi et al., 2015; Hunter et al., 2017; Baker et al., 2018). Das Verfahren ist ähnlich wie die qPCR, da eine Fluoreszenzfarbe oder eine fluoreszenzmarkierte Sonde benötigt wird, um die DNA-Menge in einer Probe zu quantifizieren. Allerdings basiert die Quantifizierungsmethode auf einer anderen Technik. In einer digitalen Droplet-PCR (ddPCR), die eine der verfügbaren dPCR-Technologien darstellt, wird eine einzelne Probe in Tausende von Tröpfchen oder physische Partitionen aufgespalten, die jeweils keine oder eine Vorlage enthalten. Jedes einzelne dieser Kompartimente agiert sozusagen als kleiner PCR-Reaktor, in dem die Amplifikation der Zielsequenz, falls vorhanden, stattfindet. Anschliessend werden sie entweder mithilfe der Mikrofluidtechnologie oder eines optischen Moduls analysiert, indem der Anteil PCR-positiver Amplifikationen bestimmt wird. Dies erlaubt die Quantifizierung der DNA, ohne eine Standardkurve über die Proben laufen

zu lassen, und eine genauere Quantifizierung bei tiefen Konzentrationen im Vergleich zur qPCR. Wenige unterschiedlich gekennzeichnete Testverfahren können innerhalb einer dPCR einem Multiplexing unterzogen werden, ähnlich wie beim sondenbasierten qPCR-Verfahren. Bisher hat nur eine eDNA-Studie den Bezug zwischen der per dPCR gemessenen DNA-Konzentration und der Biomasse untersucht und eine positive Korrelation festgestellt (Doi et al., 2015).

5.5 Metabarcoding

5.5.1 PCR für Metabarcoding

Ein wichtiges Merkmal für die Entwicklung von PCR-Primern für das Metabarcoding ist die Länge des amplifizierten Barcodes. Der Barcode darf nicht zu kurz sein, da er taxonomisch gut aufgelöst sein muss, d. h. er muss genügend Variationen umfassen, um eng verwandte Arten zu unterscheiden. Allerdings darf der Barcode auch nicht zu lang sein, da er sonst nicht den technischen Möglichkeiten der Sequenzierungstechnologien entspricht. Aktuell befinden sich die in Metabarcoding-Studien verwendeten Barcodes meist in einem Bereich zwischen 200 und 500 bp. Kürzere Barcodes (unter 120 bp) werden manchmal insbesondere zum Nachweis makrobieller Arten verwendet, aber so kurze Genfragmente können länger persistieren, werden mit grösserer Wahrscheinlichkeit weiter aus den Zielhabitaten weg transportiert und haben eine geringere taxonomische Auflösung.

PCR-Verzerrungen

Obwohl die PCR-Amplifikation ein hervorragendes Instrument zur Vervielfältigung von Metabarcodes darstellt, ist sie auch die Hauptquelle für technische Fehler während des Metabarcoding-Prozesses (Berney et al., 2004; Aird et al., 2011). Diese technischen Fehler schliessen die von der Polymerase eingeführten Substitutionen und Insertionen (Eckert & Kunkel, 1991; McInerney et al., 2014; Lee et al., 2016), die Substitutionen durch DNA-Schäden infolge der Temperaturwechsel bei der PCR (Potapov & Ong, 2017) sowie die Schaffung von Chimären mit ein (Fonseca et al., 2012). Chimäre PCR-Produkte entstehen, wenn kleine DNA-Fragmente, welche die Elongation nicht vollendet haben, im nächsten Amplifikationsschritt als «Primer» verwendet werden. Das resultierende Amplikon

wird eine chimäre Sequenz sein, die in keinem lebenden Organismus existiert und die sich aus zwei unterschiedlichen DNA-Fragmenten von zwei verschiedenen Organismen zusammensetzt. Ausserdem gilt es zu beachten, dass Metabarcoding-Primer nicht alle DNA in einer Probe gleichmässig amplifizieren, was zu einem verzerrten Häufigkeitsverhältnis der DNA verschiedener Arten führt (Elbrecht & Leese, 2015; Piñol et al., 2015). All diesen PCR-Verzerrungen muss bei der Analyse der Sequenzen Rechnung getragen werden.

5.5.2 Hochdurchsatz-Sequenzierung

Die Vorbereitung der Amplikone für die Sequenzierung bedingt verschiedene Schritte. Erstens müssen die PCR-Replikate für die Vorbereitung der Library gepoolt, gereinigt und quantifiziert werden. In diesem Schritt werden jeder Probe Sequenzierungsadapter beigefügt, damit sie während der Analyse nach der Sequenzierung einem Demultiplexing (Identifizierung) unterzogen werden können. Es wurden verschiedene Strategien entwickelt, um das Multiplexing diverser Proben in eine einzelne Library zu erlauben. Zu diesen Strategien gehören 1-Schritt-PCR, 2-Schritt-PCR oder ligationsbasierte Taggingverfahren (Zizka et al., 2019). Letzteres Verfahren umfasst die Verwendung von markierten Primern, die eine kurze Serie von Nukleotiden tragen, die am 5'-Ende jedes Primers gebunden sind. Eine einzigartige Kombination dieser Primer wird für jede Probe verwendet, um das Demultiplexing der Proben nach der Sequenzierung zu erlauben (Esling et al., 2015). Werden Multiplexing-Strategien angewandt, wird das PCR-freie Protokoll für die Vorbereitung der Library empfohlen, um die Schaffung chimärer Amplikone zu vermeiden, die aus verschiedenen Proben stammen könnten. Schliesslich muss jede Library mithilfe von qPCR überprüft und quantifiziert werden, bevor sie die Sequenzierungsmaschine durchläuft.

Die Leistungsfähigkeit verschiedener HTS-Plattformen wurde von verschiedenen Autoren verglichen (Quail et al., 2012; Frey et al., 2014). Aktuell wird beim Metabarcoding die Sequenzierungstechnologie Illumina MiSeq am häufigsten eingesetzt. Sie bietet den besten Kompromiss für die Amplikonsequenzierung mit einer Sequenzlänge von bis zu 600 Nukleotiden und einem maximalen Output von 24 Millionen Sequenzen. Das Instrument MiSeq verfügt über verschiedene Paired-End-Lösungen

für das Durchlaufen der Proben. Es stehen vier verschiedene Durchflusszellen zur Verfügung, um 1, 4, 15 oder 24 Millionen Sequenzen mit einer Fragmentlänge von 2×150 , 2×250 und bis zu 2×300 Basenpaaren (bis zu 600 mit der 24-M-Durchflusszelle) zu erzeugen. Die empfohlene Sequenzierungstiefe für Illumina MiSeq (theoretische Anzahl Sequenzen pro Probe) liegt meist zwischen 50 000 und 100 000 Sequenzen pro Probe. Die notwendige Sequenzierungstiefe wird auch durch die gewünschte anschliessende Analyse beeinflusst.

5.5.3 Datenanalyse

Der bioinformatische Teil des Metabarcoding-Prozesses umfasst vier Hauptschritte (Abb. 11):

1. **Qualitätsfilterung:** Amplikonsequenzen mit tiefer Qualität und/oder mehrdeutigen Basen werden entfernt. Die Paired-End-Sequenzen werden in eine fortlaufende Sequenz mit voller Länge zusammengeführt und mögliche Chimäre werden entfernt.
2. **Clustering:** Qualitativ hochstehende Sequenzen werden gemäss ihrer Ähnlichkeit geclustert und in operationellen taxonomischen Einheiten (OTUs) gruppiert.
3. **Taxonomische Zuordnung:** Die OTUs werden mit der Referenzdatenbank abgeglichen und je nach Ähnlichkeit ihrer Sequenz oder anderen Kriterien Taxa zugewiesen.
4. **Datenanalyse:** Die Liste der OTUs dient dazu, die taxonomische Zusammensetzung jeder Probe und ihren Bezug zu Umweltvariablen zu analysieren.

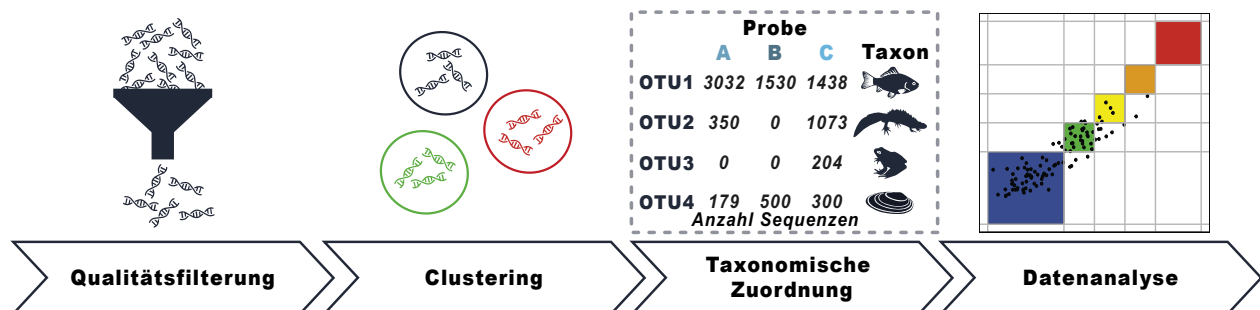
Jüngste Entwicklungen von Metabarcoding-Pipelines führen tendenziell dazu, dass der Clustering-Schritt wegen des Denoising von HTS-Daten und der Kombination von Sequenzen zu Amplikon-Sequenzvarianten (ASVs), welche die OTUs ersetzen könnten, übersprungen wird (Callahan et al., 2017).

Um die Transparenz und die Reproduzierbarkeit der Analyse zu gewährleisten, ist es wichtig, die bioinformatische Pipeline sowie die Daten von Zwischenschritten des Reinigungsprozesses zu dokumentieren. Für die Analyse von Metabarcoding-Daten stehen verschiedene Algorithmen zur Verfügung. Die meisten haben eine Befehlszeilenschnittstelle (QIIME, MOTHUR, DADA2, Obitoools), einige verfügen aber über eine grafische Benutzeroberfläche

(SLIM, Dufresne et al., 2019). Da die Bioinformatik sich sehr schnell entwickelt und ständig neue Algorithmen entstehen, besteht innerhalb der Wissenschaft noch keine Einigkeit, welche Algorithmen jeweils angewandt werden sollen.

Abbildung 11

Prozess der Datenanalyse bei einer Hochdurchsatz-Sequenzierung



Interpretation von Metabarcoding-Ergebnissen

Es ist wichtig, beim Vergleich von Metabarcoding-Daten immer dieselbe Pipeline zu nutzen und zu wissen, dass man immer zur ursprünglichen Sequenzdatei zurückkehren kann, um sie bei Bedarf durch eine neue Pipeline laufen zu lassen. Das Fachwissen der Person, die Metabarcoding-Daten interpretiert, ist von grösster Bedeutung. Es gilt, verschiedene Punkte zu beachten. Die erzeugten Daten werden normalerweise in Form einer Matrix dargestellt mit der Liste der Arten (oder OTUs) und der in jeder Probe für jede Art gefundenen Anzahl Sequenzen. Diese Zahl kann stark variieren und stellt für die quantitative Interpretation von Metabarcoding-Daten ein grösseres Problem dar. Für häufig vorkommende Taxa haben verschiedene Studien eine Korrelation zwischen der relativen Anzahl Sequenzen und der relativen Häufigkeit von Exemplaren innerhalb einer taxonomischen Gruppe aufgezeigt (Evans et al., 2016; Hänfling et al., 2016, Schenk et al., 2019). Obwohl diese Schlussfolgerungen vielversprechend sind, sind sie sehr spezifisch und können nicht auf alle Metabarcoding-Studien angewandt werden. Die Interpretation könnte bei seltenen Arten noch problematischer sein. Da Metabarcoding nachweislich höchst sensitiv ist,

könnte das Vorkommen einiger Arten leicht überschätzt werden. Auch wenn die Probenahme und die Arbeiten im Labor mit äusserster Sorgfalt sowie geeignetem Material und passender Ausrüstung ausgeführt werden, ist es unmöglich, alle Kreuzkontaminierungen, einschliesslich «Tag Jumping», zu vermeiden. Als übliche Reaktion auf dieses Problem wird die Anzahl berücksichtigter Sequenzen begrenzt, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Allerdings herrscht keine Einigkeit hinsichtlich der anzuwendenden Grenze (bezüglich des Ausschlusses von Sequenzen). In der Regel sind Grenzen artenspezifisch und basieren auf der Analyse vieler kontrollierter Proben (Harper et al., 2018). Die Verwendung von Positiv- und Negativkontrollen bei der Sequenzierung könnte zur Lösung dieses Problems beitragen.

6 Referenzdatenbank für die taxonomische Zuordnung

Die taxonomische Zuordnung stellt einen wichtigen Schritt in Metabarcoding-Studien dar, da sie es erlaubt, die DNA-Sequenzen Morphospezies zuzuweisen. Dazu braucht es eine qualitativ hochstehend kuratierte Datenbank. Der wichtigste Faktor, der die Zuordnung von Sequenzen zu taxonomischen Namen behindert, sind unvollständige Referenzdatenbanken. Auch für häufige Bioindikator-Taxa bestehen immer noch grosse Lücken (Weigand et al., 2019). Allerdings wollen verschiedene internationale und nationale Initiativen diese Lücken schliessen. Auf nationaler Ebene zentralisiert die Global Biodiversity Information Facility Schweiz (GBIF.ch) die DNA-Sequenzen im Zusammenhang mit Beobachtungen von Arten oder mit Exemplaren in Museumskollektionen. Diese Daten werden verarbeitet, um eine schweizerische Referenzdatenbank aufzubauen, die sämtliche Gen-daten für alle in der Schweiz lebenden Arten umfasst. Die GBIF.ch-Datenbank wird 2021 öffentlich zugänglich sein, wobei verschiedene Qualitätsniveaus für jede Sequenz erwähnt werden. Die unterschiedlichen Qualitätsniveaus sind abhängig von der Qualität der DNA-Daten selbst (Quelldatei für Sanger-Sequenzierung), aber auch von der Rückverfolgbarkeit des genetischen Mate-

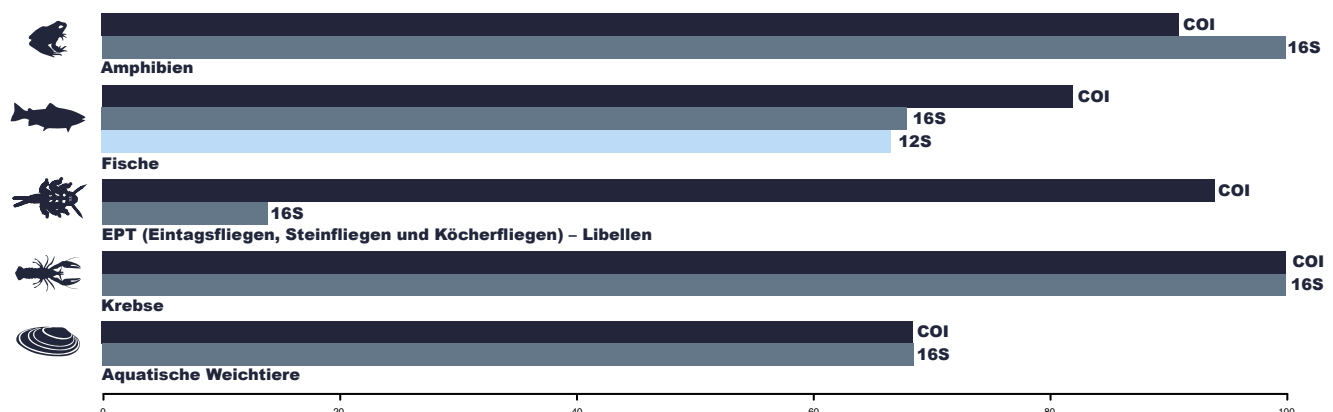
rials, das den DNA-Sequenzen zugrunde liegt, und von der Verlässlichkeit der Artenbestimmung. Eine Dokumentation der DNA- und/oder Gewebeprobe wird vorhanden sein, ebenso eine Klassifizierung für Gensequenzen je nach Art des Belegs (Holotyp, Paratyp, Topotyp, Belegexemplar oder ein Foto davon). Die meisten momentan verfügbaren Daten betreffen terrestrische Arten, aber die Anzahl der Datensätze für aquatische Arten steigt rapide an (alle in der Schweiz lebenden Stein- und Köcherfliegenarten wurden beispielsweise neulich sequenziert, und die Datenbank für Wenigborster ist weit fortgeschritten). Die Datenbankabdeckung der wichtigsten aquatischen Taxa in der Schweiz wird in Abbildung 12 dargestellt.

Zusätzlich zu dieser lokalen Datenbank kann für die taxonomische Zuordnung auch auf diverse internationale Datenbanken zugegriffen werden. Die bekanntesten sind BOLD (<http://v4.boldsystems.org/>) und MIDORI (<http://reference-midori.info/server.php>) für COI-Marker, SILVA (www.arb-silva.de/) für ribosomale Marker, Diat.barcode spezifisch für rbcL-Marker bei Kieselalgen (Rimet et al., 2019) und GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) für alle Marker. Es ist jedoch wichtig, hinsichtlich der Qua-

Abbildung 12

Datenbankabdeckung (in %) für Arten spezifischer aquatischer Taxa in der Schweiz

Die Abdeckung wird für die Barcoderegionen COI und 16S für alle Gruppen und 12S für Fische angegeben. EPT bezieht sich auf Eintagsfliegen, Steinfliegen und Köcherfliegen.



lität der Sequenz und der Zuordnung Vorsicht walten zu lassen, insbesondere bei Datenbanken, die nicht kuratiert sind (Genbank, MIDORI). Es kann sinnvoll sein, eine lokale Referenzdatenbank mit den entsprechenden taxonomischen Gruppen aufzubauen und lokal zu pflegen.

7 Datenmanagement

Jede eDNA-Studie muss sich – ähnlich wie andere genetische Studien – an einen Datenmanagementplan halten. Das bedeutet, dass sämtliche relevanten Angaben zur Erzeugung, Analyse und Speicherung von eDNA-Daten dokumentiert und verfügbar gemacht werden. Es ist wichtig, die Datenmanagementanforderungen bei der Planung einer eDNA-Studie klar festzulegen. Insbesondere wird empfohlen, die folgenden Punkte zu beachten:

- Klären, was mit den eDNA-Extrakten passiert.
- Die langfristige Lagerung von DNA-Extrakten planen und dokumentieren, vorzugsweise mit Biobanknetzen.
- Alle Laborprotokolle (Art der DNA-Extraktion, verwendete Primer, PCR-Einstellungen, Sequenzierung) verfügbar machen.
- Die Parameter der Sequenzdatenfilterung und weiterer bioinformatischer Analysen verfügbar machen.
- Die Referenzdatenbank für taxonomische Zuordnungen definieren und angeben, idealerweise handelt es sich dabei um eine öffentliche Referenzdatenbank.
- Festlegen, wo und wie die Sequenz-Rohdaten und der schlussendlich verarbeitete Sequenz-Datensatz gespeichert werden und verfügbar sind.
- Eigentümerschaft für die Daten festlegen. Bewährte Verfahren sehen vor, alle erzeugten Sequenzen einer öffentlichen Datenbank zur Verfügung zu stellen (z. B. European Nucleotide Archive).

Der Datenmanagementplan stellt sicher, dass die eDNA-Studie in Übereinstimmung mit bewährten Praktiken und allgemein anerkannten Standards durchgeführt wird. Für die eDNA-Extraktion und -Verarbeitung werden äusserst unterschiedliche Labortechniken eingesetzt. Es wird daher empfohlen, dass die allgemeine Methodik im Bericht beschrieben wird und auf Anfrage detailliertere Informationen verfügbar gemacht werden. Dies ist grundlegend, wenn die entsprechende eDNA-Studie wiederholt oder mit einer ähnlichen Studie verglichen werden soll.

In der Schweiz haben nationale Institutionen eine Matrix für die Einreichung von Beobachtungen aus eDNA-Projekten entwickelt (GBIF.ch, www.gbif.ch; InfoSpecies, www.infospecies.ch; SwissBOL, www.swissbol.ch), deren Nutzung empfohlen wird. Diese Matrix entspricht den Grundanforderungen von InfoSpecies und umfasst Angaben zum molekularen Prozess, damit Artenbeobachtungen, die auf eDNA-Daten basieren, von InfoSpecies validiert werden können. Sie umfasst auch Angaben zur Art der Probe, zu den Personen, die in den Prozess involviert sind, sowie zur Datenbank, die für die taxonomische Zuordnung verwendet wird, und zur Verlässlichkeit der Ergebnisse (z. B. Anzahl Probenreplikate, die positive qPCR-Ergebnisse für eine bestimmte Art lieferten). Eine Verlinkung des Berichts im PDF-Format wird sehr empfohlen.

8 Anwendungsbeispiele (Fallstudien)

8.1 Einzelartnachweis

Artenspezifische Testverfahren können für alle gewünschten Arten generiert werden, aber die Entwicklung eines Testverfahrens gestaltet sich einfacher, wenn DNA-Barcodes für eine bestimmte Art bereits zur Verfügung stehen. In der wissenschaftlichen Literatur wurden zahlreiche Verfahren für eine breite Palette an Arten etabliert. Eine Auswahl davon wird in Tabelle 3 vorgestellt. Die folgenden zwei Fallstudien sind Beispiele mit spezifischer Relevanz für die Schweiz.

8.1.1 Quaggamuschel

Die Quaggamuschel (*Dreissena rostriformis bugensis*) ist eine neu auftauchende nichteinheimische Art in europäischen Süßwassersystemen. Sie stammt aus der Ponto-Kaspischen Region und ist durch den Main-Donau-Kanal in das Flusssystem des Rheins eingewandert, ähnlich wie ihre nahe Verwandte, die Wandermuschel (*Dreissena polymorpha*). Allerdings kann die Quaggamuschel im Gegensatz zu ihrer verwandten Art unter nährstoffarmen Bedingungen und in kalten Habitaten überleben und daher in Seen tiefere Zonen besiedeln. Dies kann für Trinkwasserversorger zu Problemen führen, insbesondere durch das Verstopfen von Wasserleitungen. Invasive Muscheln können bei der Betrachtung von Wasserproben unter dem Mikroskop anhand ihrer Veligerlarven erkannt werden.

In der Schweiz wurde die Verbreitung der beiden *Dreissena*-Arten im Einzugsgebiet des Rheins mittels eDNA von De Ventura et al. (2017) untersucht. Bei der Durchführung der Studie war die Wandermuschel bereits im ganzen Flusssystem anzutreffen, während die Quaggamuschel bis nach Kehl (Deutschland) vorgefunden wurde, jedoch nicht in der Schweiz. De Ventura und seine Kollegen stellten zum ersten Mal eDNA der Quaggamuschel in Basel (Schweiz) fest und informierten über das Vorkommen der invasiven Art, noch bevor die Art mit anderen, klassischen Methoden entdeckt worden war. Das Ergebnis weckte bei nationalen und kantonalen Stellen grosses Interesse, schärfte das Bewusstsein und intensivierte das Monitoring dieser invasiven Art. Im Bodensee beobach-

teten Taucher im Mai 2016 zum ersten Mal eine Quaggamuschel in einer Tiefe von 25 m. Heute kommt die Art überall im Bodensee sowie im Genfersee, aber möglicherweise auch in anderen Schweizer Seen vor.

8.1.2 Schwarzmundgrundel

Die Schwarzmundgrundel (*Neogobius melanostomus*) ist eine von fünf Grundelarten, die ihre Reviere in das Flusssystem des Rheins ausdehnen. Aus der Ponto-Kaspischen Region, in der die Schwarzmundgrundel heimisch ist, gelangte die Art wahrscheinlich als Larven im Ballastwasser von Schiffen in den Rhein. Die Schwarzmundgrundel bedroht einheimische Arten durch ihre Konkurrenz um Nahrung und Laichstellen, zeigt aggressives Territorialverhalten und ernährt sich u. a. vom Laich einheimischer Fischarten. 2012 wurde die Schwarzmundgrundel erstmals im Oberrhein festgestellt (Kalchauer et al., 2013). Das Bundesamt für Umwelt setzte die Schwarzmundgrundel 2017 auf die Liste der invasiven Arten. Üblicherweise werden Fische per Elektrofischerei untersucht, aber Arten wie die Schwarzmundgrundel können mit dieser Methode nur schwer nachgewiesen werden, weil sie sich in den Zwischenräumen zwischen Steinen in grossen Flüssen verstecken.

2016 wurde die Machbarkeit getestet, eDNA zum Nachweis von *N. melanostomus* im Rhein zu verwenden (Adrian-Kalchauer & Burkhardt-Holm, 2016). In einer ausführlichen Studie wurden die Verfahren für den eDNA-Nachweis der Schwarzmundgrundel entwickelt, und eine neue Invasionsfront der Art wurde nachgewiesen. Die Probenahme in Lebensraumnähe der Art an der Flusssohle führte zu besseren Nachweisen als die Proben, die an der Gewässeroberfläche entnommen wurden. Die Prüfung verschiedener Laborprotokolle zeigte, dass gewisse Extraktionsverfahren oder Inhibition den Nachweis der Schwarzmundgrundel erschweren oder verunmöglichten. Artenspezifische Anpassungen der Probenahme- und Labormethoden sind erforderlich, um ein sensitives Testverfahren zu etablieren.

8.2 Vielfalt der Wirbeltiere (Beispiel Molche)

In der Schweiz kommen fünf Arten und eine Unterart von Molchen vor: *Lissotriton helveticus*, *Lissotriton vulgaris*, *Lissotriton vulgaris meridionalis*, *Ichthyosaura alpestris*, *Triturus cristatus* und *Triturus carnifex*. Ihre natürliche Verbreitung variiert je nach Region. Einige Arten (z. B. *Lissotriton vulgaris meridionalis*) werden in gewissen Kantonen als einheimisch erachtet (Tessin) und in anderen als nichteinheimische Art (Genf). Es ist daher wichtig, genetische Instrumente zu entwickeln, die eine Untersuchung der gesamten Vielfalt der Molche erlauben und nicht nur den Nachweis einer einzelnen Art (Harper et al., 2018).

2018/2019 entwickelte eine Studie (Charvoz et al., 2019) einen eDNA-Metabarcoding-Test, der zur Überwachung der Molchvielfalt in der Region Genf eingesetzt wurde. Der Test basiert auf einem mitochondrialen 16S-Barcode, der eine Unterscheidung aller Arten und Unterarten in der Schweiz lebender Molche erlaubt, abgesehen von den Hybriden von *T. cristatus*/*T. carnifex*. Die Spezifität des gewählten Barcodes liegt im Durchschnitt bei 65 % der Sequenzen, die Molchen zugeordnet werden konnten. Die restlichen Sequenzen wurden Fischen und Vögeln zugeordnet. Während der Studie wurde das Vorkommen von Molchen in 30 Teichen durch visuelle Beobachtung und eine Wasser-eDNA-Analyse überprüft. Die DNA der Molche wurde an allen Stellen nachgewiesen, an denen Molche beobachtet wurden, mit einer perfekten Übereinstimmung zwischen sequenzierten und beobachteten Arten. Ausserdem wurde die DNA der Molche in verschiedenen Teichen festgestellt, wo die Arten nicht beobachtet worden waren. Dies war besonders eindrucksvoll bei der invasiven Art *Lissotriton vulgaris meridionalis*, deren DNA in 7 von 19 Teichen gefunden wurde, wo keine Individuen beobachtet wurden. Für weitere Studien zum Nachweis von Molchen mittels eDNA in der Schweiz siehe Dubey et al. (2019) und Cruickshank et al. (2019).

8.3 Makroinvertebraten

Makroinvertebraten widerspiegeln ein breites Diversitätsspektrum und gehören zu einer der wichtigsten Bioindikatorgruppen (neben Kieselalgen und Fischen), die regelmässig für Wasserqualitätsbeurteilungen unter-

sucht werden. Daher besteht ein grosses Interesse daran, molekulare Instrumente für die Identifikation von Gemeinschaften von Makroinvertebraten anzuwenden. Eine grosse Herausforderung besteht darin, dass «Makroinvertebraten» eine phylogenetisch höchst vielfältige und polyphyletische Gruppe darstellen, sodass viele Nicht-Zieltaxa, die nicht als Makroinvertebraten gelten, ebenfalls amplifiziert und sequenziert werden (Deiner et al., 2016), beispielsweise Rädertierchen. Wichtig ist, dass letztere Organismen nicht in herkömmlichen Bewertungen (z. B. Stucki 2010) verwendet wurden, weil sie mit herkömmlichen Methoden nicht zugänglich sind oder das Wissen für eine morphologische Identifizierung nicht breit verfügbar ist. Daher könnten auf aus Gewebe extrahierter DNA (Mischproben) basierende Metabarcoding-Verfahren eher vergleichbar mit heutigen herkömmlichen Probenahmemethoden sein, und die Einführung könnte kurzfristig und unkompliziert erfolgen (Blackman et al., 2019). Umfassende Ansätze, die auf dem Metabarcoding von Wasser-DNA basieren, könnten nützlich sein, um die Abdeckung von Taxa zu erweitern (z. B. Einschluss von Invertebraten in Meiofaunagrosse).

8.3.1 eDNA im Wasser (umfassender Ansatz)

Mächler et al. (2019) haben einen grossangelegten Vergleich von Bewertungen von Makroinvertebraten (Kicknetz-Probenahmen) und eDNA-Metabarcoding durchgeführt. Sie haben an 61 Stellen in einem grösseren Flussnetz Wasser-DNA und Kicknetzproben entnommen (Einzugsgebiet der Thur, 700 km²), mit einem Fokus auf Gattungsniveau bei Eintagsfliegen, Steinfliegen und Köcherfliegen (EPT), unter Verwendung der COI-Barcode-region. Auf Ebene des Einzugsgebiets (Gamma-Diversität) haben beide Ansätze ähnliche Anteile an der gesamten und kumulativen Gattungsdiversität nachgewiesen, nämlich 42 % bzw. 46 %. Es gab ausserdem eine gute Überlappung (62 %) bei den Gattungen, die in den eDNA- und in den Kicknetzproben auf regionaler Ebene gefunden wurden. Weiter war auch auf Standortebene die beobachtete lokale Taxavielfalt (Alpha-Diversität) bei eDNA- und Kicknetzproben höchst kongruent. Die lokale Vielfalt von Makroinvertebraten, die in eDNA-Proben festgestellt wurde, korrelierte positiv mit dem Abfluss (siehe auch Deiner et al., 2016). Jedoch war die Überlappung der Identität (d. h. die Identität von Gattungen), die von beiden Methoden auf lokaler Ebene festgestellt wurde, weniger gut. Dies

zeigt, dass die Transportprozesse der eDNA die lokale Probe beeinträchtigen, sodass die gefundenen Taxa einen Mix aus lokal vorkommenden Taxa und aus Signalen, die von Stellen weiter flussaufwärts stammen, darstellen.

Ähnlich haben Fernández et al. (2018) Makroinvertebraten untersucht, indem sie ein herkömmliches Monitoring mit einer eDNA-Probenahme an sechs Stellen des spanischen Flusses Nalón verglichen haben. Sie haben drei verschiedene Barcodes getestet: Zwei davon basierten auf 18S und einer auf der COI-Region. Die Überlappung mit herkömmlichen Methoden war mit dem COI-Barcode grösser (56,3%) als mit 18S (20,6%). Allerdings blieben einige Familien (Chloroperlidae, Elmidae, Lumbricidae, Phylopotamidae und Sphaeriidae) von allen drei Barcodes unentdeckt. Die Ergebnisse zeigten, dass die verschiedenen Barcoderegionen auf unterschiedliche taxonomische Gruppen abzielen. Die relevantesten Nachweise mit COI erfolgten bei den folgenden Stämmen in absteigender Reihenfolge: Gliederfüsser > Nesseltiere > Ringelwürmer > Weichtiere, wobei sich die Stämme und ihre Reihenfolge für 18S unterschieden (Nematoden > Schwämme > Gliederfüsser > Nesseltiere). Insgesamt wurden mit dem COI-Primer mehr Familien nachgewiesen als mit einer herkömmlichen Probenahme. Die 18S-Primer stellten die geringste Anzahl Familien fest.

8.3.2 Bulk-DNA (Mischprobe)

Elbrecht und Kollegen (2017) führten eine Studie durch, bei der sie die ökologischen Qualitätsquotienten (EQR) von 18 beprobten finnischen Flussabschnitten auf der Grundlage morphologischer und molekularer Identifizierung verglichen. Dazu sammelten die Wissenschaftler benthische Makroinvertebraten gemäss den nationalen Monitoringrichtlinien mit einem Kicknetz und konservierten die Proben im Feld. Morphologische Analysen wurden von Experten im Rahmen des routinemässigen nationalen Monitoringprogramms durchgeführt. Die Proben wurden auf Art- oder Gattungsniveau bestimmt, ausser bei Wenigborstern, Plattwürmern, Nematoden, Hydrozoen und den Zweiflüglerfamilien der Zuckmücken und der Kriebelmücken. Nach der morphologischen Bestimmung wurden die Proben getrocknet, homogenisiert und für die DNA-Extraktion verwendet. Das Metabarcoding der Gewebe-DNA erfolgte mit universellen COI-Primern, die für Makroinvertebraten angepasst wurden (Elbrecht & Leese, 2017). Die

Ergebnisse der morphologischen und der DNA-basierten Bewertung zeigten eine signifikante Korrelation, und die ermittelten Kategorien aus den zwei Bewertungen unterschieden sich nur gelegentlich in einem Bewertungspunkt (z. B. «gut» statt «mittel»). Mit dem Metabarcoding-Ansatz wurden mehr als doppelt so viele Taxa nachgewiesen und die taxonomische Auflösung wurde verbessert, wo die morphologische Identifizierung auf Familien- (Limnephilidae) oder Gattungsniveau (Eloeophila, Hydroptila, Baetis-Komplex) beschränkt war. Allerdings wurden mit diesem Ansatz rund $32,5 \pm 9,7\%$ der Taxa pro Probe aus verschiedenen Gründen nicht identifiziert, etwa wegen Primerverzerrung, unvollständiger Referenzdatenbank oder schlechter DNA-Konservierung. Die Autoren der Studie empfehlen, Ethanol molekularbiologischer Qualität zu verwenden, um Proben im Feld zu konservieren und die Qualität der Bulk-DNA zu verbessern.

8.4 Biotische Indizes

8.4.1 Molekularer Diatomeen-Index Schweiz (MDI-CH)

Für die Beurteilung des ökologischen Zustands von Flüssen und Bächen empfiehlt die geltende Gesetzgebung die Verwendung von benthischen Kieselalgen. Ausgewählt wurden die Kieselalgen wegen ihrer hohen Sensibilität gegenüber Umweltbedingungen und ihrer raschen Reaktion auf Veränderungen von physikalisch-chemischen und biologischen Faktoren. In verschiedenen Ländern wurden viele biotische Indizes entwickelt, um die Umweltbelastung mithilfe von Kieselalgen zu beurteilen. Diese Indizes basieren meist auf der relativen Häufigkeit von Arten, die nach ihrem autökologischen Wert gewichtet sind. In der Schweiz charakterisiert der Diatomeen-Index Schweiz (DI-CH) den biologischen Zustand der Fliessgewässer anhand der Häufigkeiten und der Verteilung von über 400 Kieselalgenarten respektive Morphotypen (Hürlimann & Niederhauser, 2007). Der DI-CH basiert auf chemischen Parametern, die anthropogene Belastungen anzeigen und die Wasserqualität in fünf verschiedene ökologische Zustandsklassen auf einer Skala von 1 bis 8 einteilen. Die Berechnung erfolgt gemäss der gewichteten Mittelwertbildung, die einen autökologischen Wert D und einen Gewichtungsfaktor G verwendet, die für jede Art spezifisch sind. Sie umfasst zudem einen zusätzlichen Parameter H, der der relativen Häufigkeit eines bestimm-

ten Taxons in der Probe beschreibt. Üblicherweise wird der Diatomeen-Index Schweiz (DI-CH), wie die Diatomeen-Indizes in anderen Ländern, auf der Basis von mikroskopischen Analysen von Kieselalpengemeinschaften berechnet. Die Kieselalgen werden aus Biofilmproben isoliert und die Kieselalgeschalen werden anhand der Richtlinien bestimmt (Hürlimann & Niederhauser, 2007), die ausserdem die ökologischen Werte und Gewichtungsfaktoren für jede Morphospezies umfassen.

Ein molekularer Index könnte für die routinemässige Beurteilung einige Vorteile bringen. Erstens wird die Qualitätsbeurteilung mit dem morphologischen Index vergleichbar sein und kann daher einfach als Ergänzung zur herkömmlichen Methode verwendet werden. Ausserdem könnte ein molekularer Index für grossangelegte Erhebungen hilfreich sein, da mehr Proben gleichzeitig im Labor verarbeitet werden können. Seit 2014 wurden in Europa viele Studien durchgeführt, um die Anwendung von eDNA-Metabarcoding zur Beurteilung der Zusammensetzung von Kieselalpengemeinschaften und zur Berechnung von Wasserqualitätsindizes zu testen (Kerमारrec et al., 2014; Zimmerman et al., 2015; Vasselon et al., 2017a; Keck et al., 2018). Ziel dieser Studien war es, verschiedene Marker zu testen, die Referenzdatenbank zu vervollständigen und die Korrelation zwischen morphologischen und molekularen Daten hinsichtlich der Artenzusammensetzung und/oder des Wertes des Wasserqualitätsindex zu analysieren. In der Schweiz wird der Molekulare Diatomeen-Index Schweiz (MDI-CH) momentan entwickelt und liefert bereits äusserst vielversprechende Ergebnisse (Visco et al., 2015; Apothéloz-Perret-Gentil et al., 2017). Die laufenden Studien erweitern das geografische Gebiet der Probenahmestellen, indem Kieselalgendaten aus NAWA-SPEZ- und NAWA-TREND-Kampagnen (BAFU, 2013) analysiert werden, auch über das EU-Interreg-Programm SYNAQUA (Lefrançois et al., 2017) sowie in Zusammenarbeit mit den Schweizer Kantonen, Umweltbüros und den französischen Forschern des Institut national de la recherche agronomique (INRA).

8.4.2 Genetic Oligochaete Index of Sediment Bioindication

Sedimente sind ein wesentlicher Bestandteil von Ökosystemen in Flüssen und Seen und haben zudem die Eigenschaft, gewisse Typen von Schadstoffen anzureichern.

Einige Schadstoffe können genügend hohe Konzentrationen erreichen, um sich nachteilig auf benthische Organismen auszuwirken und damit das Funktionieren des Ökosystems zu stören. Wenigborster sind gute Bioindikatoren für die Sedimentqualität, da ihr Lebensraum sich auf dieses Kompartiment beschränkt, sie nur wenig mobil sind und ihre Ernährung hauptsächlich durch die Aufnahme von Feinsedimenten erfolgt. Ausserdem umfasst die Gruppe eine grosse Anzahl Arten, die ein breites Spektrum an Belastungssensitivität abdecken (Rodriguez & Reynoldson, 2011), und kommen sie in Sedimenten allgemein häufig vor (Vivien et al., 2014). Verschiedene biologische Indizes, die auf der Untersuchung von Wenigborstergemeinschaften basieren, wurden für die Beurteilung der biologischen Qualität in Sedimenten in Fliessgewässern entwickelt. Von diesen Indizes erlaubt es der Oligochaetes Index of Sediment Bioindication (IOBS), die biologische Qualität von feinen/sandigen Sedimenten in Bächen zu beurteilen (AFNOR T90-393 2016), und der Oligochaete Index of Lake Bioindication (IOBL-Index) beschreibt sowohl den Funktionszustand als auch die biologische Qualität von Sedimenten (AFNOR T90-393 2016). Der IOBS-Index wurde in der Schweiz zehn Jahre lang als Teil der Programme zur Überwachung der Qualität der Fliessgewässer sowie auf Ad-hoc-Basis eingesetzt (Vivien et al., 2014, 2015a). Weiter wurden in der Schweiz Wenigborstergemeinschaften jahrzehntelang regelmässig untersucht, um die biologische Qualität von Seesedimenten zu beurteilen. Allerdings erfordert die Einführung von Wenigborsterindizes fundiertes Know-how hinsichtlich der Taxonomie von Wenigborstern. In diesem Zusammenhang würde es die Entwicklung eines Indexes, der auf der Identifizierung von Wenigborstern anhand von genetischen Barcodes beruht, erlauben, die Probleme im Zusammenhang mit der Identifizierung einer Art und einer breiteren Verwendung von Wenigborstern als Bioindikatoren zu lösen.

Seit 2013 wird in der Schweiz ein Projekt zur Entwicklung von genetischen Wenigborsterindizes durchgeführt. Das Projekt führte zur Schaffung einer Referenzdatenbank mit DNA-Barcodes aquatischer Wenigborster, die auf der Analyse von in der Schweiz gesammelten Proben basiert (Vivien et al., 2015b). Parallel zur Entwicklung von Referenzdatenbanken wurden DNA-Metabarcoding-Verfahren eingesetzt, um die Sedimentqualität mithilfe von Wenigborstern zu beurteilen. Die Vorstudien zeigen, dass trotz

signifikanter Unterschiede zwischen den morphologischen und molekularen Verfahren hinsichtlich des Vorkommens/ Fehlens und der Häufigkeiten von Taxa die Entwicklung solcher Verfahren möglich war, indem die Indexberechnung und die Abgrenzung von Qualitätsklassen angepasst wurden (Vivien et al., 2016, 2019). Eine weitere Methode, die auf einem Hochdurchsatz-Barcoding von Wenigborstern basiert, wurde als Teil des Interreg-Projekts SYNAQUA validiert (Lefrançois et al., 2017). Sie hat den Vorteil, dass verlässliche und genaue Häufigkeitsschätzungen für Arten an einem bestimmten Ort möglich sind. An allen getesteten Standorten (Bach und See) stimmten die Diagnosen der biologischen Qualität, die mit morphologischen und molekularen Verfahren erstellt wurden, überein (Vivien et al., 2019).

9 Schlussfolgerungen und Ausblick

Der Nachweis von DNA bestimmter Arten in Umweltproben und die Skalierbarkeit von metabarcodingbasierten Technologien eröffnen fundamental neue Möglichkeiten, wie Biodiversität überwacht und biologische Bewertungen durchgeführt werden. Die in dieser Publikation zusammengefassten und beschriebenen Nachweisttechnologien und -verfahren bieten gegenüber herkömmlichen Ansätzen einige bedeutende Vorteile. Der wichtigste Vorteil ist die Möglichkeit, ein sehr breites Spektrum an Organismen – von Mikroben über Pflanzen bis zu Tieren – mit einem eDNA-basierten Verfahren zu identifizieren und zu überwachen. Dies erlaubt nicht nur die Integration und eine bessere Auflösung herkömmlicher Bioindikatorgruppen, die bereits im Biodiversitätsmonitoring und bei biologischen Bewertungen verwendet werden, sondern eröffnet auch die Möglichkeit, bisher wenig oder gar nicht beachtete Gruppen zu diesem Zweck einzusetzen. Beispielsweise werden höchst vielfältige Gruppen wie Zweiflügler oder Wenigborster in herkömmlichen Verfahren selten einbezogen, da sie auf Artenniveau schwierig zu identifizieren sind. Dies obwohl sie zusätzliche und äusserst wertvolle Informationen zum Biodiversitätszustand und zum Ökosystem liefern könnten. eDNA-basierte Technologien können eine solche Nutzung ermöglichen. Ausserdem bergen die in dieser Publikation beschriebenen und zum Teil bereits umgesetzten Technologien die Möglichkeit einer (halb-)automatisierten Durchführung. Durch den Einsatz von Laborrobotern, den raschen Fortschritt der Sequenzierungstechnologien und die Möglichkeit, die eDNA-Probenahme mit der regelmässigen Wasserbeprobung für chemische Analysen zu verknüpfen, besteht die Möglichkeit, mehr Daten rascher und günstiger bereitzustellen.

Ein weiterer grundlegender Vorteil besteht darin, dass die Probenahme für makrobielle Organismen in allen beschriebenen eDNA-Verfahren nichtinvasiv ist, da deren Vorkommen aus in der Umwelt hinterlassen DNA-Spuren abgeleitet wird. Die Nachweismöglichkeit von Organismen in der Umwelt, ohne sie zu sammeln oder ihnen zu schaden, ist besonders wichtig für seltene oder gefährdete Arten oder falls eine solche Probenahme ethisch problematisch oder eingeschränkt ist. Dies ist hauptsächlich der Fall bei Fischen, Amphibien oder anderen Wirbeltieren, bei

denen eine herkömmliche Probenahme häufig eine direkte Manipulation der Organismen oder gar das Töten des Individuums erfordert. Es ist daher ein grosser Vorteil, wenn äquivalente Informationen zum Vorkommen dieser Arten mithilfe einer Umweltprobe gewonnen werden können.

Die Verwendung von eDNA-Proben zur Bewertung der Biodiversität oder zur Bioindikation erlaubt zudem eine Arbeitsteilung: Die Probenahme im Feld ist weniger von spezifischen Technologien oder Infrastrukturen abhängig, und Personen können relativ einfach geschult werden. Daher kann die Probenahme im Feld unkompliziert von den Anspruchsgruppen selbst vorgenommen werden. Die eDNA-Proben können danach gelagert und zu spezialisierten Molekularlabors transportiert werden. Anschliessend können diese Labors grosse Mengen an Proben bei einem hohen Standardisierungsgrad verarbeiten. Dies und das allgemein schnellere Probenahmeverfahren können dazu führen, dass (räumlich und zeitlich) mehr Proben genommen werden können. Eine höhere räumliche Probenahmeabdeckung wird die Auflösung der Biodiversitätsdaten steigern und das Management effektiver gestalten.

Zwar bietet die «neue Generation» von biologischen Untersuchungen und biologischen Bewertungen mithilfe von eDNA-basierten Instrumenten viele innovative Möglichkeiten, aber sie bringt auch einige Herausforderungen mit sich. Die hier vorgestellten eDNA-Verfahren basieren auf modernen Biotechnologien, die raschen Veränderungen und Verbesserungen unterworfen sind. In der momentanen Periode der Entwicklung und des Übergangs ist es nicht einfach, langlebige Standards zu definieren und einzuführen. Deshalb werden Entwicklungen in der Methodik voraussichtlich einige Empfehlungen in diesem Bericht beeinflussen.

Gewisse Herausforderungen der eDNA-Verfahren werden wegen der spezifischen Eigenschaften der eDNA vermutlich nicht überwunden werden können. So liefert eDNA beispielsweise keine Informationen zur demografischen Struktur, zum Alter oder zum Gesundheitszustand von Individuen oder dazu, ob die Lebewesen bei der Probenahme lebten oder bereits tot waren. Ausserdem ist es wegen diverser biologischer und technischer Faktoren

schwierig, die effektive Anzahl Organismen (d. h. die Häufigkeit) aus den Metabarcoding-Daten abzuleiten. Zwar konnte der Bezug zwischen der Anzahl Sequenzen und der Biomasse oder der Häufigkeit für bestimmte Fischarten festgelegt werden, aber es gibt noch keine universellen Analyseinstrumente für eine verlässliche Erhebung von quantitativen Häufigkeitsdaten. Allerdings könnte dieses Problem insbesondere für artenspezifische Verfahren lösbar sein.

Daten, die mit eDNA-Verfahren erzeugt werden, können sich von herkömmlichen Ansätzen hinsichtlich Qualität und Quantität unterscheiden. So gewonnene Informationen sind nicht unbedingt besser oder schlechter als herkömmliche Verfahren, können sie aber häufig ergänzen. Es ist wichtig, die neuen Ansätze nicht dadurch zu limitieren, dass allfällige Einschränkungen herkömmlicher Methoden durch deren teilweise Verwendung weiterbestehen. Während das Metabarcoding von Mischproben Diversitätsdaten ergibt, die relativ direkt mit der herkömmlichen Probenahme per Kicknetz vergleichbar sind, kann dieser Ansatz nicht über die Kicknetz-Probenahme und die Sortierung der Proben hinaus beschleunigt werden. Im Gegensatz werden individuelle Datenpunkte aus reinen eDNA-Ansätzen eher mit einer höheren Unsicherheit assoziiert sein und müssen in einer probabilistischen und nicht in einer deterministischen Sichtweise interpretiert werden. Die Analyse und die Interpretation dieser Daten werden andere statistische Ansätze, wie Bayes'sche Statistik, und ein besseres Verständnis von falsch-positiven im Vergleich zu falsch-negativen Datensätzen oder der Herkunft dieser Fehler erfordern. Doch während in diese Richtung viel geforscht wird, geschieht die Unsicherheitsquantifizierung für rein beobachtungsbasierte Verfahren im Allgemeinen nicht. Ausserdem unterscheiden sich möglicherweise Umfang und Schlussfolgerungen in räumlicher und zeitlicher Hinsicht. eDNA beschreibt eher regionale (Wassereinzugsgebiet) als lokale Eigenschaften, könnte aber je nach beprobter Umgebung in einer viel höheren zeitlichen Auflösung entnommen werden.

Letztlich soll die Verwendung von eDNA-Technologien nicht die herkömmlichen Verfahren ersetzen, sondern deren volles Potenzial nutzen, um das Biomonitoring allgemein zu verbessern und auszudehnen. Hochdurchsatz-Metabarcoding erzeugt beispielsweise enorme

Mengen an Sequenzierungsdaten, die oft keinen Taxa in der Datenbank zugeordnet werden können, die aber wichtige ökologische Informationen enthalten können. Heute ist es mithilfe von Instrumenten der künstlichen Intelligenz wie überwachtem maschinellem Lernen möglich, diese nicht zugeordneten Sequenzierungsdatensätze durch einen Vergleich mit einer Referenzdatenbank mit Millionen von Sequenzen einem bekannten ökologischen Zustand zuzuordnen. Der enorme Vorteil dieser Art von Analysen besteht darin, dass sie nicht nur die Präsenz bzw. das Fehlen einer Art oder ihre relative Häufigkeit berücksichtigen, sondern auch Netzwerkanalysen beinhalten, die Informationen zu den Beziehungen zwischen verschiedenen Arten und ihrer Reaktion auf Umweltvariablen liefern.

Insgesamt überzeugen die Vorteile und die Chancen wiegen die Herausforderungen auf, was uns zuversichtlich stimmt, dass die biologischen Untersuchungen und die biologische Bewertung künftig eDNA-Ansätze umfassen werden. Wir hoffen, dass diese Publikation das Verständnis eDNA-basierter Verfahren erleichtern und zu deren Verbreitung und Umsetzung beitragen wird.

10 Probenahmeprotokolle

10.1 eDNA im Wasser

Dieses Protokoll wurde für die eDNA-Probenahmekampagne NAWA TREND 2018/2019 für kleine Fließgewässer entwickelt. Es soll als Richtlinie für die manuelle Filtration von eDNA-Wasserproben gelten und basiert auf bestem Wissen, bezieht aber auch praktische Aspekte mit ein. Ganz allgemein gilt es, auf eine saubere Arbeitsweise zu achten, um Kreuzkontaminationen zu minimieren. Ausserdem braucht es eine durchgehende Kühlkette der eDNA-Proben für erfolgreiche Ergebnisse.

Bemerkung: Dieses Protokoll kann einfach für die Filtration mit Vakuum-Pumpen modifiziert werden. Dies kann bei grösseren Wasservolumina oder grösseren Anzahl Proben von Vorteil sein.

Material

Pro Probenahmestelle:

- 2 sterile 50-ml-Einwegspritzen
- 4 Sterivex-Filter
- 8 Luer-Verschlusskappen
- 2 verschliessbare Plastikbeutel

Zusätzliches Feldmaterial:

- 1 l deionisiertes oder destilliertes Wasser und ein steriles Skalpell für Negativkontrollen
- Wasserfester Stift zur Beschriftung
- Kühlbox mit Kühlelementen, um eDNA-Proben bei der Feldarbeit zu lagern
- Handschuhe
- Abfallsack



Feld-Probenahmeprotokoll

1. Handschuhe anziehen.



2. Neue Spritze aus der Verpackung entnehmen.



3. Sterivex-Filter aus der Verpackung entnehmen.



6. Schrauben Sie den Sterivex-Filter auf die volle Spritze.



4. Probe vom Ufer aus entnehmen. Vermeiden Sie es, in das Gewässer zu steigen, um Kreuzkontaminierungen zu verhindern und keine Sedimente aufzuwirbeln. Wählen Sie eine repräsentative Stelle aus und entnehmen Sie das Wasser rund 30 cm vom Ufer entfernt. Entnehmen Sie Wasser rund 5 cm unterhalb der Oberfläche.



7. Drücken Sie das Wasser mit gleichmässiger Geschwindigkeit durch den Filter. Am besten halten Sie den Filter, damit Sie ihn nicht verlieren, falls er abfallen sollte.



5. Füllen Sie die Spritze direkt mit Wasser aus dem Gewässer, entnehmen Sie genau 50 ml ohne Luftblasen. Sollten Luftblasen vorhanden sein, halten Sie die Spritze mit der Spitze nach oben und lassen Sie sie entweichen.



8. Schrauben Sie den Sterivex-Filter von der Spritze ab.



9. Wiederholen Sie die Schritte 5 – 8 zehnmahl, um 500 ml Wasser zu filtrieren. Wenn viele Schwebstoffe vorhanden sind, müssen Sie für 500 ml allenfalls mehrere Filter verwenden. In diesem Fall ist es wichtig, das filtrierte Volumen zu notieren.

10. Schrauben Sie den Sterivex-Filter von der Spritze ab und füllen Sie die Spritze mit Luft. Schrauben Sie den Sterivex-Filter auf die Spritze.



13. Schliessen Sie das Filtergehäuse mit Luer-Verschlußkappen auf beiden Seiten ab.



11. Drücken Sie Luft mit gleichmässiger Geschwindigkeit durch den Filter, um das Wasser aus dem Filtergehäuse zu entfernen.

Vor dem Herausdrücken der Luft



Nach dem Herausdrücken der Luft:



12. Legen Sie die Spritze zurück in die Verpackung.



14. Beschriften Sie den abgeschlossenen Sterivex-Filter mit einer eindeutigen Kennzeichnung.



15. Legen Sie das Filtergehäuse in den verschliessbaren Plastikbeutel und beschriften Sie diesen mit Probenahmeort und Uferseite.



16. Legen Sie den Plastikbeutel in die Kühlbox.



17. Notieren Sie das filtrierte Volumen.

18. Nehmen Sie den zweiten Sterivex-Filter und wiederholen Sie die Schritte 4–14 mit derselben Spritze.

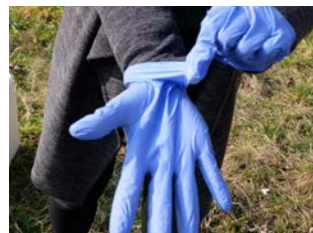


19. Legen Sie den zweiten Sterivex-Filter in den Plastikbeutel mit dem ersten Sterivex-Filter. Verschliessen Sie den Beutel ordnungsgemäss und legen Sie ihn in die Kühlbox.



20. Wiederholen Sie die Schritte 2–19 auf der anderen Uferseite. Die eDNA muss oberhalb der durchwaten Stelle entnommen werden, um Kontaminationen zu reduzieren.

21. Notieren Sie das filtrierte Volumen und entsorgen Sie die Handschuhe.



22. Nach der Feldarbeit müssen die Beutel mit den Filtern bis zur Extraktion bei -20°C gelagert werden.

Feld-Probenahme von eDNA für Negativkontrolle (auch als «Feld-Leerwertkontrolle» bezeichnet)

Gehen Sie wie bei den eben beschriebenen eDNA-Proben vor. Verwenden Sie jedoch statt Flusswasser deionisiertes oder destilliertes Wasser für die Filtration sowie ein neues Paar Handschuhe. Die Negativkontrolle sollte nur an der Feld-Probenahmestelle geöffnet werden. Der Behälter kann mit einem sterilen Skalpell geöffnet werden, falls die Spritze nicht in die Öffnung des Behälters passt.



10.2 Sediment

Material (Einwegmaterial)

- Handschuhe
- 50-ml-Spritze
- Plastiktasse
- Plastikrührstab
- 50-ml-Röhrchen



Hinweis: Das Ende der Spritze ist vor der Probenahme abzuschneiden. Dazu kann ein Messer oder eine Säge verwendet werden, das bzw. die mit Chlorbleiche gereinigt wurde. Dekontaminieren Sie die abgeschnittene Spritze vor der Probenahme eine Stunde lang mit UV-Licht.

Hinweis: Dieses Protokoll wurde für Feinsediment erstellt. Bei groben Sedimentpartikeln kann es allenfalls nicht die gewünschte Wirkung erzielen. Schaben Sie in diesem Fall die Oberfläche des Sediments mit einem sterilen Löffel ab und geben Sie es in die Plastiktasse. Wiederholen Sie die Probenahme dreimal.

Protokoll

1. Nachdem Sie den Kolben entfernt haben, drücken Sie die Spritze bis zur 50-ml-Marke in das Sediment.



2. Setzen Sie den Kolben wieder ein und drücken Sie die restliche Luft heraus. Entfernen Sie dann die Spritze aus dem Sediment. Der Sedimentkern muss sich in der Spritze halten. Achtung: Bei diesem Schritt können gröbere Sedimentpartikel herunterfallen.



3. Es ist je nachdem wichtig, die Sedimentoberfläche zu entfernen, damit kein Phytobenthos gesammelt wird. Drücken Sie in diesem Fall das Sediment bis zur 20-ml-Marke herunter.



4. Drücken Sie 10 ml Sediment in die Plastiktasse und spülen Sie die Spritze im Fluss aus.



5. Wiederholen Sie die Schritte 1–4 dreimal an verschiedenen Stellen im Fluss.
6. Vermischen Sie alle Sedimentproben mit dem Plastikrührstab und geben Sie das Sediment in das 50-ml-Röhrchen.



7. Beschriften Sie das Röhrchen und frieren Sie es bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ein. Geben Sie an, ob für die Probenahme das Sediment als Kern oder durch Schaben entnommen wurde.

10.3 Biofilm

Material (Einwegmaterial)

- Zahnbürsten
- Plastikteller
- Sterile Pipetten
- 3 × 2-ml-Röhrchen mit DNA-Konservierungspuffer
- Verschlussbarer Plastikbeutel



Hinweis: Das Probenahmeverfahren basiert auf dem Diatomeen-Modul, das vom Bundesamt für Umwelt publiziert wurde (Hürlimann & Niederhauser, 2007). Die Anforderungen für eine morphologische Probenahme gelten auch für die molekulare Anwendung.

Hinweis: An jeder Probenahmestelle werden drei Proben (Replikate) entnommen und in drei Probenahmeröhrchen gegeben.

Hinweis: Das Probenahmematerial ist nach der Verwendung zu entsorgen. Für jede Probenahmestelle wird neues Probenahmematerial verwendet. Die gleichen Steine können sowohl für die morphologische als auch für die molekulare Analyse verwendet werden.

Protokoll

1. Machen Sie die Zahnbürste im Flusswasser nass.
2. Sammeln Sie gemäss dem Probenahmeverfahren des Diatomeen-Moduls mit dem Einwegmaterial 3 bis 5 Steine (Hürlimann & Niederhauser 2007).



3. Schaben Sie die Oberfläche der Steine mithilfe einer Einwegzahnbürste über dem Plastikteller ab.



4. Sammeln Sie mit der Pipette etwa 1 ml Biofilm und geben Sie ihn in ein bereitgestelltes Röhrchen mit dem Konservierungspuffer. Wiederholen Sie diesen Schritt dreimal für jede Probenahmestelle.



5. Beschriften Sie die drei Röhrchen und füllen Sie in der Liste die Probenahmedetails aus.
6. Legen Sie die Röhrchen in den verschliessbaren Plastikbeutel und lagern Sie sie bei -20°C .

11 Bewährte Praktiken und Dokumentation von Verfahren für eDNA-Ansätze

Die folgende Liste führt die wichtigsten relevanten Aspekte auf, die für eine replizierbare Nutzung von eDNA für Einzelartnachweise und Metabarcoding durch Anspruchsgruppen abzudecken sind. Diese Punkte entsprechen allgemein anerkannten Mindestnormen, die für eine vergleichbare Verwendung und Anwendung von eDNA-Verfahren zu erfüllen sind. Die Checkliste soll insbesondere Fachpersonen/Anspruchsgruppen helfen, die wichtigen Aspekte zu identifizieren, die es für auf eDNA basierenden Biodiversitätsmonitorings und biologische Bewertungen zu beachten gilt.

Probenahme

Die folgenden Punkte stellen wichtige Richtlinien dar, die von jeglichen Personen, die eDNA-Probenahmen durchführen – also höchstwahrscheinlich von den Fachpersonen selbst –, einzuhalten sind.

- Personen, die eDNA-Proben entnehmen, müssen dafür speziell geschult werden.
- Das Probenahmeverfahren (z. B. Ausfällen, Filtration, Probenahmeverfahren, Mischprobenahme) und sämtliches Probenahmematerial (Filtertyp usw.) ist genau zu dokumentieren.
- Der Einsatz von Einwegmaterial (z. B. Handschuhe, Einwegfilter, Einwegzahnbürsten für das Sammeln von Kieselalgen) ist klar anzugeben und vom wiederverwendbaren Material zu unterscheiden.
- Die Reinigungsverfahren für wiederverwendbare Feldausrüstung sind dokumentiert und klar. Die Reinigungsverfahren müssen DNA entfernen/abbauen. Der Einsatz von Ethanol ist nicht ausreichend. Die Gegenstände müssen mindestens eine Minute in Chlorbleiche (Natriumhypochlorit, NaOCl) in einer Mindestkonzentration von 1,5 % NaOCl eingelegt und anschliessend mit DNA-freiem Wasser gespült werden, um alle Chlorbleichespuren zu entfernen. Eine Behandlung mit UV-Licht, «DNA away» oder ähnlichen Produkten ist ebenfalls möglich.
- Es muss eine detaillierte Beschreibung der Probenahmestelle, einschliesslich der geografischen Koordinaten und der Wassertiefe, falls relevant, vorliegen.

- Geeignete Negativkontrollen sind im Feld zu entnehmen und während des gesamten Laborablaufs zu analysieren.
- Die Aufbewahrung von Proben (lückenlose Tiefkühlkette oder Verwendung geeigneter Pufferlösungen) muss gewährleistet und dokumentiert sein.

Laborumgebung

Die Umgebung von Labors, die auf eDNA basierende Arbeiten durchführen, sollte einer Zertifizierung unterstehen. Das Molekularlabor muss die Norm ISO 17025 oder eine gleichwertige Norm erfüllen. Ausserdem sollten folgende Punkte insbesondere für eDNA-Analysen geklärt werden.

- Das Labor, in dem eDNA extrahiert und anschliessend analysiert wird, muss gemäss bewährten Praktiken organisiert sein, um eine hohe Qualität der eDNA-Analysen zu gewährleisten. Insbesondere muss es über besondere Räumlichkeiten und eine spezielle Ausrüstung für die eDNA-Extraktion, für die Schritte vor und nach der PCR verfügen, wie in Kapitel 5 angegeben.
- Post-PCR-Produkte sowie die Ausrüstung, die für den Umgang mit Post-PCR-Produkten verwendet wird (z. B. Pipetten), dürfen nie in das Reinlabor gelangen. Der Arbeitsfluss von Produkten und Personal muss in einer Arbeitsrichtung erfolgen.
- Idealerweise verfügt das Reinlabor über einen Luftüberdruck, um Kontaminationen zu verhindern. Die Luft, die über Lüftungssysteme in das Reinlabor gelangt, muss gefiltert werden, um Kontaminationen zu vermeiden (z. B. mit einem HEPA-Filter).
- Das Reinlabor muss über einfach zu reinigende Wände und Möbel verfügen (Reinigung z. B. mit Chlorbleiche oder anderen DNA-abbauenden Substanzen; Ethanol reicht nicht aus), und die Reinigung hat regelmässig zu erfolgen.
- Das Laborpersonal im Reinlabor muss Schutzkleidung tragen, um eine Kontamination der Proben zu verhindern.

- Alle Arbeiten haben vorzugsweise unter Abzugshauben zu erfolgen, um die Proben vor Kontaminationen zu schützen.
- Für die Vorbereitung DNA-freier Reagenzien wie Primeraliquote und anderer Chemikalien sind separate und klar gekennzeichnete Laborinstrumente (Pipetten, Sterilbank usw.) und Flächen zu verwenden.

Arbeit im Molekularlabor

Da der Bereich der eDNA und verwandter Technologien aktuell einem raschen Wandel unterworfen ist, sind genaue Dokumentationen der Arbeitsschritte von grundlegender Bedeutung. Wichtige Punkte werden in der Liste aufgeführt.

- Detaillierte Laborprotokolle, die bei jedem Schritt – von der eDNA-Extraktion bis zur Sequenzierung, einschliesslich PCR-Primern und PCR-Bedingungen – verwendet werden, müssen vorhanden sein oder es muss darauf verwiesen werden.
- Negativ- und Positivkontrollen müssen einbezogen und ihre Ergebnisse angegeben werden.
- Das Validierungsniveau (www.edna-validation.com) für artenspezifische Testverfahren muss angegeben werden.
- Die Anzahl technischer Replikate und deren Verarbeitung sind zu dokumentieren.
- Die Merkmale der Sequenzierungsplattform und die spezifischen Einstellungen für die Sequenzierungsdurchgänge müssen angegeben werden.
- Die langfristige Lagerung von eDNA-Extrakten und anderen Produkten der molekularen Analysen sollte in einer besonderen Vereinbarung geregelt werden.

Datenverarbeitung und -speicherung

Jegliche Aspekte hinsichtlich der Verarbeitung und Speicherung von Daten müssen zwischen Kunden und Subunternehmern diskutiert und im Vertrag eindeutig geregelt werden.

- Der Subunternehmer kann gebeten werden, Folgendes in offenen Datenbanken bereitzustellen:
 - Die vollständigen Sequenz-Rohdaten (unveränderter Output des Sequenzierers)
 - Die gefilterten Sequenzdaten (nach der bioinformatischen Verarbeitung)
 - Die Tabelle mit den OTUs/ASVs mit den relativen Häufigkeiten (nach der taxonomischen Zuordnung)
- Der Bericht der Sequenzdatenanalysen muss Folgendes umfassen:
 - Eine Referenz oder eine Dokumentation zur bioinformatischen Pipeline, die für die Sequenzdatenanalyse verwendet wurde, insbesondere die für das Filtern der Sequenzdaten verwendeten Parameter und Schwellenwerte
 - Eine Referenz zur Datenbank, die für die taxonomische Zuordnung verwendet wurde
 - Eine Dokumentation der statistischen Analysen und die Interpretation ihrer Ergebnisse

Glossar

Adapter

Kurze Nukleotidsequenzen, die im Hochdurchsatzverfahren mit DNA-Sequenzen ligiert werden. Adapter werden verwendet, um DNA-Sequenzen während der bioinformatischen Analyse zur Originalprobe zurückzuverfolgen.

Amplikon

Ein DNA-Fragment, das per PCR amplifiziert wurde.

Amplikon-Sequenzvarianten (ASVs)

Individuelle DNA-Sequenzen, die per Hochdurchsatz-Amplikonsequenzierung erzeugt wurden, nachdem während der PCR-Amplifikation und -Sequenzierung fälschlicherweise entstandene Sequenzen entfernt wurden.

Bulk-Probe

Eine Mischprobe, die aus ganzen Organismen und deren Fragmenten besteht, die aus der Umwelt stammen und die manuell gesammelt werden (z. B. mit einer Kicknetz-Probenahme).

Chimäre

Genomische Artefakte, die während der PCR-Amplifikation durch die Kombination von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Herkunft erzeugt wurden.

Clustering

Das Zusammenfügen ähnlicher Sequenzen auf der Basis einer festgelegten Ähnlichkeitsschwelle oder einer anderen Methode, die zur Bildung von OTUs führt (siehe unten).

Kontamination

Vorhandensein von Fremd-DNA, die nicht aus der Probe stammen.

Kryptische Arten

Arten, die nicht anhand morphologischer Merkmale unterschieden werden können.

Digitale PCR (dPCR)

Ein PCR-Verfahren, bei dem eine Probe in Tausende von Teilproben aufgeteilt wird (Tröpfchen in der digitalen Droplet-PCR). Eine PCR-Reaktion erfolgt innerhalb jeder

Teilprobe, und die erfolgreiche Amplifikation wird durch Fluoreszenz nachgewiesen

DNA-Barcodes

Kurze DNA-Fragmente eines genetischen Markers, der die Identifizierung von Arten ermöglicht.

DNA-Extraktion

Ein Laborverfahren, das sich aus chemischen und physikalischen Schritten zusammensetzt, um DNA aus Zellen oder anderem Material freizusetzen und zu reinigen.

DNA-Ausfällen

Ein Verfahren zur Konzentration von DNA aus einer wässrigen Lösung durch das Zusetzen von Salz und Ethanol, was zum Absetzen (d. h. zum Ausfällen) von DNA führt.

Umwelt-DNA (eDNA, *sensu lato*)

Pool genomischen Materials aus lebenden Organismen oder deren Spuren (wie Hautzellen, Schleim, Schuppen, Urin, Kot, Speichel, Gameten oder abgestorbene Reste), die in verschiedenen Umgebungen wie Wasser, Sediment, Boden oder Luft vorhanden sind.

Genetische Marker

Eine genomische DNA-Region (z. B. Fragment des COI Gens oder V9 Region des 18S rRNA Gens), die eine Identifizierung einer Art innerhalb einer bestimmten taxonomischen Gruppe erlaubt.

Hochdurchsatz-Sequenzierung (HTS)

Eine Methode, bei der Millionen von DNA-Sequenzen durch massiv-parallele Sequenzierungstechnologien erzeugt werden, auch bekannt als Next-Generation-Sequenzierung (NGS).

Library

Eine Sammlung von DNA-Fragmenten, die für die Hochdurchsatz-Sequenzierung vorbereitet wurden. Jedes DNA-Fragment ist mit spezifischen Adaptern an beiden Enden versehen.

Metabarcoding

Die Sequenzen, die aus Metabarcoding stammen und durch eine Hochdurchsatz-Amplikonsequenzierung entstanden sind.

Metabarcoding

Ein Verfahren, um mehrere Arten in einer komplexen Probe zu identifizieren (z. B. eDNA- oder Mischprobe), basierend auf einer Hochdurchsatz-Amplikonsequenzierung.

Mitochondrien

Eine Organelle, die in den meisten eukaryotischen Organismen vorhanden ist und in der zellulären Atmungskette eine essenzielle Rolle innehat. Mitochondriale Gene entwickeln sich rascher als das Kerngenom, weshalb sie häufig als DNA-Barcodes verwendet werden (z. B. COI, 16S oder 12S).

Multiplexing

Ein Verfahren, das die gleichzeitige PCR-Amplifikation verschiedener Marker oder die Sequenzierung verschiedener Proben umfasst, um den molekularen Ablauf zu optimieren.

Negativkontrollen

Messungen, die eine Rückverfolgung potenzieller Kontaminationen bei der Probenahme im Feld, bei der DNA-Extraktion sowie bei der PCR ermöglichen.

Operationelle taxonomische Einheit (OTU)

Ein Cluster von Sequenzen, die nach Ähnlichkeit gruppiert wurden und die als Proxy für molekulare Arten gelten.

PCR-Inhibitor

Ein Faktor, der die Amplifikation von DNA während der PCR verhindert oder einschränkt durch eine Interaktion mit der Muster-DNA, der Polymerase oder anderer Cofaktoren, die in der PCR verwendet werden.

Polymerase

Ein Enzym, das DNA-Moleküle während der PCR synthetisiert, indem eine bestehende DNA-Sequenz repliziert wird.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ein Prozess zur Erzeugung von Kopien eines bestimmten DNA-Fragments mithilfe der DNA-Polymerase.

Konservierungslösung

Eine Verbindung, die Proben zur Langzeitlagerung zugesetzt wird (z. B. Ethanol).

Primer

Ein kurzes Stück Einzelstrang-DNA, das bei der PCR für die DNA-Replikation verwendet wird. In der Regel werden zwei Primer (auch Primerpaar genannt) eingesetzt, die den durch die Polymerase zu replizierenden Bereich abgrenzen.

Sonde

Eine PCR-Sonde ist eine Einzelstrang-DNA, die sich innerhalb des amplifizierten Fragments an eine gewünschte Region binden soll. Während der Amplifikation baut die Polymerase die Sonde ab und spaltet einen Fluoreszenzreporter von der Sonde ab, was zur Freisetzung von Fluoreszenz führt, die quantifiziert werden kann.

Quantitative PCR (qPCR)

Ein Verfahren, das während PCR-Reaktionen die Quantifizierung von DNA-Produkten anhand der Fluoreszenzintensität erlaubt. Das Fluoreszenzsignal kann entweder durch eine unspezifische Farbstoffbindung an die Doppelstrang-DNA oder durch eine spezifische Sonde erzeugt werden. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Akkumulation von DNA und wird dann gegenüber dem von einer bekannten DNA-Menge erzeugten Signal quantifiziert.

Reads

Eine gebräuchliche Bezeichnung für DNA-Sequenzen, die während der Hochdurchsatz-Sequenzierung entstehen.

Referenzdatenbank

Eine Sammlung von DNA-Sequenzen, die individuell mit morphologisch identifizierten Proben verknüpft sind, die idealerweise in Museumssammlungen gelagert sind. Referenzdatenbanken dienen zur taxonomischen Zuordnung von DNA-Sequenzen, die aus eDNA- oder Bulk-Proben stammen.

Replikat

Wiederholte DNA-Probenahme oder PCR-Amplifikation, um die Variabilität der Methode abzuschätzen und die Konsistenz der erhaltenen Resultate zu überprüfen.

Sanger-Sequenzierung

Eine qualitativ hochstehende DNA-Sequenzierungsmethode mit geringem Durchsatz, die häufig für das Barcoding individueller Proben verwendet wird.

Überwachtes maschinelles Lernen

Statistisches Modellierungsverfahren, das einen vollständig gekennzeichneten Datensatz nutzt, d. h. einen Datensatz, der sowohl mit Referenzlabeln (Werte biotischer Indizes oder Zustand der ökologischen Qualität) als auch mit Merkmalen (Variablen, OTU-Verteilung) versehen ist, um ein Vorhersagemodell mit einem Maschinenlernalgorithmus zu trainieren. Das trainierte Modell wird verwendet, um Labels neuer Proben anhand der Verteilung ihrer Merkmale vorherzusagen.

Taxonomische Zuordnung

Die taxonomische Identifikation von DNA-Sequenzen auf der Basis von Referenzdatenbanken.

Schwellenwert

Niedrigster zugelassener Wert für ein bestimmtes Qualitätskriterium, das bei vielen Schritten im bioinformatischen Prozess zur Reinigung der HTS-Daten verwendet wird.

Literaturhinweise

- Adrian-Kalchhauser I. & Burkhardt-Holm P. (2016): An eDNA Assay to Monitor a Globally Invasive Fish Species from Flowing Freshwater. – PLOS ONE 11: e0147558.
- AFNOR. (2016): NF T90-393 | Qualité de l'eau – Échantillonnage, traitement et analyse des oligochètes dans les sédiments des eaux de surface continentales | Norm'Info.
- Agersnap S., Larsen W. B., Knudsen S. W., Strand D., Thomsen P. F., Hesselsøe M., Mortensen P. B., Vrålstad T., & Møller P. R. (2017): Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. – PLOS ONE 12: e0179261.
- Aird D., Ross M. G., Chen W.-S., Danielsson M., Fennell T., Russ C., Jaffe D. B., Nusbaum C., & Gnirke A. (2011): Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. – Genome Biology 12: R18.
- 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: 607 – 618.
- Amberg J. J., Grace McCalla S., Monroe E., Lance R., Baerwaldt K., & Gaikowski M. P. (2015): Improving efficiency and reliability of environmental DNA analysis for silver carp. – Journal of Great Lakes Research 41: 367 – 373.
- Apothéloz-Perret-Gentil L., Cordonier A., Straub F., Iseli J., Esling P., & Pawlowski J. (2017): Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring. – Mol Ecol Resour. 17(6): 1231 – 1242.
- BAFU. (2013): NAWA – Nationale Beobachtung Oberflächengewässerqualität. – Konzept Fließgewässer. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Wissen Nr. 1327: 72 S.
- BAFU. (2019a): Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer (IBCH_2019). Makrozoobenthos – Stufe F. 1. aktualisierte Ausgabe 2019; Erstausgabe 2010. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Vollzug Nr. 1026: 59 S.
- BAFU. (2019b): Zustand und Entwicklung Grundwasser Schweiz. Ergebnisse der Nationalen Grundwasserbeobachtung NAQUA, Stand 2016. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Zustand Nr. 1901: 142 S.
- Baker C. S., Steel D., Nieu Kirk S., & Klinck H. (2018): Environmental DNA (eDNA) From the Wake of the Whales: Droplet Digital PCR for Detection and Species Identification. – Front. Mar. Sci. 5: 133.
- Barnes M. A. & Turner C. R. (2016): The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. – Conserv Genet 17: 1 – 17.
- Bass D., Stentiford G. D., Littlewood D. T. J., & Hartikainen H. (2015): Diverse Applications of Environmental DNA Methods in Parasitology. – Trends Parasitol. 31: 499 – 513.
- Beentjes K. K., Speksnijder A. G. C. L., Schilthuizen M., Schaub B. E. M., & Hoorn B. B. van der. (2018): The influence of macroinvertebrate abundance on the assessment of freshwater quality in The Netherlands. – Metabarcoding and Metagenomics 2: e26744.
- Benateau S., Gaudard A., Stamm C., & Altermatt F. (2019): Climate change and freshwater ecosystems. Impacts on water quality and ecological status. – Bundesamt für Umwelt (BAFU), Bern. Hydro-CH2018 Project: 110 S.
- Berney C., Fahrni J., & Pawlowski J. (2004): How many novel eukaryotic “kingdoms”? Pitfalls and limitations of environmental DNA surveys. – BMC Biology 2: 13.
- Koordinationsstelle BDM (2014): Biodiversitätsmonitoring Schweiz BDM. Beschreibung der Methoden und Indikatoren. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umweltwissen Nr. 1410. 103 S.
- Biggs J., Ewald N., Valentini A., Gaboriaud C., Dejean T., Griffiths R. A., Foster J., Wilkinson J. W., Arnell A., Brotherton P., Williams P., & Dunn F. (2015): Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). – Biological Conservation 183: 19 – 28.

- Birk S., Bonne W., Borja A., Brucet S., Courrat A., Poikane S., Solimini A., Bund W. van de, 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: 31 – 41.
- Bista I., Carvalho G. R., Walsh K., Seymour M., Hajibabaei M., Lallias D., Christmas M., & Creer S. (2017): Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. – *Nature Communications* 8: 14087.
- Blackman R. C., Constable D., Hahn C. K., Sheard A. M., Durkota J. M., Haenfling B., & Handley L. J. L. (2017): Detection of a new non-native freshwater species by DNA metabarcoding of environmental samples — first record of *Gammarus fossarum* in the UK. – *Aquatic Invasions* 12: 177 – 189.
- Blackman R. C., Mächler E., Altermatt F., Arnold A., Beja P., Boets P., Egeter B., Elbrecht V., Filipe A. F., Jones J. I., Macher J., Majaneva M., Martins F. M. S., Múrria C., Meissner K., Pawlowski J., Yáñez P. L. S., Zizka V. M. A., Leese F., Price B., & Deiner K. (2019): Advancing the use of molecular methods for routine freshwater macroinvertebrate biomonitoring – the need for calibration experiments. – *Metabarcoding and Metagenomics* 3: e34735.
- 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 (F. Frontalini, Ed.). – *PLoS ONE* 14: e0226547.
- Buxton A., Groombridge J., & Griffiths R. (2018): Comparison of Two Citizen Scientist Methods for Collecting Pond Water Samples for Environmental DNA Studies. – *Citizen Science: Theory and Practice* 3: 2.
- Bylemans J., Furlan E. M., Hardy C. M., McGuffie P., Lintermans M., & Gleeson D. M. (2017): An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: a case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*). – *Methods in Ecology and Evolution* 8: 646 – 655.
- Callahan B. J., McMurdie P. J., & Holmes S. P. (2017): Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. – *The ISME Journal* 11: 2639 – 2643.
- Cannon M. V., Hester J., Shalkhauser A., Chan E. R., Logue K., Small S. T., & Serre D. (2016): In silico assessment of primers for eDNA studies using PrimerTree and application to characterize the biodiversity surrounding the Cuyahoga River. – *Scientific Reports* 6: 22908.
- Carew M. E., Pettigrove V. J., Metzeling L., & Hoffmann A. A. (2013): Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. – *Frontiers in Zoology* 10: 45.
- Carim K. J., McKelvey K. S., Young M. K., Wilcox T. M., & Schwartz M. K. (2016): A protocol for collecting environmental DNA samples from streams. – *Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-355*. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 18 p.
- Carraro L., Hartikainen H., Jokela J., Bertuzzo E., & Rinaldo A. (2018): Estimating species distribution and abundance in river networks using environmental DNA. – *PNAS* 115: 11724 – 11729.
- Carraro L., Mächler E., Wüthrich R., & Altermatt F. (2020) Environmental DNA allows upscaling spatial patterns of biodiversity in freshwater ecosystems. – *Nature Communications* 11: 3585.
- Charvoz, L. (2019): Monitoring and detection of invasive newt *Lissotriton vulgaris meridionalis* in Geneva's south bank ponds (University of Geneva). – Master thesis. Retrieved from <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:118872>

-
- 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.
- Clusa L., Ardura A., Gower F., Miralles L., Tsartsianidou V., Zaiko A., & Garcia-Vazquez E. (2016): An Easy Phylogenetically Informative Method to Trace the Globally Invasive Potamopyrgus Mud Snail from River's eDNA. – PLoS ONE 11: e0162899.
- Clusa L., Miralles L., Basanta A., Escot C., & García-Vázquez E. (2017): eDNA for detection of five highly invasive molluscs. A case study in urban rivers from the Iberian Peninsula. – PLOS ONE 12: e0188126.
- Cowart D. A., Renshaw M. A., Gantz C. A., Umek J., Chandra S., Egan S. P., Lodge D. M., & Larson E. R. (2018): Development and field validation of an environmental DNA (eDNA) assay for invasive clams of the genus Corbicula. – Management of Biological Invasions 9: 27 – 37.
- Craine J. M., Henson M. W., Thrash J. C., Hanssen J., Spooner G., Fleming P., Pukonen M., Stahr F., Spaulding S., & Fierer N. (2018): Environmental DNA reveals the structure of phytoplankton assemblages along a 2900-km transect in the Mississippi River. – bioRxiv 261727.
- Cruickshank, S.S., Bühler, C & Schmidt, B. R. (2019): Quantifying data quality in a citizen science monitoring program: False negatives, false positives and occupancy trends. – Conservation Science and Practice: e54.
- Danielopol D. L., Pospisil P., & Rouch R. (2000): Biodiversity in groundwater: a large-scale view. – Trends in Ecology & Evolution 15: 223 – 224.
- De Souza L. S., Godwin J. C., Renshaw M. A., & Larson E. (2016): Environmental DNA (eDNA) Detection Probability Is Influenced by Seasonal Activity of Organisms. – PLOS ONE 11: e0165273.
- De Ventura L., Kopp K., Seppälä K., & Jokela J. (2017): Tracing the quagga mussel invasion along the Rhine river system using eDNA markers: early detection and surveillance of invasive zebra and quagga mussels. – MBI 8: 101 – 112.
- Deagle B. E., Bax N., Hewitt C. L., & Patil J. G. (2003): Development and evaluation of a PCR-based test for detection of Asterias (Echinodermata : Asteroidea) larvae in Australian plankton samples from ballast water. – Mar. Freshwater Res. 54: 709 – 719.
- Deiner K. & Altermatt F. (2014): Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. – PLoS ONE 9: e88786.
- Deiner K., Bik H. M., Mächler E., Seymour M., Lacoursière-Roussel A., Altermatt F., Creer S., Bista I., Lodge D. M., Vere N. de, Pfrender M. E., & Bernatchez L. (2017): Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. – Molecular Ecology 26: 5872 – 5895.
- Deiner K., Fronhofer E. A., Mächler E., Walser J.-C., & Altermatt F. (2016): Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. – Nature Communications 7: 12544.
- Deiner K., Lopez J., Bourne S., Holman L., Seymour M., Grey E. K., Lacoursière A., Li Y., Renshaw M. A., Pfrender M. E., Rius M., Bernatchez L., & Lodge D. M. (2018): Optimising the detection of marine taxonomic richness using environmental DNA metabarcoding: the effects of filter material, pore size and extraction method. – Metabarcoding and Metagenomics 2: e28963.
- Deiner K., Walser J.-C., Mächler E., & Altermatt F. (2015): Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. – Biological Conservation 183: 53–63.
- Doi H., Uchii K., Takahara T., Matsushashi S., Yamanaka H., & Minamoto T. (2015): Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys. – PLOS ONE 10: e0122763.

- Dougherty M. M., Larson E. R., Renshaw M. A., Gantz C. A., Egan S. P., Erickson D. M., & Lodge D. M. (2016): Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. – *Journal of Applied Ecology* 53: 722 – 732.
- Dubey, S., Dufresnes, C. & Rameier, P. (2019): Détermination de la distribution du triton crêté italien invasif (*Triturus cristatus*) dans le secteur de Bâle par le biais d'analyses génétiques. Hintermann & Weber AG, Montreux. – Rapport final. 16 p.
- Dufresne Y., Lejzerowicz F., Apothéloz-Perret-Gentil L., Pawlowski J., & Cordier T. (2019): SLIM: a flexible web application for the reproducible processing of environmental DNA metabarcoding data. – *BMC Bioinformatics* 20: 88.
- Dunn N., Priestley V., Herraiz A., Arnold R., & Savolainen V. (2017): Behavior and season affect crayfish detection and density inference using environmental DNA. – *Ecology and Evolution* 7: 7777 – 7785.
- Eckert K. A. & Kunkel T. A. (1991): DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. – *PCR Methods Appl.* 1: 17 – 24.
- Egan S. P., Barnes M. A., Hwang C.-T., Mahon A. R., Feder J. L., Ruggiero S. T., Tanner C. E., & Lodge D. M. (2013): Rapid Invasive Species Detection by Combining Environmental DNA with Light Transmission Spectroscopy. – *Conservation Letters* 6: 402 – 409.
- Egan S. P., Grey E., Olds B., Feder J. L., Ruggiero S. T., Tanner C. E., & Lodge D. M. (2015): Rapid Molecular Detection of Invasive Species in Ballast and Harbor Water by Integrating Environmental DNA and Light Transmission Spectroscopy. – *Environ. Sci. Technol.* 49: 4113 – 4121.
- Elbrecht V. & Leese F. (2015): Can DNA-Based Ecosystem Assessments Quantify Species Abundance? Testing Primer Bias and Biomass—Sequence Relationships with an Innovative Metabarcoding Protocol. – *PLOS ONE* 10: e0130324.
- Elbrecht V. & Leese F. (2017): Validation and development of COI metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment. – *Front. Environ. Sci.* 5: 11.
- Elbrecht V., Vamos E. E., Meissner K., Aroviita J., & Leese F. (2017): Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. – *Methods in Ecology and Evolution* 8(10): 1265-1275.
- Erickson R. A., Merkes C. M., Jackson C. A., Goforth R. R., & Amberg J. J. (2017): Seasonal trends in eDNA detection and occupancy of bigheaded carps. – *Journal of Great Lakes Research* 43: 762 – 770.
- Esling P., Lejzerowicz F., & Pawlowski J. (2015): Accurate multiplexing and filtering for high-throughput amplicon-sequencing. – *Nucleic Acids Res.* 43: 2513 – 2524.
- Evans N. T., Olds B. P., Renshaw M. A., Turner C. R., Li Y., Jerde C. L., Mahon A. R., Pfrender M. E., Lamberti G. A., & Lodge D. M. (2016): Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. – *Mol Ecol Resour* 16: 29 – 41.
- 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.
- Fernández S., Rodríguez S., Martínez J. L., Borrell Y. J., Ardua A., & García-Vázquez E. (2018): Evaluating freshwater macroinvertebrates from eDNA metabarcoding: A river Nalón case study. – *PLOS ONE* 13: e0201741.
- Fernández S., Rodríguez-Martínez S., Martínez J. L., García-Vázquez E., & Ardua A. (2019): How can eDNA contribute in riverine macroinvertebrate assessment? A metabarcoding approach in the Nalón River (Asturias, Northern Spain). – *Environmental DNA* 1: 385 – 401.
- Ficetola G. F., Miaud C., Pompanon F., & Taberlet P. (2008): Species detection using environmental DNA from water samples. – *Biol. Lett.* 4: 423 – 425.

- Fonseca V. G., Nichols B., Lallias D., Quince C., Carvalho G. R., Power D. M., & Creer S. (2012): Sample richness and genetic diversity as drivers of chimera formation in nSSU metagenetic analyses. – *Nucleic Acids Res.* 40: e66.
- Frey K. G., Herrera-Galeano J. E., Redden C. L., Luu T. V., Servetas S. L., Mateczun A. J., Mokashi V. P., & Bishop-Lilly K. A. (2014): Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. – *BMC Genomics* 15: 96.
- Fujiwara A., Matsushashi S., Doi H., Yamamoto S., & Minamoto T. (2016): Use of environmental DNA to survey the distribution of an invasive submerged plant in ponds. – *Freshwater Science* 35: 748 – 754.
- Gantz C. A., Renshaw M. A., Erickson D., Lodge D. M., & Egan S. P. (2018): Environmental DNA detection of aquatic invasive plants in lab mesocosm and natural field conditions. – *Biol Invasions* 20: 2535 – 2552.
- Geerts A. N., Boets P., Van den Heede S., Goethals P., & Van der heyden C. (2018): A search for standardized protocols to detect alien invasive crayfish based on environmental DNA (eDNA): a lab and field evaluation. – *Ecological Indicators* 84: 564 – 572.
- Geiger M. F., Herder F., Monaghan M. T., Almada V., Barbieri R., Bariche M., Berrebi P., Bohlen J., Casal-Lopez M., Delmastro G. B., Denys G. P. J., Dettai A., Doadrio I., Kalogianni E., Kärst H., Kottelat M., Kovačić M., Laporte M., Lorenzoni M., Marčić Z., Özuluğ M., Perdices A., Perea S., Persat H., Porcelotti S., Puzzi C., Robalo J., Šanda R., Schneider M., Šlechtová V., Stoumboudi M., Walter S., & Freyhof J. (2014): Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. – *Mol Ecol Resour* 14: 1210 – 1221.
- Geller J., Meyer C., Parker M., & Hawk H. (2013): Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. – *Molecular Ecology Resources* 13: 851 – 861.
- Gingera T., Bajno R., Docker M., & Reist J. (2017): Environmental DNA as a detection tool for zebra mussels *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) at the forefront of an invasion event in Lake Winnipeg, Manitoba, Canada. – *MBI* 8: 287 – 300.
- Goldberg C. S., Pilliod D. S., Arkle R. S., & Waits L. P. (2011): Molecular Detection of Vertebrates in Stream Water: A Demonstration Using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. – *PLOS ONE* 6: e22746.
- Goldberg C. S., Sepulveda A., Ray A., Baumgardt J., & Waits L. P. (2013): Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). – *Freshwater Science* 32: 792 – 800.
- Goldberg C. S., Strickler K. M., & Pilliod D. S. (2015): Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. – *Biological Conservation* 183: 1 – 3.
- Goldberg C. S., Turner C. R., Deiner K., Klymus K. E., Thomsen P. F., Murphy M. A., Spear S. F., McKee A., Olyer-McCance S. J., Cornman R. S., Laramie M. B., Mahon A. R., Lance R. F., Pilliod D. S., Strickler K. M., Waits L. P., Fremier A. K., Takahara T., Herder J. E., & Taberlet P. (2016): Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. – *Methods Ecol Evol* 7: 1299 – 1307.
- Hajibabaei M., Shokralla S., Zhou X., Singer G. A. C., & Baird D. J. (2011): Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. – *PLoS ONE* 6: e17497.
- Hänfling B., Handley L. L., Read D. S., Hahn C., Li J., Nichols P., Blackman R. C., Oliver A., & Winfield I. J. (2016): Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. – *Molecular Ecology* 25: 3101 – 3119.
- Harper L. R., Buxton A. S., Rees H. C., Bruce K., Brys R., Halfmaerten D., Read D. S., Watson H. V., Sayer C. D., Jones E. P., Priestley V., Mächler E., Múrria C., Garcés-Pastor S., Medupin C., Burgess K., Benson G., Boon-

- ham N., Griffiths R. A., Lawson Handley L., & Hänfling B. (2019a): Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. – *Hydrobiologia* 826: 25 – 41.
- Harper L. R., Handley L. L., Hahn C., Boonham N., Rees H. C., Gough K. C., Lewis E., Adams I. P., Brotherton P., Phillips S., & Hänfling B. (2018): Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*). – *Ecology and Evolution* 8: 6330 – 6341.
- 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.
- Harper L. R., McNeill D. C., & Downie J. R. (2017): The latest chapter in a conservation story: completing 10 years of post-translocation monitoring for a population of great crested newt (*Triturus cristatus*) in Scotland. – *The Glasgow Naturalist* 26: 29 – 44.
- Hebert P. D., Cywinska A., Ball S. L., & others. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. – *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: 313 – 321.
- Herder J., Valentini A., Bellemain E., Dejean T., Van Delft J. J. C. W., Thomsen P. F., & Taberlet P. (2014): Environmental DNA. A review of the possible applications for the detection of (invasive) species. – Nijmegen: Stichting RAVON, 2013 – 104.
- Holderegger R., Stapfer A., Schmidt B. R., Grünig C., Meier R., Csencsics D., & Gassner M. (2019): Werkzeugkasten Naturschutzgenetik: eDNA Amphibien und Verbund. Birmensdorf: Eidg. Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft WSL 81. 56 S.
- Hollingsworth P. M., Graham S. W., & Little D. P. (2011): Choosing and Using a Plant DNA Barcode. – *PLOS ONE* 6: e19254.
- Hunter M. E., Dorazio R. M., Butterfield J. S. S., Meigs-Friend G., Nico L. G., & Ferrante J. A. (2017): Detection limits of quantitative and digital PCR assays and their influence in presence-absence surveys of environmental DNA. – *Mol Ecol Resour* 17: 221 – 229.
- Hürlimann J. & Niederhauser P. (2007): Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer: Kieselalgen Stufe F (flächendeckend). Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Vollzug Nr. 0740: 130 S.
- Hutchins P. R., Sepulveda A. J., Martin R. M., & Hopper L. R. (2018): Improved Conventional PCR Assay for Detecting *Tetracapsuloides bryosalmonae* DNA in Fish Tissues. – *J. Aquat. Anim. Health* 30: 164 – 170.
- Hyman O. J. & Collins J. P. (2012): Evaluation of a filtration-based method for detecting *Batrachochytrium dendrobatidis* in natural bodies of water. – *Diseases of Aquatic Organisms* 97: 185 – 195.
- Jane S. F., Wilcox T. M., McKelvey K. S., Young M. K., Schwartz M. K., Lowe W. H., Letcher B. H., & Whiteley A. R. (2015): Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. – *Molecular Ecology Resources* 15: 216 – 227.
- Jerde C. L., Mahon A. R., Chadderton W. L., & Lodge D. M. (2011): "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. – *Conservation Letters* 4: 150 – 157.
- Kalchhauser I., Mutzner P., Hirsch P., & Burkhardt-Holm P. (2013): Arrival of round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) and bighead goby *Ponticola kessleri* (Günther, 1861) in the High Rhine (Switzerland). – *BIR* 2: 79 – 83.
- Känel B., Michel C., & Reichert P. (2017): Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer: Makrophyten – Stufe F (flächendeckend) und Stufe S (systembezogen). Bundesamt für Umwelt, Bern. Entwurf zur Vernehmlassung: 120 S.

-
- Keck F., Vasselon V., Rimet F., Bouchez A., & Kahlert M. (2018): Boosting DNA metabarcoding for biomonitoring with phylogenetic estimation of operational taxonomic units' ecological profiles. – *Mol Ecol Resour* 18: 1299 – 1309.
- Kermarrec L., Franc A., Rimet F., Chaumeil P., Frigerio J.-M., Humbert J.-F., & Bouchez A. (2014): A next-generation sequencing approach to river biomonitoring using benthic diatoms. – *Freshwater Science* 33: 349 – 363.
- Keskin E. (2014): Detection of invasive freshwater fish species using environmental DNA survey. – *Biochemical Systematics and Ecology* 56: 68 – 74.
- Kirshtein J. D., Anderson C. W., Wood J. S., Longcore J. E., & Voytek M. A. (2007): Quantitative PCR detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA from sediments and water. – *Dis. Aquat. Org.* 77: 11 – 15.
- Kitano T., Umetsu K., Tian W., & Osawa M. (2007): Two universal primer sets for species identification among vertebrates. – *Int. J. Legal Med.* 121: 423 – 427.
- 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.
- Klymus K. E., Merkes C. M., Allison M. J., Goldberg C. S., Helbing C. C., Hunter M. E., Jackson C. A., Lance R. F., Mangan A. M., Monroe E. M., Piaggio A. J., Stokdyk J. P., Wilson C. C., & Richter C. A. (2019): Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. – *Environmental DNA* 00: 1 – 12.
- Klymus K. E., Richter C. A., Chapman D. C., & Paukert C. (2015): Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. – *Biological Conservation* 183: 77 – 84.
- Knebelsberger T., Dunz A. R., Neumann D., & Geiger M. F. (2015): Molecular diversity of Germany's freshwater fishes and lampreys assessed by DNA barcoding. – *Molecular Ecology Resources* 15: 562 – 572.
- Krieg, R., Weston, A., King, A. & Zenker, A. (2019a): Aufspüren von Flusskrebspopulationen anhand environmental DNA (eDNA) mittels Wasserproben, Validierung der eDNA Methode und Feldaufnahmen in ausgewählten Gewässern. Schweizweites Projekt im Auftrag des BAFU und der Kantone: AG, AR, BL, BS, BE, GR, JU, LU, SG, SO, SZ, UR, VD und ZG. – Projektbericht. 53 S.
- Krieg, R., Weston, A., King, A., Sieber, N., Vorburger, C., Hartikainen, H. & Zenker, A. (2019b): Aufspüren von Nachweis von Wassertierkrankheiten mit Hilfe der sogenannten Umwelt-DNA (eDNA) Methode aus Wasserproben. Entwicklung einer Mehrfachnachweismethode bzw. Erstellen einer Schweizer Risikokarte für Wassertierkrankheiten. Schweizweites Projekt im Auftrag des BAFU und der Kantone AG, AR, BL, GE, GL, GR, JU, LU, SH, SZ, TI, VD, ZG, ZH. – Projektbericht. 40 S.
- Kunz M., Schindler Wildhaller Y., & Dietzel A. (2016): Zustand der Schweizer Fließgewässer. Ergebnisse der Nationalen Beobachtung Oberflächengewässerqualität (NAWA) 2011 – 2014. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Zustand Nr. 1620: 87 S.
- Küry D., Lubini V., & Stucki P. (2019): Quell-Lebensräume – Anleitung zur systematischen Erfassung und Ermittlung ihrer Bedeutung im Naturschutz. Expertenbericht im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt BAFU.
- Kuzmina M. L., Braukmann T. W. A., & Zakharov E. V. (2018): Finding the pond through the weeds: eDNA reveals underestimated diversity of pondweeds. – *Appl Plant Sci* 6 (5): e011155.
- Lanzén A., Lekang K., Jonassen I., Thompson E. M., & Troedsson C. (2017): DNA extraction replicates improve diversity and compositional dissimilarity in metabarcoding of eukaryotes in marine sediments. – *PLOS ONE* 12: e0179443.
- Laramie M. B., Pilliod D. S., Goldberg C. S., & Strickler K. M. (2015): Environmental DNA sampling protocol – filtering water to capture DNA from aquatic organisms. – *U.S. Geological Survey Techniques and Methods*, Reston, VA. 2-A13. 15pp.

- Lee D. F., Lu J., Chang S., Loparo J. J., & Xie X. S. (2016): Mapping DNA polymerase errors by single-molecule sequencing. – *Nucleic Acids Res.* 44: e118.
- Leese F., Bouchez A., Abarenkov K., Altermatt F., Borja Á., Bruce K., Ekrem T., Čiampor F., Čiamporová-Zat'ovičová 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., Wal B. van der, 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 D.A., Dumbrell A.J., Woodward G., & Jackson M. (eds.), *Advances in Ecological Research*, pp. 63 – 99. *Next Generation Biomonitoring: Part 1.* – Academic Press.
- Lefrançois E., Apothéloz-Perret-Gentil L., Blancher P., Botreau S., Chardon C., Crepin L., Cordier T., Cordonier A., Domaizon I., Ferrari B. J. D., Guéguen J., Hustache J.-C., Jacas L., Jacquet S., Lacroix S., Mazenq A.-L., Pawlowska A., Perney P., Pawlowski J., Rimet F., Rubin J.-F., Trevisan D., Vivien R., & Bouchez A. (2018): Development and implementation of eco-genomic tools for aquatic ecosystem biomonitoring: the SYNAQUA French-Swiss program. – *Environ Sci Pollut Res Int* 25: 33858 – 33866.
- Lejzerowicz F., Esling P., Pillet L., Wilding T. A., Black K. D., & Pawlowski J. (2015): High-throughput sequencing and morphology perform equally well for benthic monitoring of marine ecosystems. *Scientific Reports* 5: 13932.
- Leray M., Yang J. Y., Meyer C. P., Mills S. C., Agudelo N., Ranwez V., Boehm J. T., & Machida R. J. (2013): A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. – *Frontiers in Zoology* 10: 34.
- Lubini V., Stucki P., Vicentini H., & Küry D. (2016): Bewertung von Quell-Lebensräumen in der Schweiz. Entwurf für ein strukturelles und faunistisches Verfahren. – Bericht im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt BAFU.
- Macher J.-N., Vivancos A., Piggott J. J., Centeno F. C., Matthaei C. D., & Leese F. (2018): Comparison of environmental DNA and bulk-sample metabarcoding using highly degenerate cytochrome c oxidase I primers. – *Mol Ecol Resour* 18: 1456 – 1468.
- Mächler E., Deiner K., Steinmann P., & Altermatt F. (2014): Utility of environmental DNA for monitoring rare and indicator macroinvertebrate species. – *Freshwater Science* 33: 1174 – 1183.
- Mächler E., Little C. J., Wüthrich R., Alther R., Fronhofer E. A., Gounand I., Harvey E., Hürlemann S., Walser J.-C., & Altermatt F. (2019): Assessing different components of diversity across a river network using eDNA. – *Environmental DNA* 1: 290 – 301.
- Mahon A. R., Jerde C. L., Chadderton W. L., & Lodge D. M. (2011): Using environmental DNA to elucidate the Asian Carp (genus *Hypophthalmichthys*) invasion front in the Chicago Area Waterway System. In *Integrative and Comparative Biology*, pp. E85–E85. – OXFORD UNIV PRESS INC JOURNALS DEPT, 2001 EVANS RD, CARY, NC 27513 USA.
- Mahon A. R., Jerde C. L., Galaska M., Bergner J. L., Chadderton W. L., Lodge D. M., Hunter M. E., & Nico L. G. (2013): Validation of eDNA Surveillance Sensitivity for Detection of Asian Carps in Controlled and Field Experiments. – *PLOS ONE* 8: e58316.
- Mansfeldt C., Deiner K., Mächler E., Fenner K., Eggen R. I. L., Stamm C., Schönenberger U., Walser J.-C., & Altermatt F. (2020): Microbial community shifts in streams receiving treated wastewater effluent. – *Science of The Total Environment* 709: 135727. 12pp.
- Martins F. M. S., Galhardo M., Filipe A. F., Teixeira A., Pinheiro P., Paupério J., Alves P. C., & Beja P. (2019): Have the cake and eat it: Optimizing nondestructive DNA metabarcoding of macroinvertebrate samples for freshwater biomonitoring. – *Mol Ecol Resour* 19: 863 – 876.

- Maruyama A., Nakamura K., Yamanaka H., Kondoh M., & Minamoto T. (2014): The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish. – *PLOS ONE* 9: e114639.
- Matsushashi S., Doi H., Fujiwara A., Watanabe S., & Minamoto T. (2016): Evaluation of the Environmental DNA Method for Estimating Distribution and Biomass of Submerged Aquatic Plants. – *PLOS ONE* 11: e0156217.
- Mauvisseau Q., Coignet A., Delaunay C., Pinet F., Bouchon D., & Souty-Grosset C. (2018): Environmental DNA as an efficient tool for detecting invasive crayfishes in freshwater ponds. – *Hydrobiologia* 805: 163 – 175.
- McInerney P., Adams P., & Hadi M. Z. (2014): Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. – *Molecular Biology International* 2014: 287430.
- 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: 150088.
- Monchamp M.-E., Spaak P., Domaizon I., Dubois N., Bouffard D., & Pomati F. (2018): Homogenization of lake cyanobacterial communities over a century of climate change and eutrophication. – *Nat Ecol Evol* 2: 317 – 324.
- Nathan L. M., Simmons M., Wegleitner B. J., Jerde C. L., & Mahon A. R. (2014): Quantifying Environmental DNA Signals for Aquatic Invasive Species Across Multiple Detection Platforms. – *Environ. Sci. Technol.* 48: 12800 – 12806.
- Nevers M. B., Byappanahalli M. N., Morris C. C., Shively D., Przybyla-Kelly K., Spoljaric A. M., Dickey J., & Roseman E. F. (2018): Environmental DNA (eDNA): A tool for quantifying the abundant but elusive round goby (*Neogobius melanostomus*). – *PLOS ONE* 13: e0191720.
- Pawlowski J., Audic S., Adl S., Bass D., Belbahri L., Berney C., Bowser S. S., Cepicka I., Decelle J., Dunthorn M., Fiore-Donno A. M., Gile G. H., Holzmann M., Jahn R., Jirků M., Keeling P. J., Kostka M., Kudryavtsev A., Lara E., Lukeš J., Mann D. G., Mitchell E. A. D., Nitsche F., Romeralo M., Saunders G. W., Simpson A. G. B., Smirnov A. V., Spouge J. L., Stern R. F., Stoeck T., Zimmermann J., Schindel D., & de Vargas C. (2012): CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. – *PLoS Biol.* 10: e1001419.
- Pawlowski J., Kelly-Quinn M., Altermatt F., Apothéloz-Perret-Gentil L., Beja P., Boggero A., Borja A., Bouchez A., Cordier T., Domaizon I., Feio M. J., Filipe A. F., Fornaroli R., Graf W., Herder J., Hoorn B. van der, Iwan Jones J., Sagova-Mareckova M., Moritz C., Barquín J., Piggott J. J., Pinna M., Rimet F., Rinkevich B., Sousa-Santos C., Specchia V., Trobajo R., Vasselon V., Vitecek S., Zimmerman J., Weigand A., Leese F., & Kahlert M. (2018): The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. – *Sci. Total Environ* 637-638: 1295 – 1310.
- Pedersen M. W., Overballe-Petersen S., Ermini L., Sarkissian C. D., Haile J., Hellstrom M., Spens J., Thomsen P. F., Bohmann K., Cappellini E., Schnell I. B., Wales N. A., Carøe C., Campos P. F., Schmidt A. M. Z., Gilbert M. T. P., Hansen A. J., Orlando L., & Willerslev E. (2015): Ancient and modern environmental DNA. – *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370: 20130383.
- Piaggio A. J., Engeman R. M., Hopken M. W., Humphrey J. S., Keacher K. L., Bruce W. E., & Avery M. L. (2014): Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. – *Mol Ecol Resour* 14: 374 – 380.
- Piñol J., Mir G., Gomez-Polo P., & Agustí N. (2015): Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods. – *Mol Ecol Resour* 15: 819 – 830.
- Pont D., Rocle M., Valentini A., Civade R., Jean P., Maire A., Roset N., Schabuss M., Zornig H., & Dejean T. (2018): Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. – *Scientific Reports* 8: 1 – 13.

- Potapov V. & Ong J. L. (2017): Examining Sources of Error in PCR by Single-Molecule Sequencing. – PLOS ONE 12: e0169774.
- Preissler K., Watzal A. D., Vences M., & Steinfartz S. (2019): Detection of elusive fire salamander larvae (*Salamandra salamandra*) in streams via environmental DNA. – Amphibia-Reptilia 40: 55 – 64.
- Quail M. A., Smith M., Coupland P., Otto T. D., Harris S. R., Connor T. R., Bertoni A., Swerdlow H. P., & Gu Y. (2012): A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. – BMC Genomics 13: 341.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., & Gough, K. C. (2014a). REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. Journal of Applied Ecology 51(5): 1450 – 1459.
- Rees H. C., Bishop K., Middleditch D. J., Patmore J. R. M., Maddison B. C., & Gough K. C. (2014b): The application of eDNA for monitoring of the Great Crested Newt in the UK. – Ecol Evol 4: 4023 – 4032.
- Reid A. J., Carlson A. K., Creed I. F., Eliason E. J., Gell P. A., Johnson P. T. J., Kidd K. A., MacCormack T. J., Olden J. D., Ormerod S. J., Smol J. P., Taylor W. W., Tockner K., Vermaire J. C., Dudgeon D., & Cooke S. J. (2019): Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. – Biological Reviews 94: 849 – 873.
- Riascos L., Geerts A. N., Oña T., Goethals P., Cevallos-Cevallos J., Vanden Berghe W., Volckaert F. A. M., Bonilla J., Muylaert K., Velarde E., Boets P., & Van der heyden C. (2018): DNA-based monitoring of the alien invasive North American crayfish *Procambarus clarkii* in Andean lakes (Ecuador). – Limnologia 70: 20 – 25.
- Riaz T., Shehzad W., Viari A., Pompanon F., Taberlet P., & Coissac E. (2011): ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. – Nucleic Acids Res 39: e145.
- 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. – Sci Rep 9: 1 – 12.
- Robinson C. V., Uren Webster T. M., Cable J., James J., & Consuegra S. (2018): Simultaneous detection of invasive signal crayfish, endangered white-clawed crayfish and the crayfish plague pathogen using environmental DNA. – Biological Conservation 222: 241 – 252.
- Rocchi S., Tisserant M., Valot B., Laboissière A., Frosard V., & Reboux G. (2016): Quantification of *Saprolegnia parasitica* in river water using real-time quantitative PCR: from massive fish mortality to tap drinking water. – International journal of environmental health research 27(1): 1 – 10.
- Rodriguez P. & Reynoldson T. B. (2011): The Pollution Biology of Aquatic Oligochaetes. – Springer Netherlands.
- Sales N. G., McKenzie M. B., Drake J., Harper L. R., Browett S. S., Coscia I., Wangenstein O. S., Baillie C., Bryce E., Dawson D. A., Ochu E., Hänfling B., Handley L. L., Mariani S., Lambin X., Sutherland C., & McDevitt A. D. (2019): Fishing for mammals: landscape-level monitoring of terrestrial and semi-aquatic communities using eDNA from lotic ecosystems. – bioRxiv: 629758.
- Sansom B. J. & Sassoubre L. M. (2017): Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates to Model Freshwater Mussel eDNA Transport in a River. – Environ. Sci. Technol. 51: 14244 – 14253.
- Schager E. & Peter A. (2004): Méthodes d'analyse et d'appréciation des cours d'eau en Suisse: Poissons niveau R.
- Schenk J., Geisen S., Kleinboelting N., & Traunspurger W. (2019): Metabarcoding data allow for reliable biomass estimates in the most abundant animals on earth. – Metabarcoding and Metagenomics 3: e46704.

- Schneider J., Valentini A., Dejean T., Montarsi F., Taberlet P., Glaizot O., & Fumagalli L. (2016): Detection of Invasive Mosquito Vectors Using Environmental DNA (eDNA) from Water Samples. – PLOS ONE 11: e0162493.
- Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A., Chen W., Fungal Barcoding Consortium, & Fungal Barcoding Consortium Author List. (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. – Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109: 6241 – 6246.
- Scriver M., Marinich A., Wilson C., & Freeland J. (2015): Development of species-specific environmental DNA (eDNA) markers for invasive aquatic plants. – Aquatic Botany 122: 27 – 31.
- Seymour M., Durance I., Cosby B. J., Ransom-Jones E., Deiner K., Ormerod S. J., Colbourne J. K., Wilgar G., Carvalho G. R., Bruyn M. de, Edwards F., Emmett B. A., Bik H. M., & Creer S. (2018): Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. – Communications Biology 1: 4.
- Sigsgaard E. E., Carl H., Møller P. R., & Thomsen P. F. (2015): Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. – Biological Conservation 183: 46 – 52.
- Smart A. S., Tingley R., Weeks A. R., Rooyen A. R. van, & McCarthy M. A. (2015): Environmental DNA sampling is more sensitive than a traditional survey technique for detecting an aquatic invader. – Ecological Applications 25: 1944 – 1952.
- Sohlberg E., Bomberg M., Miettinen H., Nyyssönen M., Salavirta H., Vikman M., & Itävaara M. (2015): Revealing the unexplored fungal communities in deep groundwater of crystalline bedrock fracture zones in Olkiluoto, Finland. – Front Microbiol 6: 573.
- Stoeckle B. C., Kuehn R., & Geist J. (2016): Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.): a substitute for classical monitoring approaches? – Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 26: 1120 – 1129.
- Strand D. A., Jussila J., Johnsen S. I., Viljamaa-Dirks S., Edsman L., Wiik-Nielsen J., Viljugrein H., Engdahl F., & Vrålstad T. (2014): Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. – Journal of Applied Ecology 51: 544 – 553.
- Strickler K. M., Fremier A. K., & Goldberg C. S. (2015): Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. – Biological Conservation 183: 85 – 92.
- Stucki P. (2010): Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer: Makrozoobenthos. – Stufe F (flächendeckend). Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Vollzug Nr. 1026: 59 S.
- Taberlet P., Bonin A., Coissac E., & Zinger L. (2018): Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring. – Oxford University Press.
- Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Miquel C., Valentini A., Vermat T., Corthier G., Brochmann C., & Willerslev E. (2007): Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. – Nucleic Acids Res 35: e14.
- Takahara T., Minamoto T., Yamanaka H., Doi H., & Kawabata Z. (2012): Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. – PLOS ONE 7: e35868.
- Thomsen P. F., Kielgast J., Iversen L. L., Møller P. R., Rasmussen M., & Willerslev E. (2012): Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. – PLOS ONE 7: e41732.
- Thomsen P. F. & Willerslev E. (2015): Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. – Biological Conservation 183: 4 – 18.
- Tréguier A., Paillisson J.-M., Dejean T., Valentini A., Schlaepfer M. A., & Roussel J.-M. (2014): Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. – Journal of Applied Ecology 51: 871 – 879.

- Tsuji S., Takahara T., Doi H., Shibata N., & Yamanaka H. (2019): The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. – *Environmental DNA* 1: 99 – 108.
- Turner C. R., Barnes M. A., Xu C. C. Y., Jones S. E., Jerde C. L., & Lodge D. M. (2014): Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. – *Methods in Ecology and Evolution* 5: 676 – 684.
- US Fish and Wildlife Service (2019): Quality assurance project plan. eDNA monitoring of bighead and silver carps.
- Ushio M., Fukuda H., Inoue T., Makoto K., Kishida O., Sato K., Murata K., Nikaido M., Sado T., Sato Y., Takeshita M., Iwasaki W., Yamanaka H., Kondoh M., & Miya M. (2017): Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. – *Mol Ecol Resour* 17: e63–e75.
- Valentini A., Taberlet P., Miaud C., Civade R., Herder J., Thomsen P. F., Bellemain E., Besnard A., Coissac E., Boyer F., Gaboriaud C., Jean P., Poulet N., Roset N., Copp G. H., Geniez P., Pont D., Argillier C., Baudoin J.-M., Peroux T., Crivelli A. J., Olivier A., Acqueberge M., Le Brun M., Møller P. R., Willerslev E., & Dejean T. (2016): Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. – *Mol. Ecol.* 25: 929 – 942.
- 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: 162 – 177.
- 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.
- Visco J. A., Apothéloz-Perret-Gentil L., Cordonier A., Esling P., Pillet L., & Pawlowski J. (2015): Environmental Monitoring: Inferring the Diatom Index from Next-Generation Sequencing Data. – *Environ. Sci. Technol.* 49: 7597 – 7605.
- Vivien R., Apothéloz-Perret-Gentil L., Pawlowski J., Werner I., & Ferrari B. J. D. (2019): Testing different (e)DNA metabarcoding approaches to assess aquatic oligochaete diversity and the biological quality of sediments. – *Ecological Indicators* 106: 105453.
- Vivien R., Apothéloz-Perret-Gentil L., Pawlowski P., Werner I., Lafont M., & Ferrari B.J.D. (2020): High-throughput DNA barcoding of oligochaetes for abundance-based indices to assess the biological quality of sediments in streams and lakes. – *Scientific Reports* 10(1): 2041
- Vivien R., Ferrari B., & Pawlowski J. (2016): DNA barcoding of formalin-fixed aquatic oligochaetes for biomonitoring. – *BMC Res Notes* 9(1): 342.
- Vivien R., LaFont M., & Ferrari B. J. D. (2015a): Utilisation des communautés d'oligochètes pour l'évaluation de la qualité biologique et du fonctionnement des cours d'eau: un bilan à partir de données genevoises (Suisse). – *Archives des Sciences* 68: 105 – 116.
- Vivien R., Lejzerowicz F., & Pawlowski J. (2016): Next-Generation Sequencing of Aquatic Oligochaetes: Comparison of Experimental Communities. – *PLOS ONE* 11: e0148644.
- Vivien R., Tixier G., & Lafont M. (2014): Use of oligochaete communities for assessing the quality of sediments in watercourses of the Geneva area (Switzerland) and Artois-Picardie basin (France): proposition of heavy metal toxicity thresholds. – *Ecology & Hydrobiology* 14: 142 – 151.
- Vivien R., Wyler S., Lafont M., & Pawlowski J. (2015b): Molecular Barcoding of Aquatic Oligochaetes: Implications for Biomonitoring. – *PLOS ONE* 10: e0125485.
- Wangensteen O. S., Palacín C., Guardiola M., & Turon X. (2018): DNA metabarcoding of littoral hard-bottom communities: high diversity and database gaps revealed by two molecular markers. – *PeerJ* 6: e4705.

-
- Weigand H., Beermann A. J., Čiampor F., Costa F. O., Csabai Z., Duarte S., Geiger M. F., Grabowski M., Rimet F., Rulik B., Strand M., Szucsich N., Weigand A. M., Willassen E., Wyler S. A., Bouchez A., Borja A., Čiamporová-Zaťovičová Z., Ferreira S., Dijkstra K.-D. B., Eisendle U., Freyhof J., Gadawski P., Graf W., Haegerbaeumer A., Hoorn B. B. van der, Japoshvili B., Keresztes L., Keskin E., Leese F., Macher J. N., Mamos T., Paz G., Pešić V., Pfannkuchen D. M., Pfannkuchen M. A., Price B. W., Rinkevich B., Teixeira M. A. L., Várbíró G., & Ekrem T. (2019): DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. – *Science of The Total Environment* 678: 499 – 524.
- Weigand A. M. & Macher J.-N. (2018): A DNA metabarcoding protocol for hyporheic freshwater meiofauna: Evaluating highly degenerate COI primers and replication strategy. – *Metabarcoding and Metagenomics* 2: e26869.
- Williams M. R., Stedtfeld R. D., Engle C., Salach P., Fakher U., Stedtfeld T., Dreelin E., Stevenson R. J., Lattimore J., & Hashsham S. A. (2017): Isothermal amplification of environmental DNA (eDNA) for direct field-based monitoring and laboratory confirmation of *Dreissena* sp. – *PLOS ONE* 12: e0186462.
- Winding, A., Bang-Andreasen, T., Hansen, L.H., Panitz, F., Krogh, P.H., Krause-Jensen, D., Stæhr, P., Nicolaisen, M., Hendriksen, N.B., Sapkota, R., Santos, S. & Andersen, L.W.: 2019. eDNA in environmental monitoring. Aarhus University, DCE – Danish Centre for Environment and Energy, 40 pp. Technical Report No. 133 <http://dce2.au.dk/pub/TR133.pdf>
- Wüthrich R. & Altermatt F. (2019): Aquatische Monitoringprogramme NAWA und BDM. Synergien, Strategien und Visionen. Bundesamt für Umwelt, Bern. 88 S.
- Zimmermann J., Glöckner G., Jahn R., Enke N., & Gemeinholzer B. (2015): Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. – *Mol Ecol Resour* 15: 526 – 542.
- Zizka V. M. A., Leese F., Peinert B., & Geiger M. F. (2019): DNA metabarcoding from sample fixative as a quick and voucher-preserving biodiversity assessment method 1. – *Genome* 62: 122 – 136.