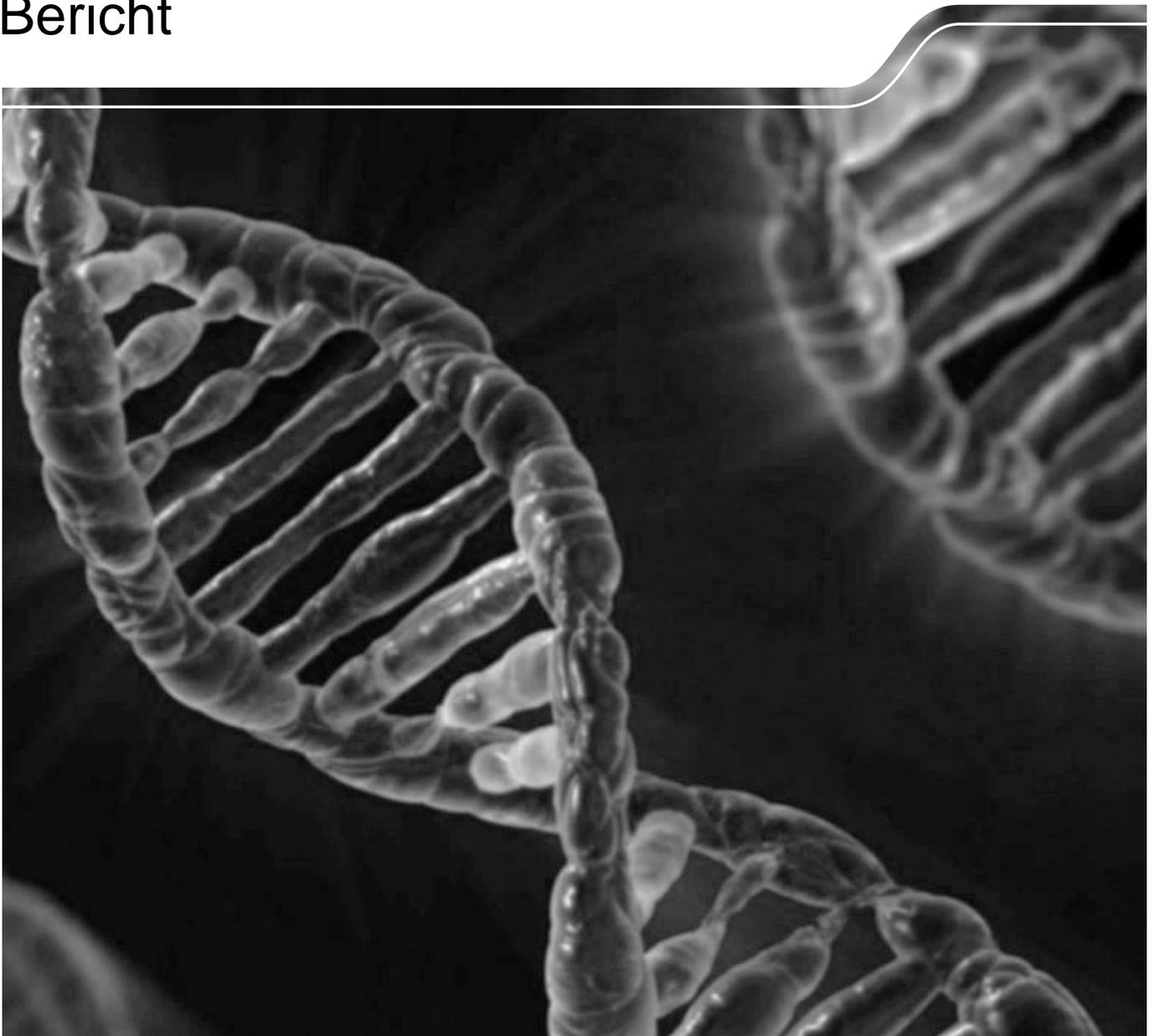




# Integrative Taxonomie mit DNA-Barcoding

Bericht



**Einsatzmöglichkeiten molekularbiologischer Verfahren  
zur Ermittlung des ökologischen Zustandes nach  
EG-Wasserrahmenrichtlinie:  
Erste Erfahrungen aus der Praxis**

M. Greyer, A. Rother, R. Klung, R. Frieß & Dr. A. Doege

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Veranlassung .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Molekularbiologie .....</b>	<b>8</b>
3.1	Barcodingmethoden.....	8
3.2	Von der Probenahme zur Artbestimmung.....	9
<b>4</b>	<b>Ermittlung des ökologischen Zustandes mittels molekularbiologischer Verfahren.....</b>	<b>12</b>
4.1	Methodische Herausforderungen.....	12
4.2	Ökologische Zustandsermittlung.....	15
<b>5</b>	<b>Gegenwärtige Einsatzmöglichkeiten molekularbiologischer Verfahren in der WRRL-Praxis.....</b>	<b>16</b>
<b>6</b>	<b>Abwägung und Kombination klassischer und molekularbiologischer Verfahren .....</b>	<b>17</b>
<b>7</b>	<b>Zeitlicher Aufwand und Abschätzung von Kosten .....</b>	<b>18</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>20</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>21</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Analyseschritte für die Bestimmung einer Art mittels DNA-Barcoding (stark vereinfacht, Foto: BfUL) .....	10
Abbildung 2:	Makrozoobenthos-Probenahme nach dem Multi-Habitat-Sampling-Verfahren (links) und Siebvorrichtung zum Spülen und Abtrennen verschiedener Fraktionen (Foto: BfUL).....	10
Abbildung 3:	Entwicklung der Kosten für DNA-Sequenzierung des menschlichen Genoms (Bildquelle: <a href="http://www.scinexx.de/redaktion/wissen_aktuell/bild12/genomik3g.jpg">http://www.scinexx.de/redaktion/wissen_aktuell/bild12/genomik3g.jpg</a> , 30.01.2018) .....	19

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Vor- und Nachteile von DNA-Barcodingmethoden .....	17
------------	--	----

# 1 Veranlassung

Die Staatliche Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft betreibt in eigener Verantwortung Umweltanalytik und Umweltmessungen für die Auftrag gebenden Behörden des Sächsischen Staatsministeriums für Umwelt und Landwirtschaft. Hierzu erhebt sie Daten über den Zustand von Boden, Wasser und Luft sowie zu Gewässerökologie, Biotopen und Arten, Umweltradioaktivität und Meteorologie. Im Bereich der Landwirtschaft werden Produktions- und Futtermittel, Pflanzen und Saatgut sowie Veredelungsprodukte analysiert und bewertet.

Der Bereich „Gewässerökologie“ befasst sich vorrangig mit der Umsetzung der 2000 in Kraft getretenen EG-Wasserrahmenrichtlinie. Die damit verbundenen Aufgaben sind zu einem großen Teil durch die Bestimmung von Gewässerorganismen (Makrozoobenthos, Makrophyten und Phytobenthos, Diatomeen und Phytoplankton) und den daraus resultierenden Artenlisten geprägt. Anhand dieser Listen können Aussagen bezüglich des ökologischen Zustandes, wie z.B. Trophie, Saprobie, allgemeine Degradation, Versauerung und Struktur des untersuchten Gewässerabschnittes getroffen und eine Bewertung erstellt werden. Derzeit findet die Bestimmung der Organismen klassisch anhand morphologischer Merkmale und mit optischen Hilfsmitteln, wie Mikroskopen und Binokularen, statt. Die methodische Entwicklung zur Bestimmung von Organismen schreitet jedoch immer weiter voran und in vielen Bereichen, wie beispielsweise Medizin, Phytopathologie und Kriminalistik haben sich molekularbiologische Methoden bereits etabliert. So arbeiten Mitarbeiter der AG Aquatische Ökosystemforschung der Universität Duisburg-Essen u.a. im Bereich des Makrozoobenthos sehr aktiv an einer molekularbiologischen Methode, welche die Voraussetzungen der EG-WRRL erfüllt. Bei dieser Methode spielen insbesondere das Barcoding eine wesentliche Rolle. Bei den anderen Qualitätskomponenten gibt es ebenfalls Bestrebungen, molekularbiologische Methoden zu etablieren (Diatomeen) oder zumindest taxonomische Probleme zu klären (bspw. Cyanobakterien und Makrophyten).

Im Auftrag des Sächsischen Landesamtes für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie verfolgt die BfUL die aktuellen Entwicklungen und führt eigene Versuche zur Umsetzung und Machbarkeit für die verschiedenen Qualitätskomponenten durch.

## 2 Einleitung

Taxonomie - die Determination von Arten - ermöglicht ein grundlegendes Verständnis ökologischer Zusammenhänge und der Evolution. Heutzutage ist sie aufgrund innovativer Forschung, evolutiver Fragestellungen und politisch relevanter Ziele zur Erhaltung der globalen Biodiversität in viele Disziplinen eingebunden (LOHRMANN et al. 2012). „Beispiele sind die Identifikation invasiver Arten, die nachhaltige Bewirtschaftung mariner Ressourcen oder die Entwicklung neuer Medikamente. Zudem ist die Kenntnis der Arten und ihrer Interaktionen nötig, um im politischen Raum die Erreichung - oder auch Nichteinhaltung - von Biodiversitäts- und Nachhaltigkeitszielen zu dokumentieren“ (LOHRMANN et al. 2012). Daher sind aussagekräftige Monitorings und Modelle zur Entwicklung unserer Ökosysteme nur mit der nötigen Artenkenntnis und mit Hilfe taxonomischer Methoden möglich.

Auch die Gewässerökologie im Speziellen befasst sich mit den Arten samt deren Funktion und Wirken im Ökosystem. Die Ermittlung des ökologischen Zustandes von Fließ- und Standgewässern nach EG-Wasserrahmenrichtlinie (EG-WRRL<sup>1</sup>) erfolgt anhand sogenannter biologischer Qualitätskomponenten der Gewässerflora und -fauna: Fische, Makrozoobenthos (MZB), Makrophyten/ Phytobenthos und Phytoplankton. Für diese Gruppen werden Artenzusammensetzungen und Artenhäufigkeiten erfasst und im Zusammenhang mit ihren ökologischen Eigenschaften bewertet. Die taxonomische Bestimmung der Organismen ist dabei von zentraler Bedeutung. Ohne Indikatorarten und Abundanz- bzw. Biomasseabschätzungen ist aktuell keine Zustandserfassung nach den Anforderungen der EG-WRRL möglich. Das Erstellen von Artenlisten ist zeitintensiv und setzt einen hohen taxonomischen Kenntnisstand der Bearbeiter voraus. Hinzu kommt, dass einige Arten schwer zu bestimmen oder morphologisch nicht differenzierbar sind. An diesen Punkten setzt die moderne Molekularbiologie an. Sie verspricht objektiv, schnell und mit hoher Sicherheit Arten zu determinieren. Hierbei erlaubt die Molekularbiologie ein tiefergehendes Bestimmungs-niveau und somit einen Gewinn an informativen Daten. Die vorliegende Veröffentlichung dient der Überprüfung, inwieweit sich molekularbiologische Methoden mit dem gegenwärtigen Entwicklungsstand in die Praxis integrieren lassen und welche Herausforderungen dies beinhaltet. Dabei werden die Qualitätskomponenten Makrozoobenthos und Makrophyten praktisch bearbeitet.

<sup>1</sup> Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik (ABl. L 327, 22.12.2000, p.1)

# 3 Molekularbiologie

Das DNA-Barcoding ist ein taxonomisches Verfahren, um bestimmte genetische Merkmale eines Individuums anhand der DNA-Sequenz eines Markergens<sup>2</sup> molekularbiologisch zu bestimmen. Die Abfolge der Basenpaare wird dabei, ähnlich dem Strichcode auf Lebensmittelverpackungen, als Kennzeichen für eine bestimmte Art verwendet. Es genügt bereits wenig organisches Material eines Organismus, um eine Art zuverlässig bestimmen zu können. So ermöglicht der DNA-Barcode sowohl die Identifizierung bekannter Arten als auch die Entdeckung neuer. Im Labor wird dazu mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ein bestimmter DNA-Abschnitt des zu untersuchenden Taxons vervielfältigt und die Sequenz bestimmt. Mittels DNA-Barcoding können sowohl einzelne Arten (Single-Barcoding) als auch mehrere Arten gleichzeitig (DNA-Metabarcoding) identifiziert werden. Im Folgenden werden die einzelnen Verfahren genauer erläutert.

## 3.1 Barcodingmethoden

### Single-Barcoding

Mit Single-Barcoding lassen sich einzelne Organismen bis auf die Art genau bestimmen. Bei der Identifizierung von schwierigen und artenreichen Gruppen ist diese Methode besonders hilfreich, so auch bei speziellen Entwicklungsstadien (Ei, Larve), Teilen und Fragmenten von Organismen (Blatt, Bein eines Insekts). Jede einzelne Art besitzt ihren eigenen, individuellen Barcode, welcher mit den bereits hinterlegten Barcodes in einer Datenbank abgeglichen und identifiziert werden kann. Das Single-Barcoding versteht sich als methodisches Vorstadium für die nachfolgenden molekularbiologischen Methoden.

### DNA-Metabarcoding

Metabarcoding ist eine Methode, bei der eine Mischprobe aus Organismen als Ganzes untersucht wird, ohne zeitaufwendige Vorsortierungen leisten zu müssen. Beim Metabarcoding wird ein allgemein gültiger Marker verwendet, der bei möglichst allen Taxa einer bestimmten Organismengruppe vorhanden ist sowie der dazu passende, möglichst universelle Primer (ELBRECHT & LEESE 2015). So lassen sich theoretisch hunderte bis tausende Arten aus einem „Arten-Gemisch“ in einem einzigen Analysegang nachweisen (ELBRECHT & LEESE 2017).

### eDNA

Environmental DNA (eDNA) oder Umwelt-DNA ist eine nicht invasive Methode, um die Präsenz von einer oder mehreren Arten in Gewässern mittels einer Wasserprobe, oder aber auch in terrestrischen Systemen (z. B. Bohrlöcher von Käfern in Holz) nachzuweisen. Dabei wird, im Gegensatz zum Metabarcoding, die DNA nicht direkt aus dem Organismus gewonnen, sondern die sich frei in der Wasserprobe befindliche DNA genutzt, welche u. a. durch Ausscheidungen, Körperzellen oder abgestorbenes Pflanzenmaterial in das Gewässer abgegeben wurde (FICETOLA et al. 2008; DEJEAN et al. 2012; THOMSEN et al. 2012; SCHMIDT & URSENBACHER 2015; RÜEGG et al. 2017). eDNA ist vor allem für einen gezielten Nachweis einer bestimmten Art geeignet, um Invasionsrouten zu erkennen oder um seltene Arten nachzuweisen (LEESE & HERING 2017; MITTL 2017; THOMSON et al. 2012; STOECKLE et al. 2016).

<sup>2</sup> Der Begriff Markergen (molekularer Marker) bezeichnet ein variierendes Merkmal eines DNA-Abschnittes, dessen Ort im Genom eindeutig nachgewiesen ist. Ein guter Marker sollte sowohl hoch konservierte Bereiche (für alle Organismen gleich), als auch hoch flexible (artspezifische) Bereiche aufweisen. Für die Untersuchung von MZB-Organismen eignet sich der Marker der CO1-Region (Gen der Cytochrome-c-Oxidase Untereinheit 1; ELBRECHT & LEESE 2017a; ELBRECHT & LEESE 2017b)

Im Fachbereich 55 „Messnetz Naturschutz“ der BfUL werden derzeit eDNA-Verfahren für das Monitoring von ausgewählten FFH-Arten in Zusammenarbeit mit dem Prof. Hellriegel Institut der Hochschule Anhalt entwickelt und getestet. Beispielsweise für den Kammmolch, der sich systematisch nur mit aufwendigen Fallenfangsystemen erfassen lässt, aber auch für andere Amphibien ist die Methode interessant. Bestünde doch damit die Möglichkeit, mit relativ wenig Aufwand über Wasserproben und der darin enthaltenen DNA die Präsenz der verschiedenen Arten in einer Vielzahl an Gewässern in kurzer Zeit zu überprüfen. Selbst kleine Populationen, die mit herkömmlichen Methoden unter der Nachweisgrenze liegen, könnten so erfasst werden. Für manche Arten ist es bedeutsam, dass der Nachweis mittels Wasserprobe ohne Zugriff auf die Tiere und ohne Störung der Habitate erfolgt (nichtinvasiv). Dass dies funktioniert, wurde in vielen Publikationen (u.a. FICETOLA et al. 2008; THOMSEN et al. 2012) dargestellt. In Deutschland werden solche Verfahren erfolgreich angewandt, beispielsweise bei der Flussperlmuschel, deren Ausscheidungen und abgestoßene Schleimhautzellen als DNA im Wasser nachweisbar sind (vgl. STOECKLE et al. 2016). Bezüglich des Kammmolches und anderer Amphibien wurde die Methode seitens des Prof. Hellriegel Institutes im Auftrag der BfUL soweit entwickelt, dass ein artspezifischer Nachweis von Amphibien über eDNA auch unter den Bedingungen in Sachsen zweifelsfrei möglich ist (MITTL et al. in Vorber.). Die Labormethoden wurden 2017 im Labor der BfUL im Fachbereich „Messnetz Naturschutz“ implementiert. Damit sind die Kollegen des Fachbereiches grundsätzlich in der Lage, Wasserproben auf die Anwesenheit von Kammmolchen im Entnahmegewässer zu untersuchen. Erste Feldversuche am Aueteich Nimbschen bei Grimma haben gezeigt, dass ein Präsenznachweis über eDNA mit hoher Sicherheit möglich ist (MITTL 2017). Im nächsten Monitoringdurchgang soll in allen Gewässern, in denen die Kammmolche mit den herkömmlichen feldbiologischen Methoden nicht nachweisbar sind (im zurückliegenden Berichtszeitraum 2013 - 2018 war das bei 50 % der untersuchten Gewässer der Fall), die eDNA-Methode im Sinne eines Zweitverfahrens angewendet werden. Künftig wird die Methode aber auch der Überblickskartierung und der Vorbereitung vertiefender Untersuchungen dienen. Populationsbiologische Erfassungen, bei denen neben Populationsgrößen auch Alters- und Geschlechterstrukturen eine Rolle spielen, werden auch weiterhin mit herkömmlichen feldbiologischen Verfahren stattfinden. Die direkte Beobachtung der Tiere soll also nicht ersetzt, sondern unterstützt werden.

Dieser Abschnitt soll das Potenzial von eDNA im Naturschutz darstellen. Für den Fachbereich „Gewässerökologie“ sind insbesondere die Barcoding-Methoden von Bedeutung, weshalb im Verlauf dieser Arbeit eDNA-Methoden nicht weiter behandelt werden.

## 3.2 Von der Probenahme zur Artbestimmung

Die Arbeitsschritte der im vorangegangenen Kapitel dargestellten Verfahren folgen im Grunde dem gleichen Schema (Abbildung 1). Je nach Zielstellung und Organismus bzw. Organismengruppen müssen die Konservierung, DNA-Extraktion, die verwendeten Marker, die Primer, das PCR-Protokoll sowie die verwendete Datenbank für den Abgleich angepasst werden. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte genauer erläutert.

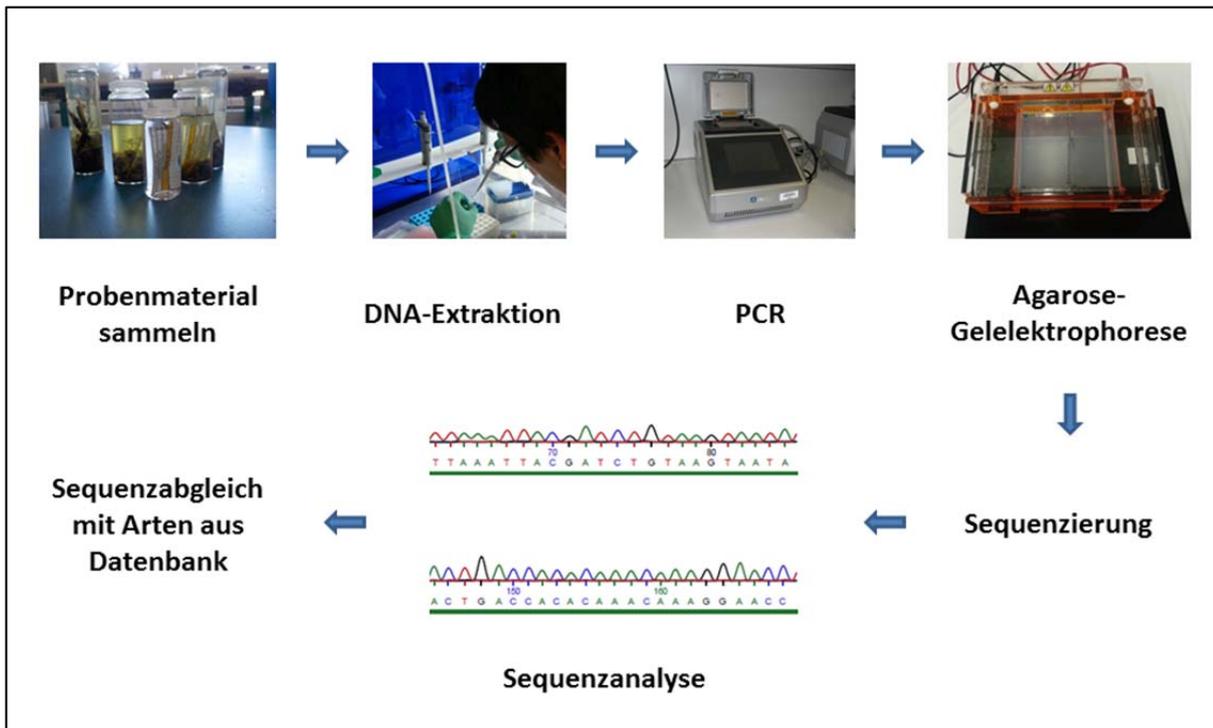


Abbildung 1: Analyseschritte für die Bestimmung einer Art mittels DNA-Barcoding (stark vereinfacht, Foto: BfUL)

### Probenahme

Die Probenahme für die molekularbiologischen Verfahren unterscheidet sich nicht von denen der klassischen, morphologischen Verfahren. Durch das sogenannte Multi-Habitat-Sampling werden die Habitate der Untersuchungsstelle proportional zu ihrem Vorkommen beprobt (Abbildung 2). Lediglich bei der Konservierung und Aufarbeitung gibt es Unterschiede. Entweder erfolgt die Verwendung von frischem Material oder die Organismen müssen in hochprozentigem Ethanol konserviert werden (Makrozoobenthos und Algen). Bei Makrophyten besteht zusätzlich zur Verarbeitung von Frischmaterial die Möglichkeit der Nutzung von Herbarmaterial. Hierbei gilt jedoch, dass mit zunehmendem Alter des Materials die Qualität der DNA abnimmt. (DE VERE et al. 2012)



Abbildung 2: Makrozoobenthos-Probenahme nach dem Multi-Habitat-Sampling-Verfahren (links) und-Siebvorrichtung zum Spülen und Abtrennen verschiedener Fraktionen (Foto: BfUL)

## DNA-Extraktion

Die DNA-Gewinnung bzw. -Isolierung für das Singlebarcoding erfolgt über die Entnahme von Biomasse (Muskel- fleisch, Blatt, Thallus o. ä.). Anschließend wird aus dem gewonnenen Gewebe die DNA extrahiert und für die Polymerasekettenreaktion aufbereitet. Oftmals erweisen sich Kits<sup>3</sup> zur Extraktion und Reinigung der DNA als sehr hilfreich. Die DNA-Gewinnung ist von allen Verfahrensschritten am empfindlichsten und enthält die meisten Fehler- quellen. Dies können z. B. Verunreinigungen durch andere Organismen oder der Einsatz bzw. das Vorhandensein von PCR-inhibierenden Stoffen sein.

## Polymerasekettenreaktion (PCR)

Der nächste Schritt besteht in der Vervielfältigung (Amplifikation) eines Markergens mittels PCR, wobei der verwendete Marker immer der Fragestellung anzupassen ist. Die extrahierte DNA wird in einem Thermocycler, unter Anwendung spezieller Temperatur-Programme, vervielfältigt. Hierbei wird die DNA-Doppelhelix aufgetrennt (Denaturierung bei ca. 94°C), die Primer<sup>4</sup> hybridisieren an die Einzelstränge (Annealing bei ca. 55°C) und abschließend wird mithilfe der Taq-Polymerase der komplementäre Gegenstrang gebildet (Elongation bei ca. 72°C). Diese Schritte werden in 30–40 Zyklen wiederholt, wobei es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des Markergens kommt (MÜLHARDT 2009). Die Kontrolle der PCR erfolgt in Form einer Agarosegelelektrophorese, um zu prüfen, ob die DNA-Extraktion und PCR erfolgreich waren. Hierbei macht man sich die negative Ladung der DNA zunutze. Die Nukleinsäure-Stränge werden in einem Agarosegel unter Anlegen einer elektrischen Spannung nach ihrer Größe aufgetrennt, um sie anschließend durch den Vergleich ihrer Größe und Masse mit DNA-Strängen bekannter Größe zu identifizieren (ADKINS & BURMEISTER 1996).

## Sequenzierung und Auswertung

Das gewonnene PCR-Produkt wird für die Sequenzierung aufgereinigt. Hierbei werden überschüssige Nukleotide, Polymerasen, Primer und weitere Inhaltsstoffe der PCR aus der Lösung entfernt, sodass am Ende lediglich das PCR-Produkt vorliegt. Anschließend wird die Probe zur Sequenzierung an einen Dienstleister übermittelt, wobei die Abfolge der Gensequenz bzw. der Nukleotid-Sequenzdaten in einem DNA-Molekül bestimmt wird. Die Art der Sequenzierung ist abhängig von der Fragestellung. Derzeit wird für die Identifizierung einer Art (Singlebarcoding) die Didesoxymethode nach Sanger (Sanger-Sequenzierung, SANGER et al. 1977) angewendet. Die aufwendigere Sequenzierung einer Mischprobe (Metabarcoding) wird mithilfe einer Hochdurchsatz-Sequenzierung durchgeführt. Diese wird auch als Next Generation Sequencing (NGS) bezeichnet und ermöglicht theoretisch, Millionen von DNA-Fragmenten parallel in einem einzigen Arbeitsschritt zu sequenzieren. Die Ergebnisse von NGS sind bisher ungenauer als die der Sanger-Sequenzierung und erlauben weniger direkte Verknüpfungen der DNA zu dem abstammenden Organismus (STEIN et al. 2014). Die erhaltenen Sequenzen werden im nächsten Schritt in Datenbanken (z. B. BOLD, NCBI) mit hinterlegten Sequenzen abgeglichen. Als Ergebnis erhält man im besten Fall die genaue Artbezeichnung.

<sup>3</sup> Ein Kit ist ein Set aus Lösungen, Zubehör und Anleitung für die schnelle und sichere Extraktion hochreiner DNA aus Gewebeproben oder deren Aufreinigung, welches eine einfache Handhabung, schnelle Bearbeitung, hohe Ausbeuten und Qualitätsstandards garantiert (MÜLHARDT 2009).

<sup>4</sup> Als Primer (Oligonukleotid) wird eine synthetisierte Basensequenz bezeichnet. Sie dient als Startpunkt für die PCR indem sie spezifisch an bestimmte DNA-Sequenzen bindet, von der aus die Vervielfältigung der DNA-Sequenzen beginnt (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH 2018). Die Primer sind abhängig vom verwendeten Marker.

# 4 Ermittlung des ökologischen Zustandes mittels molekularbiologischer Verfahren

Nach Maßgabe der Oberflächengewässerverordnung<sup>5</sup> (OGewV), welche der nationalen Umsetzung der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) dient, sind Arten-zusammensetzung, Artenhäufigkeit und in einigen Fällen die Biomasse oder Altersstruktur der biologischen Qualitätskomponenten zu erfassen. Diese Daten dienen der Ermittlung des ökologischen Zustandes der Oberflächenwasserkörper. Die vorgegebenen Verfahren sind standardisiert und interkalibriert<sup>6</sup>.

Metabarcoding und Single-Barcoding verstehen sich als effektive, taxonomische Hilfsmittel zur Bestimmung von schwer differenzierbaren oder kryptischen Arten<sup>7</sup>. Diese Verfahren ermöglichen eine verbesserte taxonomische Auflösung und eine schnellere Bearbeitung von Proben. Daraus resultieren größere Datenmengen von einer potentiell höheren Anzahl an Messstellen. Dies hat eine höhere räumliche und zeitliche Auflösung zur Folge und vergrößert die Aussagekraft des Monitorings für Maßnahmenplanungen.

Im Folgenden wird geprüft, inwieweit die molekularbiologischen Methoden beim gegenwärtigen Stand die klassischen Verfahren bei der Zustandsermittlung unterstützen können, welche Herausforderungen dies beinhaltet und ob eine Integration in die derzeitige Praxis möglich ist.

## 4.1 Methodische Herausforderungen

Genetische Analysen müssen gut geplant und sehr sorgfältig durchgeführt werden. Das größte Risiko ist die jederzeit mögliche Kontamination der Proben. Um diese ausschließen zu können, sind Negativkontrollen während allen Schritten der Analyse notwendig. Neben Kontaminationen und falsch positiven Nachweisen sind falsch negative Ergebnisse bei der PCR eine weitere Fehlerquelle. Positivkontrollen ermöglichen den Ausschluss dieser.

### Konservierung

Derzeit erfolgt die Lagerung von Makrozoobenthosproben in 70 % Ethanol (OFENBÖCK et al. 2010). Für die molekularbiologischen Methoden ist eine Konservierung in hochprozentigem Ethanol > 96 % nötig, um der Degeneration der Proteine entgegenzuwirken. Ähnlich verhält es sich mit Diatomeen- oder Phytobenthosproben, die bisher in Formaldehyd konserviert oder Phytoplanktonproben, welche mit Lugolscher Lösung versetzt werden. Die DNA herbarisierter Makrophyten ist nicht dauerhaft haltbar, sie kann nach langer Lagerung degenerieren (DE VERE et al. 2012).

<sup>5</sup> Verordnung zum Schutz der Oberflächengewässer (Oberflächengewässerverordnung – OGewV 2016) in der Fassung vom 20. Juni 2016 (BGBl. I S. 1373).

<sup>6</sup> Beschluss der Kommission vom 20. September 2013 zur Festlegung der Werte für die Einstufung des Überwachungssystems des jeweiligen Mitgliedstaats als Ergebnis der Interkalibrierung gemäß Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Aufhebung der Entscheidung 2008/915/EG (Amtsblatt der Europäischen Union vom 8.10.2013, L 266/1)

<sup>7</sup> kryptische Arten (Kryptospezies) bezeichnen Arten, die aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften als eine Art klassifiziert werden (PFENIGER & SCHWENK 2007). Die Bestimmung dieser Arten durch morphologische Eigenschaften ist meist nicht oder nur mit hohen Spezialkenntnissen möglich.

## DNA-Extraktion

Für die Analyse von Makrozoobenthos-Mischproben mittels Metabarcoding sollten die Organismen vor der Extraktion der DNA in Größenklassen vorsortiert werden. Auf diese Art lässt sich vermeiden, dass die volumenreiche DNA-Menge großer Tiere (z. B. Schnecken oder Egel) im ungünstigen Fall die volumengeringere DNA von kleinen Tieren (z. B. Zuckmücken- oder Fliegenlarven) überlagert und die Ergebnisse so verfälscht (ELBRECHT et al. 2017a). Weitere Probleme können Hemmsubstanzen, wie beispielsweise Huminstoffe sein, welche jedoch durch die Nutzung spezieller Kits gelöst werden.

## Marker und Primer

Der richtigen Wahl von Markern und Primern muss besonders hohe Aufmerksamkeit beigemessen werden. Sie ist immer abhängig von der Fragestellung und den zu untersuchenden Organismen. So eignet sich der Marker CO1 als universeller Marker für die Analyse tierischer Proben, im Speziellen bei Insekten. Trotz des universellen Markers gibt es immer noch Artengruppen, die auch genetisch nur schwer zu identifizieren sind. CO1 wird sowohl für Singlebarcoding-, als auch für Metabarcoding-Analysen genutzt. Im Gegensatz zu Tieren gibt es bei höheren Pflanzen keinen universellen Marker. Oft benötigt man für jede Gattung einen neuen Marker mit spezifischen Primern. Auch die genaue Determination von Hybriden ist problematisch. Für deren Identifizierung müssen ein genomischer Marker und ein Chloroplasten-Marker parallel untersucht werden, da Chloroplastengene meist nur maternal (mütterlicherseits) vererbt werden. Als genomischen Marker verwendet man in der Regel ITS (Internal Transcribed Spacer) und als Chloroplasten-Marker z. B. das *rbcl*-Gen, oder *matK* (ITO et al. 2014). Der Einsatz bei Makrophyten beschränkt sich derzeit auf die Artanalyse mittels Singlebarcoding. Die molekularbiologische Untersuchung von Algen birgt ähnliche Probleme wie die der Gefäßpflanzen. Allgemein gilt, dass es sich bei den Algen um eine evolutionär sehr alte Gruppe mit vielfältiger Abstammung handelt. Das Genom der Zellorganellen variiert daher stark in Abhängigkeit von Inhalt und deren Organisation. Eine Kombination aus mehreren Markern und Primern bietet sich daher an. HADI et al. (2005) konnten 96 % der 51 untersuchten Süßwasseralgen-Stämme mittels der Kombination aus zwei Markern und zwei Primern sequenzieren. Dabei konnten 35 % der Stämme bis auf Artniveau bestimmt werden. Nutzten sie nur einen Primer, sank die Zahl auf lediglich 6 %. Derzeit eignen sich die Barcoding-Methoden vor allem für die Qualitätskomponenten Makrozoobenthos, Makrophyten und Diatomeen.

## Datenbanken

Datenbanken dienen dem Abgleich der gewonnenen Sequenz mit bekannten Sequenzen und einer Artzuordnung über diese. Für eine sichere Auswertung der Analyse-Ergebnisse sind gut gepflegte Datenbanken mit einem hohen Qualitätsstandard unabdingbar. Hierzu ist es notwendig, dass die hinterlegten Organismen morphologisch von Experten bestimmt werden und zusätzlich eine molekularbiologische Untersuchung der Taxa stattfindet. Ohne validierte Taxonomie würde den Datenbanken der Bezug zwischen genetischen Markern und der in der Literatur dokumentierten, artspezifischen Information fehlen (WÄGELE et al. 2012). Um die Qualität der Datenbanken zu erhöhen, werden alle Organismen darüber hinaus mit automatischen bildgebenden Verfahren erfasst. Zusätzlich muss die geographische Verbreitung dokumentiert werden (WÄGELE et al. 2012). Die praktische Nutzung der Datenbanken offenbart jedoch auch potenzielle Fehlerquellen. Fragt man die Daten zu einer gewonnenen Sequenz ab, so bekommt man im besten Fall 100 % Übereinstimmung mit einer hinterlegten Sequenz. Nun muss geprüft werden, ob es sich bei der hinterlegten Sequenz um eine vertrauenswürdige Quelle handelt. BOLD (Barcode of Life Data) gibt den Status der Quellen als „published“, „early-release“ oder „private“ an. Hierzu ist es sinnvoll, den Schwerpunkt auf veröffentlichte Sequenzen zu legen und sich mit den dort verlinkten Veröffentlichungen zu befassen. Des Weiteren besteht in vielen Fällen die Möglichkeit, die eigene Sequenz mit mehreren hinterlegten Sequenzen abzugleichen. Gibt es 100 % Übereinstimmung mit mehreren Sequenzen aus verschiedenen Veröffentlichungen und/ oder anderen Datenbanken, so minimiert sich der potenzielle Fehler. Für die Qualitätssicherung ist es

notwendig, eine Untergrenze der Übereinstimmung der abzugleichenden Sequenzen mit den vorhandenen Daten festzulegen. Hierzu gibt es derzeit keine allgemeingültigen Regeln.

Nach den Erfahrungen von WÄGELE et al. (2012) können z. B. bei Insekten zwischen 90 und 98 % der traditionell anerkannten Arten sicher molekularbiologisch unterschieden werden (u. a. Käfer, RAUPACH et al. 2010 und Schmetterlinge, HAUSMANN et al. 2011). Wird die Analyse automatisiert und ohne Bezug zur Datenbank durchgeführt, ist der Erfolg bei nah verwandten Arten jedoch deutlich niedriger (ASTRIN et al. 2012). Vom Großteil der erfassten Arten (mind. Bundestaxaliste, MAUCH et al. 2003) liegen jedoch die Sequenzen zum Abgleich in den Datenbanken (z. B. GBOL, BOLD) vor. Die Arbeitsgruppe von Prof. Leese hat somit bereits einen Großteil der operativen Taxaliste für MZB-Organismen katalogisiert. Faktisch sind damit genügend Sequenzen vorhanden, um beim Makrozoobenthos eine aussagekräftige Bewertung zu bekommen. Nicht katalogisierte Sequenzen bzw. Taxa könnten später auch in Zahlen oder kryptischen Buchstaben-Kürzeln erfasst werden.

Eine Zuordnung zu ökologischen Präferenzen scheint hier weniger schwierig, da anhand der dem Fundort eindeutig zuordenbaren Taxa entsprechende chemische und physikalische Parameter zugeordnet werden können. Eine höhere Anzahl an Artenlisten von deutlich mehr Messstellen in kürzerer Zeit ermöglicht es somit, auch kryptischen Arten eine Autökologie zuzuweisen.

ZIMMERMANN (persönl. Mitteilung 2017) geht davon aus, dass bei den Diatomeen derzeit 20 % der Daten aus Datenbanken als zweifelhaft zu bewerten sind. R-Syst (Réseau de Systématique, französische Datenbank) vom *Institut National de la Recherche Agronomique* ist nach seiner Ansicht derzeit am geeignetsten für Diatomeen, wohingegen BOLD momentan besser für vielzellige Tiere geeignet ist.

Beim Phytoplankton und Phytobenthos (ohne Diatomeen) besteht das Problem, dass noch nicht genügend Arten phylogenetisch eingeordnet sind. Ein Grund könnte die schwierige Kultivierung der einzelnen Taxa unter Laborbedingungen sein, ein anderer, dass für etliche Gruppen wenig gute und aktuelle Bestimmungsliteratur und immer weniger Spezialisten zu der sehr diversen Gruppe Phytobenthos vorhanden sind.

Bei Makrophyten gibt es für die Gattungen *Callitriche*, *Potamogeton* und *Ranunculus* mittlerweile ausreichend Barcodes in den Datenbanken BOLD und NCBI. Damit ist Barcoding jedoch momentan nur für die genannten Gattungen anwendbar.

### Artabgrenzung

Für die Ermittlung des ökologischen Zustandes ist eine molekularbiologische Artabgrenzung in der Praxis nicht notwendig, da in den Datenbanken Gensequenzen von klassisch morphologisch bestimmten Taxa vorliegen. Die Artabgrenzung ist somit im Vorfeld erfolgt. Es ist jedoch festzulegen, welches Maß an Übereinstimmung der Sequenzen mindestens nötig ist, um mit hoher Sicherheit sagen zu können, dass es sich um eine bestimmte Art handelt. Hier erfolgt der Abgleich der Sequenz mit mehreren Datensätzen, wobei eine Übereinstimmung von mehr als 98 % bei mehreren Datensätzen ausreichend ist. Bei Artengruppen, für die in den Datenbanken weniger gute Datensätze vorhanden sind, wird ein Abgleich komplizierter. Auch MEYER & PAULAY (2005) kamen zu dem Ergebnis, dass Barcoding nur bei bekannten und taxonomisch soliden Artengruppen sichere Ergebnisse liefert. ASTRIN et al. (2012) konnten zeigen, dass bei Rüsselkäferarten die häufig morphologisch nicht unterscheidbaren Arten ganz unterschiedlichen, einzigartigen genetischen Linien angehören. Dagegen ließen sich einige klar ökologisch unterscheidbare Formen mittels Barcoding anhand ihrer Gensequenzen nicht unterscheiden. Hier zeigt sich die Bedeutung des integrativen Ansatzes (integrative Taxonomie<sup>8</sup>) zur vollständigen Beschreibung von Funktionsgefügen durch das komplettierte Artinventar eines Lebensraums.

<sup>8</sup> integrative Taxonomie kombiniert klassische taxonomische Verfahren mit modernen molekularbiologischen Methoden zur Bestimmung bzw. Abgrenzung von Arten. (PADIAL et al. 2010, SUKUMURAN & GOPALAKRISHNAN 2015)

## 4.2 Ökologische Zustandsermittlung

Beim Metabarcoding ist das Ergebnis eine Artenliste mit Bezug zum Ort und Zeit der Beprobung eines Fließgewässers. Genau wie bei der klassischen Methode wird somit die punktuelle Situation eines Gewässerabschnitts ausgewertet. Die bei Fließgewässern über eDNA erfassten Informationen besitzen hingegen keinen direkten räumlichen Bezug zur Probestelle, da eDNA in Fließgewässern große Distanzen von mehreren Kilometern zurücklegen kann (DEINER & ALTERMATT 2014). Für die klassische Ermittlung des ökologischen Zustandes sind neben Indikatororganismen Abundanzen und/oder Biomassevolumen für die Berechnung der Qualitätskomponenten unerlässlich. Diese können jedoch bei der Anwendung molekular-biologischer Methoden (noch) nicht ermittelt werden. Es ist daher notwendig, diese in die Metabarcodingmethoden zu integrieren oder Richtlinien zu erstellen, die auf eine Bewertung mittels Abundanzen verzichten könnten. Rein PCR-basierte Metabarcoding-Bewertungen der Biodiversität sollten nach derzeitigem Wissensstand am besten auf Präsenz-Abwesenheits-Metriken beruhen (ELBRECHT & LEESE 2015) oder sich in die klassischen Methoden integrieren.

RÜEGG et al. (2017) haben bereits erste Versuche unternommen, molekularbiologische Methoden (eDNA) in das Makrophytenmonitoring von Standgewässern zu integrieren. Sie stellten dabei fest, dass weder die Probenahme vereinheitlicht ist, noch für alle Organismen passende Primer (artspezifisch vs. universell) vorhanden sind. Des Weiteren können Kontaminationen gegebenenfalls Probleme bereiten und es lässt sich kein Zusammenhang zwischen eDNA-Konzentration und Abundanz ermitteln. Die Detektion von Hybriden war oft zufällig und der Mechanismus der Artbildung ist noch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen mittels PCR sind bereits möglich (Marker: ITS für Kern und trnL-F für Chloroplast), aber vor allem bei Neufunden und gemischten Populationen gibt es noch immer Probleme. Daher sehen RÜEGG et al. (2017) den Einsatz molekularer Methoden bei den Makrophyten vor allem als Möglichkeit für die sichere Artbestimmung, zur Detektion von Überlappungsgebieten und Hybriden, zur Untersuchung von alten Typusexemplaren, zur Überprüfung der Autökologie und bei Populationsstrukturanalysen. Für die Monitoringpraxis bedeutet dies keinen Ersatz, sondern vielmehr eine Integration der molekularbiologischen Methoden. Vorzugsweise bei kritischen und ökologisch relevanten Arten kann die Methode zu neuen Erkenntnissen führen.

Zur Bestimmungsgenauigkeit von Diatomeen verglichen ZIMMERMANN et al. (2015) klassische und genetische Bestimmungsmethoden von Diatomeendeterminationen aus Probenmaterial von sieben Standorten der Oder und Lausitzer Neiße. Die Bestimmung von Diatomeen anhand DNA-Barcoding war fast dreimal so genau wie die morphologische Untersuchung. Während molekulargenetisch 270 Arten und Unterarten entdeckt wurden, konnten morphologisch nur 103 Taxa identifiziert werden. 70 % der DNA-Sequenzen waren dabei bis auf die Art genau bestimmt, etwa 30 % bis zur Gattung, entweder, weil die Art noch unbekannt oder bisher nicht in der Referenzdatenbank vorhanden war. Nach derzeitigem Stand wird es in Deutschland keine verbindliche Normen zum Diatomeen-Barcoding geben (Sitzung des Normierungsausschusses 119-01-03-05 Unterausschuss „Biologische Verfahren“ am 06.12.2017).

# 5 Gegenwärtige Einsatzmöglichkeiten molekularbiologischer Verfahren in der WRRL-Praxis

Obwohl molekularbiologische Methoden schon seit Jahrzehnten in der modernen Biologie Anwendung finden, werden sie erst seit Kurzem zur ökologischen Zustandsermittlung von Gewässern in Erwägung gezogen. Durch die fehlende Praxiserfahrung sind entsprechend wenig Erfahrungsberichte und Veröffentlichungen vorhanden.

In England sollte, nach den Informationen von ZIMMERMANN (persönl. Mitteilung) und KELLY (persönl. Mitteilung), die klassische Taxonomie bei der Komponente Diatomeen für die Ermittlung des ökologischen Gewässerzustands von der DNA-basierten Methode abgelöst werden. Für die Hauptbewertung mussten jedoch zusätzlich die traditionellen Methoden herangezogen werden, um plausible Ergebnisse zu erhalten.

Für die Abschätzung der Übertragbarkeit der Theorie in die Praxis fanden erste eigene Versuche der Staatlichen Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft zur Determination einzelner Organismen statt. Diese zielten darauf ab, morphologisch sicher bestimmbare Arten des Makrozoobenthos und eine kritische Gattung der Makrophyten, von denen Barcodes in den Datenbanken hinterlegt sind, mittels Single-Barcoding zu überprüfen. Beim Makrozoobenthos wurden vier konservierte Arten aus vier unterschiedlichen taxonomischen Ordnungen untersucht (*Ephemera danica*, *Gammarus pulex*, *Asellus aquaticus* und *Corbicula fluminea*). Bei den Makrophyten handelte es sich um Proben der Gattung *Callitriche* aus Frischmaterial und Herbarbelegen. Als Grundlage für die Untersuchung der MZB-Organismen dienten die Laborprotokolle der Arbeitsgruppe Aquatische Ökosystemforschung von Prof. F. Leese von der Universität Duisburg-Essen. Es wurden zwei verschiedene DNA-Extraktionsmethoden angewandt: ein klassisches DNA-Extraktionsverfahren (modifizierte Salzfällung nach SUNNUCKS & HALES 1996) und die Verwendung eines Kits (Maxwell 16 FFS Nucleid Acid Extraction Kit). Beim Makrozoobenthos konnte mittels Agarose-Gelelektrophorese der Nachweis erbracht werden, dass die DNA-Extraktion und PCR in beiden Verfahren erfolgreich waren. Die Anwendung des kostengünstigeren klassischen Extraktionsverfahrens zeigte bei den Makrophyten keinen Erfolg. Die verwendeten Reagenzienmischungen, Primersequenzen und Einstellungen für den PCR-Cycler wurden aus LES et al. (1993), PHILBRICK & LES (2000) und PRINTZEN et al. (2014) entnommen. Nach der Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte die Weitergabe an das Sequenzierlabor Eurofins Genomics GmbH. Beim Makrozoobenthos ergaben alle ermittelten Sequenzen erfolgreiche Treffer in den Datenbanken. Jedoch zeigten sich erste methodische Probleme bei dem verwendeten universellen Primer, welche sich in der Qualität der Sequenzanalyse eines Taxons zeigte. Bei den Makrophyten wurde dieses Problem besonders deutlich. Aufgrund identischer Ähnlichkeitsgrade war bei zwei von drei Proben keine eindeutige Zuordnung der Sequenzen möglich. Solche Hybrid-Art-Kombinationen können auch bei besten Sequenzen mit dem verwendeten Marker nicht getrennt werden.

Im nächsten Schritt wurde aus dem laufenden WRRL-Monitoringprogramm eine Messstelle herausgesucht, welche ein artenreiches Invertebraten-Spektrum aufweist. Nach einer standardisierten Probenahme und Konservierung in hochprozentigem Alkohol erfolgte die Erstellung einer Artenliste durch klassische, morphologische Determination. Danach wurden die Tiere getrocknet und in zwei Größenklassen aufgeteilt. Dies soll eine höhere Sequenzausbeute ermöglichen und biomassereiche Individuen nicht überrepräsentieren. Nach erfolgreicher DNA-Extraktion wurden die Proben eingefroren. Die nächsten Schritte bis zur Sequenzierung erfolgen Ende 2018.

Die Versuche dazu konnten nur durchgeführt werden, weil dankenswerter Weise die Infrastruktur des Geschäftsgebietes 4 „Landwirtschaftliches Untersuchungswesen“ genutzt werden konnte. Ansonsten sind hohe Anfangsinvestitionen nötig.

# 6 Abwägung und Kombination klassischer und molekularbiologischer Verfahren

Welche Barcodingmethode für welche Komponente geeignet ist, hängt stark von der Fragestellung ab. Die allgemeinen Vor- und Nachteile der genetischen Methoden sind in Tabelle 1 aufgeführt. Für die bisherigen Anforderungen können die genetischen Verfahren die klassischen Methoden nicht ersetzen. Ziel ist es, dass Single-Barcoding ergänzend zu den klassischen Methoden bei schwer bzw. durch klassische Taxonomie nicht bestimmbar Arten des Makrozoobenthos und der Makrophyten anzuwenden. Für die reine Zustandsermittlung ist der zusätzliche Aufwand sinnvoll, wenn das jeweilige Taxon bewertungsrelevant ist bzw. ihm ein indikatorischer Wert zugrunde liegt. Die Bestimmung von einzelnen, nicht thallobildenden, benthischen oder phytoplanktischen Algenarten wäre mittels DNA-Barcoding nur dann möglich, wenn sie unter Laborbedingungen kultiviert werden. Der Aufwand der Kultivierung übersteigt hierbei aber weitestgehend den Nutzen für die Ermittlung des ökologischen Zustandes von Gewässern. Mittels Metabarcoding ist es zwar theoretisch möglich, viele Arten in einer Mischprobe in kurzer Zeit zu erfassen und somit eine zur klassischen Methode kongruente Artenliste zu erstellen, jedoch bleibt die Abundanz-Problematik bisher ungeklärt. Dadurch ist eine Integration dieser Methode in die derzeit standardisierten Verfahren nicht möglich. Synergieeffekte durch die Kombination klassischer Morphologie und molekularbiologischer Verfahren sind daher von höchster Bedeutung. Beispielsweise könnte eine Überarbeitung der Taxalisten dazu führen, dass neue Indikatorarten identifiziert werden oder neue autökologische Fragestellungen erkannt werden. „Es gilt daher nicht, einen bewährten Zweig der Biologie abzuschaffen, sondern ihn um neue Technologien zu ergänzen“ (STEINKE & BREDE 2006). Auch WÄGELE et al. (2012) unterstreichen die Bedeutung der Zusammenarbeit von Taxonomen und Molekularbiologen (integrative Taxonomie, vgl. oben).

**Tabelle 1: Vor- und Nachteile von DNA-Barcodingmethoden**

Vorteile	Nachteile
Schnelle, hochauflösende Artbestimmung	Bisher keine Abundanzen oder Volumina
Determination morphologisch schwer unterscheidbarer Arten und Ökomorphen	Nur zum Teil kompatibel mit gegenwärtigen Bewertungsrichtlinien
Hoher Grad an Standardisierung möglich	Nicht alle Individuen werden sicher erfasst
Informationen zur Ausbreitungsgeschichte	Verlust taxonomischer Expertise
Massenanalyse von Umweltproben möglich	Lücken in der Datenbank (stetig abnehmend)
Kryptischen Arten kann besser eine Autökologie zugewiesen werden	Insbesondere einige der taxonomisch schwer zu identifizierenden Arten sind molekularbiologisch schwer abgrenzbar (Markersuche)
Hohe technische Reproduzierbarkeit	Empfindliches Verfahren mit vielen möglichen Fehlerquellen von der Probenahme bis zur Sequenzierung
Sinkende Kosten in der Zukunft	

# 7 Zeitlicher Aufwand und Abschätzung von Kosten

Die Abschätzung der folgenden Angaben erfolgte unter der Voraussetzung, dass die molekularbiologischen Methoden routiniert und ohne Ausfälle oder Verfahrensfehler laufen. Es ist daher möglich, dass die Aufwendungen zu Beginn höher sind, als im Folgenden dargestellt. Außerdem sind, mit fortschreitender Forschung an den Verfahren und steigender Technisierung, sinkende Kosten zu erwarten, sowohl was die Anschaffungskosten als auch die externen Kosten (Sequenzierung) betrifft. Neben den Erkenntnissen aus eigenen Versuchen wurden auch Erfahrungen von anderen Arbeitsgruppen aufgenommen sowie vorhandene Literatur herangezogen.

Single-Barcoding ist eine ergänzende Methode zu den klassischen Verfahren. Es ist davon auszugehen, dass für den Zugewinn an Informationen zusätzliche Kosten entstehen. Für Makrozoobenthos belaufen sich die Gesamtkosten für eine Analyse bei idealer Auslastung auf einen unteren zweistelligen Betrag, wobei die Hälfte der Kosten für Material verbraucht wird. Die restlichen Kosten teilen sich gleichmäßig auf Kosten für Personal und Sequenzierung auf. Für das Metabarcoding sind die Kosten für die Verbrauchsmaterialien und die Extraktion etwas höher, da mehr und insbesondere speziellere Primer genutzt werden. Die Größenordnung ist jedoch vergleichbar. Die Kosten für die Sequenzierung (Hochdurchsatzsequenzierung, NGS) sind mit ca. 7.900 € pro Sequenzierdurchgang (aus ELBRECHT et al. 2017b) deutlich höher. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass während eines Sequenziervorganges mehrere hundert Mischproben sequenziert werden können, womit sich die Kosten stark relativieren. Beim Vergleich von Single-Barcoding und Metabarcoding muss immer beachtet werden, dass mithilfe des Single-Barcoding lediglich ein Taxon ermittelt werden kann, während eine Analyse mittels Metabarcoding die Determination einer kompletten Mischprobe mit sehr vielen Taxa erlaubt.

Für Kostenvergleiche von DNA-Barcoding und den klassischen Methoden liegen nur wenige aktuelle Studien vor, was dazu führt, dass die Angaben zu den Kosten von Metabarcoding sehr divers sind. Ein Teil geht davon aus, dass sich die Kosten gegenüber der klassischen, morphologischen Methode schätzungsweise auf zwei Drittel bis drei Viertel der Gesamtkosten belaufen. Ausschlaggebend sind geringere Personalkosten und die Hochdurchsatzsequenzierungen. LEESE & HERING (2017) gehen bei internen Kosten für Metabarcoding von ca. 250 € für Laborarbeit und Sequenzierung je Probe aus. Einige kommerzielle Anbieter versprechen um die 400 € je Probe, teilweise deutlich weniger. Auch die von Ji et al. (2013) genannten Kosten von 200 bis 350 € je Probe stimmen mit den zuvor genannten Quellen ungefähr überein. STEIN et al. (2014) verglichen die Kosten für die klassische Methode und für die neuen genetischen Verfahren zur Ermittlung des ökologischen Zustandes von Gewässern in den USA. Sie kamen entgegen den Ausführungen im vorhergehenden Text zu dem Ergebnis, dass die genetischen Verfahren schätzungsweise 1,7-3,4 mal so kostenintensiv sind wie die klassischen Methoden. Bei signifikanten Ausfällen oder erneuter Sequenzierung können die Kosten sogar das 10-fache erreichen. Den Hauptanteil der Kosten machen die Amplifikation und vor allem die Sequenzierung aus. Wird statt der üblichen Sanger-Sequenzierung das Next-Generation-Sequencing (NGS) durchgeführt, sind die Kosten nach STEIN et al. (2014) als ungefähr gleich zu bewerten. Jedoch sind die Ergebnisse von NGS bisher weniger genau als die der Sanger-Sequenzierung. Die genetischen Verfahren sind demnach zwar teurer, jedoch liefern sie 3-4 mal schnellere Ergebnisse mit höherer taxonomischer Auflösung als die klassischen Methoden (STEIN et al. 2014).

Mit zukünftiger Weiterentwicklung ist davon auszugehen, dass die Kosten für DNA-Barcoding allgemein weiter sinken werden. Beispielhaft hierfür ist die Abbildung 3 für den rapiden Abfall der Kosten für die Sequenzierung des menschlichen Genoms von 2001 bis zum Jahr 2015.

Der zu berechnende Zeitaufwand ist im Wesentlichen abhängig von der Fragestellung, der gewählten Methode und dem Probenumfang. Vor allem, wenn viele Proben parallel laufen, würden sich die Kosten für Verbrauchsmaterialien und Personal voraussichtlich reduzieren. Kann ein höherer Probenumfang durch die genetischen Verfahren realisiert werden, sind jedoch zusätzliche Probenehmerkapazitäten nötig.

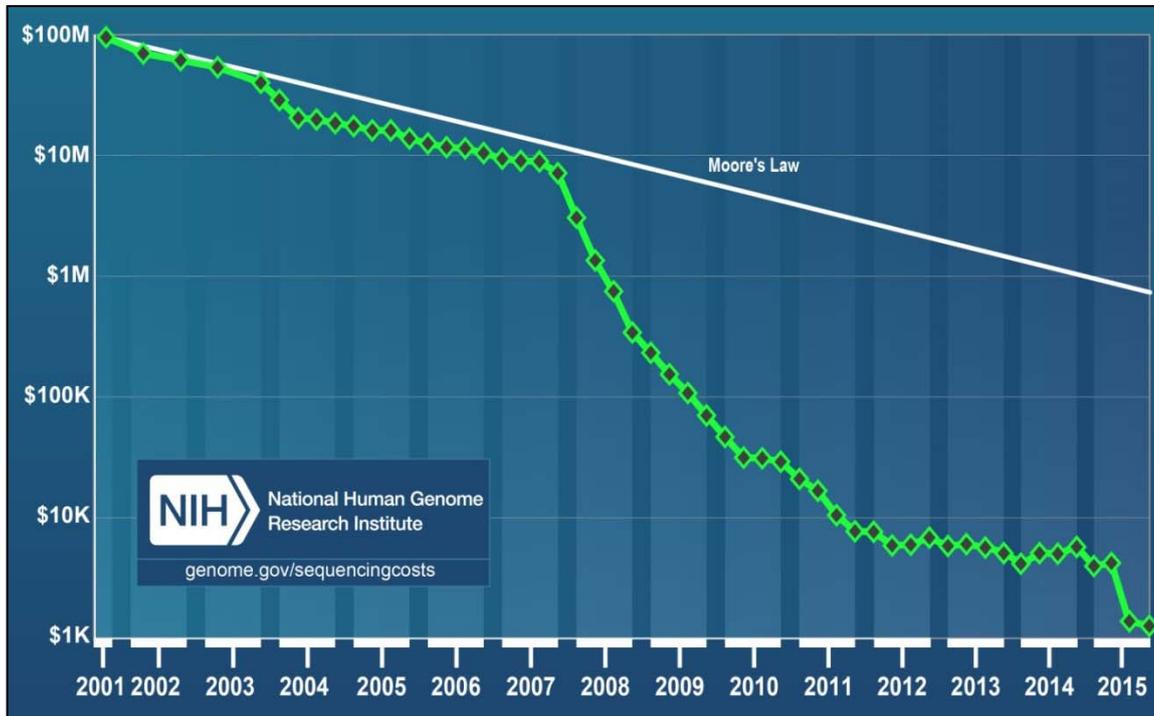


Abbildung 3: Entwicklung der Kosten für DNA-Sequenzierung des menschlichen Genoms (Bildquelle: [http://www.scinexx.de/redaktion/wissen\\_aktuell/bild12/genomik3g.jpg](http://www.scinexx.de/redaktion/wissen_aktuell/bild12/genomik3g.jpg), 30.01.2018)

# 8 Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Berichts werden Einsatz- und Umsetzungsmöglichkeiten molekular-biologischer Verfahren für die Ermittlung des ökologischen Gewässerzustands auf der Basis des gegenwärtigen wissenschaftlichen Kenntnisstands erörtert und teilweise praktisch erprobt. Die Informationen wurden primär durch Literaturrecherche und Erfahrungsaustausch mit diversen Projektgruppen und Experten zusammengetragen. Sekundär wurden die gewonnenen Erkenntnisse durch erste molekularbiologische Analysen seitens der BfUL erprobt und auf ihre Praxistauglichkeit getestet. Die praktischen Versuche trugen dazu bei, die Machbarkeit, die nötigen Kosten und die technischen Voraussetzungen abzuschätzen.

Für einige sehr komplexe und diverse Artengruppen, wie z. B. das Phytobenthos, existiert nicht für alle Gruppen gute und aktuelle Bestimmungsliteratur und spezialisierte Taxonomen sind tendenziell in abnehmender Anzahl vorhanden. Die Ergebnisse zeigen, dass Singlebarcoding geeignet ist, um einzelne Arten molekularbiologisch zu bestimmen. Vor allem bei makroskopischen Arten und Artengruppen, die bisher mit traditioneller Bestimmungsliteratur schwer zu bestimmen sind, stellt das Singlebarcoding eine geeignete Ergänzung dar. Die verbesserte taxonomische Auflösung führt zu robusteren Bewertungsergebnissen. Jedoch lassen sich nicht alle taxonomisch schwer differenzierbaren Arten mittels Barcoding identifizieren. Vor allem für mikroskopische Organismen ist die Methode derzeit noch nicht geeignet. Die Bearbeitung von Phytoplankton-, Zooplankton-, Phytobenthos-, Makrozoobenthos- oder Diatomeenproben mithilfe der klassischen Verfahren ist trotz der genannten Herausforderungen nach wie vor die geeignetere Methode für die Ermittlung des ökologischen Zustandes von Oberflächenwasserkörpern. Die Bestimmung von nicht thallobildenden, benthischen oder planktischen Algenarten wäre mittels Singlebarcoding nur dann realistisch, wenn sie unter Laborbedingungen kultiviert werden. Der Aufwand übersteigt jedoch den Nutzen für die ökologische Zustandsermittlung.

Die genetischen Verfahren sind weitestgehend nicht standardisiert und noch nicht in die Anforderungen der Wasserrahmenrichtlinie integriert. Die klassischen Methoden lassen sich somit nicht einfach durch die genetischen Verfahren ersetzen. Das bisherige Bewertungssystem ist vollumfänglich erprobt, standardisiert und interkalibriert. Jedoch kann die Ergänzung durch genetische Verfahren eine verbesserte taxonomische Auflösung und ein robusteres Bewertungsergebnis liefern. Dieser Mehrgewinn an Daten hätte eine genauere räumliche und zeitliche Auswertung zur Folge und damit eine erhöhte Aussagekraft des Monitorings für Maßnahmenplanungen. Diese Kombination wird als integrative Taxonomie (z. B. PADIAL et al. 2010, SUKUMARAN & GOPALAKRISHNAN 2015) bezeichnet. Sie beschreibt sowohl den Nutzen molekularbiologischer Methoden für die klassischen Verfahren, als auch die hohe Bedeutung der klassischen Taxonomie für die Entwicklung genetischer Verfahren und die Auswertung der Ergebnisse in der Praxis. Die Kenntnis klassischer Methoden zur Beschreibung und Klassifizierung, sowie autökologisches Wissen und die Erfahrung der Probenehmer bleibt auch mit fortschreitender Technisierung von höchster Bedeutung.

Neben den bisherigen Anforderungen an die Ermittlung des ökologischen Zustandes nach der Wasserrahmenrichtlinie gibt es eine Vielzahl an weiteren autökologischen und taxonomischen Fragestellungen, welche mithilfe molekularbiologischer Methoden geklärt werden können. Der Einsatz dieser Methoden kann dazu beitragen, alte Fragen zu beantworten und neue Themengebiete zu erforschen. Der integrative Ansatz ermöglicht es, das Forschungsfeld und den Wissensstand zu erweitern, den Fokus stärker auf ökologische Ermittlungen zu legen und eröffnet damit neue Chancen zur Bewertung unserer Umwelt.

# Literaturverzeichnis

- ADKINS, S. & BURMEISTER, M.: Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: Applications for preparative gels and educational demonstrations, *Analytical Biochemistry* 240(1996),1, S. 17-23
- ASTRIN, J.J.; STUEBEN, P.E.; MISOF, B.; WAEGELE, J.W.; GIMMICH, F.; RAUPACH, M.J. & AHRENS, D.: Exploring diversity in cryptorhynchine weevils (Coleoptera) using distance-, character- and tree-based species delineation, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63(2012), S. 1-14
- DE VERE, N.; RICH, T.C.G.; FORD, C.R.; TRINDER, S.A.; LONG, C., MOORE, C.W.; SATTERTHWAIT, S.; DAVIES, H.; ALLAINGUILLAUME, J.; RONCA, S.; TATARINOVA, T.; GARBETT, H.; WALKER, K.; WILKINSON, M.J.: DNA Barcoding the Native Flowering Plants and Conifers of Wales. *PLoS ONE* 7(2012),6: e37945
- DEINER, K. & ALTERMATT, F.: Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river, *PLoS ONE* 9(2014),2: e88786
- DEJEAN, T.; VALENTINI, A.; DUPARC, A.; PELLIER-CUIT, S.; POMPANON, F.; TABERLET, P.; MIAUD, C.: Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS ONE* 6(2011),8: e23398
- ELBRECHT, V., PEINERT, B. & LEESE, F.: Sorting things out - assessing effects of unequal specimen biomass on DNA metabarcoding. *Ecology and Evolution* 7(2017a),17, S. 6918-6926
- ELBRECHT, V., VAMOS, E.E., MEISSNER, K., AROVITA, J. & LEESE, F.: Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods in Ecology and Evolution* 8(2017b),10, S. 1265-1275
- ELBRECHT, V. & LEESE, F.: Can DNA-Based Ecosystem Assessments Quantify Species Abundance? Testing Primer Bias and Biomass - Sequence Relationships with an Innovative Metabarcoding Protocol. *PLoS ONE* 10(2015),7
- ELBRECHT, V. & LEESE, F.: PrimerMiner: an R package for development and in silico validation of DNA metabarcoding primers. *Methods in Ecology and Evolution* 8(2017a),5, S. 622-626
- ELBRECHT, V. & LEESE, F.: Validation and development of freshwater invertebrate metabarcoding COI primers for Environmental Impact Assessment. *Frontiers in Environmental Science* 5(2017b)
- FICETOLA, G. F.; MIAUD, C.; POMPANON F. & TABERLET P.: Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4(2008),4, S. 423-425
- HADI, S.I.I.A.; SANTANA, H.; BRUNALE, P.P.M.; GOMES, T.G.; OLIVEIRA, M.D.; MATTHIENSEN, A.; OLIVEIRA, M.E.C.; SILVA, F.C.P.; BRASIL, B.S.A.F.: DNA Barcoding Green Microalgae Isolated from Neotropical Inland Waters. *PLoS ONE* 11(2005),2: e0149284
- HAUSMANN, A.; HASZPRUNAR, G.; SEGERER, A. H.; SPEIDEL, W.; BEHOUNEK, G. & HEBERT, P. D. N.: Now DNAbarcoded: the butterflies and larger moths of Germany (Lepidoptera: Rhopalocera, Macroheterocera). *Spixiana* 34(2011),1, S. 47-58
- ITO, Y.; TANAKA, N.; RACHUN, P.; TANAKA, N.: DNA barcoding reveals a new record of *Potamogeton distinctus* (Potamogetonaceae) and its natural hybrids, *P. distinctus* x *P. nodosus* and *P. distinctus* x *P. wrightii* (*P. x malainoides*) from Myanmar. *Biodiversity Data Journal* 2(2014): e1073
- JI, Y., ASHTON, L., PEDLEY, S.M. et al.: Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology Letters* 16(2013),10, S. 1245-1257
- KELLY, MARTYN: E-Mail zu NGS Methoden in UK, 07.06.2017
- LEESE, F. & HERING, D.: Einsatzmöglichkeiten DNA-Basierter Methoden im Gewässermonitoring. Uni Duisburg-Essen, 42. EK Biologie FG, TOP 6, Metabarcoding, Minden am 01.03.2017

- LES, D. H.; GARVIN, D. K.; WIMPEE, C. F.: Phylogenetic Studies in the Monocot Subclass Alismatidae: Evidence for a Reappraisal of the Aquatic Order Najadales. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2(1993),4, S. 304-314
- LOHRMANN, V.; VOHLAND, K.; OHL, M.; HAEUSER, C.: Taxonomische Forschung in Deutschland - Eine Übersicht. Netzwerk-Forum zur Biodiversitätsforschung Deutschland (NeFo) 2012.
- MAUCH, E., SCHMEDTJE, U., MAETZE, A. & FISCHER, F.: Taxaliste der Gewässerorganismen Deutschlands zur Kodierung biologischer Befunde. Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft 2003, S. 1-367. Aktualisierte Internet-Liste mit Stand Sept 2011
- MEYER, C. & PAULAY, G.: DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology* 3(2005),12: e422
- MITTL, S.: Importance of sampling design using an eDNA monitoring approach for pond-living amphibians. Master thesis, Swedish University of Agriculture Science 2017
- MÜLHARDT, C.: Der Experimentator: Molekularbiologie/genomics. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 6(2009)
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. "Talking Glossary of Genetic Terms." National Human Genome Research Institute. Abgerufen am: 04.01.2018, auf: <https://www.genome.gov/glossary/>
- OFENBÖCK, T.; MOOG, O.; HARTMANN, A. & STUBAUER, I.: Leitfaden zur Erhebung der Biologischen Qualitätselemente, Teil A2 - Makrozoobenthos. Version: A2-01g\_MZB. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft 2010
- PADIAL, J. M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I. & VENCES, M.: The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7(2010),16, S. 1-14
- PFENNIGER, M. & SCHWENK, K.: Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* 7(2007),121
- PHILBRICK, C. T. & LES, D. H.: Phylogenetic studies in Callitriche: implications for interpretation of ecological, karyological and pollination system evolution. *Aquatic Botany* 68(2000), S. 123-141
- PRINTZEN, C.; SILVESTRO, D.; KAPPES, H.; JUNG, C.: Skript zum Praktikumsteil Molekulare Systematik. Master-Modul "Diversität und Evolution der Pflanzen". Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung 2014. Abgerufen am 08.02.2017 auf: [http://www.senckenberg.de/files/content/forschung/abteilung/botanik/univ\\_skript\\_molekulare\\_systematik\\_2-0-5\\_o-\\_losungen.pdf](http://www.senckenberg.de/files/content/forschung/abteilung/botanik/univ_skript_molekulare_systematik_2-0-5_o-_losungen.pdf)
- RAUPACH, M.J.; ASTRIN, J.J.; HANNIG, K.; PETERS, M.K.; STOECKLE, M.Y.; WÄGELE, J.W.: Molecular species identifications of Central European ground beetles (Coleoptera: Carabidae) using nuclear rDNA expansion segments and DNA barcodes. *Frontiers in Zoology* 7(2010),26
- RÜEGG, S., RAEDER, U., MELZER, A., HEUBL, G., BRÄUCHLER, C.: Einsatz molekularbiologischer Methoden für das Monitoring. Aktuelle Makrophytenentwicklung in deutschen Gewässern - Prognosen und Handlungsbedarf. Limnologische Station Iffeldorf, Lehrstuhl für Aquatische Systembiologie, Technische Universität München. Makrophytenworkshop 26.-28.04.2017
- SANGER, F., AIR, G. M., BARRELL, B. G., BROWN, N. L., COULSON, A. R., FIDDES, C. A., HUTCHISON, C. A., SLOCOMBE, P. M., SMITH, M.: Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265(1977), S. 687-695
- SCHMIDT, B.R. & URSENBACHER, S.: Umwelt-DNA als neue Methode zum Artnachweis in Gewässern. *Zeitschrift für Feldherpetologie* 22(2015),1, S. 1-10
- STEIN, E.D.; MARTINEZ, M.C.; STILES, S.; MILLER, P.E.; ZAKHAROV, E.V.: Is DNA barcoding actually cheaper and faster than traditional morphological methods: results from a survey of freshwater bioassessment efforts in the United States? *PLoS ONE* 9(2014),4: e95525

- STEINKE, D & BREDE, N.: DNA-Barcoding - Taxonomie des 21. Jahrhunderts? Manuskript für Biologie unserer Zeit 2006
- STOECKLE, B.C.; KUEHN, R. & GEIST, J.: 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(2016),6, S. 1120-1129
- SUKUMARAN, S. & GOPALAKRISHNAN, A.: Integrative taxonomy - Methods and Applications. Summer School on Recent Advances in Marine Biodiversity Conservation and Management; Central Marine Fisheries Research Institute 2015, Kochi-682018
- SUNNUCKS, P. & HALES, D.F.: Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution* 13(1996),3, S. 510-524
- THOMSEN, P.F.; KIELGAST, J.; IVERSEN, L. L.; MØLLER P. R.; RASMUSSEN, M.; WILLERSLEV, E.: Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PloS ONE*, 7(2012),8: e41732
- WÄGELE, J.W.; ASTRIN, J.J.; BALKE, M.; HAUSMANN, A.; KROGMANN, L.; HENDRICH, L.; PIETSCH, S.; RAUPACH, M.; SCHMIDT, S.; SEGERER, A.H. & HASZPRUNAR, G.: Taxonomie am Scheideweg? *Studia dipterologica* 18(2012), S. 105-117
- ZIMMERMANN, J.; GLÖCKNER, G.; JAHN, R.; ENKE, N. & GEMEINHOLZER, B.: Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. *Molecular Ecology Resources* 15(2015),3, S. 526-542
- ZIMMERMANN, JONAS: E-Mail Antwort Barcoding-Literatur, 12.05.2017

**Herausgeber:**

Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie (LfULG)  
Pillnitzer Platz 3, 01326 Dresden  
Telefon: +49 351 2612-0  
Telefax: +49 351 2612-1099  
E-Mail: lfulg@smul.sachsen.de  
www.smul.sachsen.de/lfulg

**Autoren und Redaktion:**

Matthias Greyer, Anne Rother, Robert Klung, Raphael Frieß  
Umweltanalytik und Naturschutzmonitoring/ Gewässerökologie  
Staatliche Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft  
Waldheimer Straße 219, 01683 Nossen  
Telefon: +49 352 42 632-5404  
Telefax: +49 352 42 632-5052  
E-Mail: matthias.greyer@smul.sachsen.de

**Titelbild**

<https://pixabay.com/de/dna-biologie-medizin-gen-163466/>

**Redaktionsschluss:**

16.08.2018

**ISSN:**

1867-2868

**Hinweis:**

Die Broschüre steht nicht als Printmedium zur Verfügung, kann aber als PDF-Datei unter <https://publikationen.sachsen.de/bdb/artikel/31657> heruntergeladen werden.

**Verteilerhinweis**

Diese Informationsschrift wird von der Sächsischen Staatsregierung im Rahmen ihrer verfassungsmäßigen Verpflichtung zur Information der Öffentlichkeit herausgegeben.

Sie darf weder von Parteien noch von deren Kandidaten oder Helfern im Zeitraum von sechs Monaten vor einer Wahl zum Zwecke der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für alle Wahlen.

Missbräuchlich ist insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken oder Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist auch die Weitergabe an Dritte zur Verwendung bei der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die vorliegende Druckschrift nicht so verwendet werden, dass dies als Parteinahme des Herausgebers zu Gunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte.

Diese Beschränkungen gelten unabhängig vom Vertriebsweg, also unabhängig davon, auf welchem Wege und in welcher Anzahl diese Informationsschrift dem Empfänger zugegangen ist. Erlaubt ist jedoch den Parteien, diese Informationsschrift zur Unterrichtung ihrer Mitglieder zu verwenden.

 **Täglich für  
ein gutes Leben.**