Projektbericht

Molekulare Methoden zur Erfassung der Biodiversität und zur ökologischen Bewertung von Bundeswasserstraßen sowie zur gezielten Erfassung von Neobiota und schwer auffindbaren Arten:

Algen, Fische, Makrozoobenthos

20.11.2024
BfG-2206



BfG Bundesanstalt für Gewässerkunde

Projektbericht

Molekulare Methoden zur Erfassung der Biodiversität und zur ökologischen Bewertung von Bundeswasserstraßen sowie zur gezielten Erfassung von Neobiota und schwer auffindbaren Arten:

Phytoplankton, Phytobenthos, Fische und Makrozoobenthos

Akronym / Kurztitel	BIO-eDNA / Molekulare Taxonomie: Algen, Fische, Makrozoobenthos
Autoren /-innen	Saskia Schmidt[2], Demetrio Mora[1], Julia Kleinteich[1], Joana Thiel[1], Franziska Klotz[1], Franz Schöll[2], Helmut Fischer[1], Sascha Krenek[1] **Bundesanstalt für Gewässerkunde** *[1]Referat U2 – Mikrobielle Ökologie* *[2]Referat U4 – Tierökologie*
Themenschwerpunkt	Ökosysteme und Biodiversität
Forschungsart	Angewandte Forschung
Mittelgeber	Bundesministerium für Digitales und Verkehr Invalidenstraße 44 10115 Berlin E-Mail poststelle@bmdv.bund.de Diese Arbeit wurde durch die vom BMBF geförderte de.NBI-Cloud im Rahmen des Deutschen Netzwerks für Bioinformatik-Infrastruktur (de.NBI) unterstützt.
Projekt-Laufzeit	09/2020–08/2023
Projekt-Nummer	M39630204048

BfG-Berichtsnummer BfG-2206

DOI **10.5675/BfG-2206**

Impressum

Herausgeber

Bundesanstalt für Gewässerkunde
Am Mainzer Tor 1
56068 Koblenz

Telefon +49 261 1306-0
Telefax +49 261 1306-5302

E-Mail posteingang@bafg.de
Internet www.bafg.de

Ansprechperson

Dr. Sascha Krenek
krenek@bafg.de
0261/1306-5331

Weitere Beteiligte

Esther Behring[2], Phillip Jung[1], Claudia Günster[1], Sebastian Flues[2]
Bundesanstalt für Gewässerkunde Koblenz,
[1]Referat U2 – Mikrobielle Ökologie
[2]Referat U4 – Tierökologie

Zitiervorschlag

SCHMIDT, S.; MORA, D.; KLEINTEICH, J.; THIEL, J.; KLOTZ, F.; SCHÖLL, F.; FISCHER, H.; KRENEK, S. (2024): Molekulare Methoden zur Erfassung der Biodiversität und zur ökologischen Bewertung von Bundeswasserstraßen sowie zur gezielten Erfassung von Neobiota und schwer auffindbaren Arten: Phytoplankton, Phytobenthos, Fische und Makrozoobenthos. Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz. BfG-Berichtsnummer 2206. DOI: 10.5675/BfG-2206.

Bildnachweis Titelseite Sascha Krenek

Inhaltsverzeichnis

Impressum **4**

Inhaltsverzeichnis **5**

Zusammenfassung / Summary **7**

Kurzfassung deutsch 7

Langfassung deutsch 8

Executive summary 11

Full summary 12

1 Einleitung **15**

2 Veranlassung und Forschungsbedarf **16**

3 Methodik **19**

4 Projektergebnisse **20**

4.1 Konservierungsmethoden benthische Diatomeen 20

4.2 Erarbeitung von Probenahmeleitfäden 20

4.3 Etablierung von Standardroutinen für die molekularbiologische Erfassung der BQEs Phytoplankton / benthische Diatomeen an Mosel, Lahn und Rhein und Vergleich mit herkömmlichen morphotaxonomischen Methoden 21

4.3.1 Hintergrund/Ziel und Zweck 21

4.3.2 Methodisches Vorgehen 21

4.3.3 Auswertung der benthischen Diatomeen in Mosel und Lahn 26

4.3.4 Auswertung des Phytoplanktons in Mosel, Rhein und Lahn 33

4.4 Etablierung eines Protokolls zur Identifizierung und Quantifizierung von *Prymnesium parvum* in der Oder und anderen Bundeswasserstraßen 40

4.5 Untersuchungen des Phytoplanktons im Rahmen des BBD-Modellprojekts „Ufer- und Auenrenaturierung Monsterloch“ 40

4.5.1 Hintergrund/Ziel und Zweck 40

4.5.2 Methodisches Vorgehen 41

4.5.3 Datenanalyse 43

4.5.4 Auswertung 44

4.5.5 Genetische Auswertung 45

4.5.6 Vergleich Morphologie vs. Genetische Analyse 48

4.5.7 Fazit 50

4.6 Methodenvergleich morphologischer und genetischer Artbestimmung von Makrozoobenthosproben des Rheins zwischen Basel und Brohl, Juli/August 2020 52

4.7 Methodenvergleich morphologischer und genetischer Artbestimmung von Makrozoobenthosproben der Elbe von Schmilka bis nach Hamburg, Mai 2021 52

4.7.1 Hintergrund/Ziel und Zweck 52

4.7.2 Methodisches Vorgehen 53

4.7.3 Die Bewertung des ökologischen Zustandes gemäß Wasserrahmenrichtlinie 61
4.7.4 Fazit 63

4.8 Untersuchung zur Festlegung der optimalen Porengröße von Filtern für die Anwendung in eDNA Metabarcoding Studien an den Bundeswasserstraßen 64

4.8.1 Hintergrund & Zweck der Forschung 64
4.8.2 Untersuchungsgebiet und Probenahme 65
4.8.3 Auswertung und weiterführende Analysen 66

4.9 Weitere Forschungsfragen im Themenbereich Makrozoobenthos und Fische 68

4.9.1 Vergleich eDNA Metabarcoding und morphologisches Monitoring am Mittelrhein 2022 68
4.9.2 Neobiota-Verbreitung Lahn & Nahe 2022 70
4.9.3 Genetische Untersuchungen am Hafen Duisburg und Hafen Frankfurt am Main: Häfen als Eintragspforte von Neobiota und Nutzung genetischer Untersuchungen zur Früherkennung 2021 & 2023 72

5 Schlussfolgerungen 76

5.1 Deutsch 76

5.2 Englisch 77

Abbildungsverzeichnis 78

Tabellenverzeichnis 81

Literaturverzeichnis 82

Zusammenfassung / Summary

Kurzfassung deutsch

Ziel des Projektes war der Aufbau molekularbiologisch-taxonomischer Kompetenz in der Abteilung U. Am Beispiel des Phytoplanktons, des Phytobenthos, des Makrozoobenthos (MZB) und der Fische sollte der aktuelle Forschungsstand molekularbiologischer Bestimmungsmethoden dargestellt, Ergebnisse mit klassischer Taxonomie verglichen und die Methodik auf seine Anwendbarkeit hinsichtlich der Ermittlung der Biodiversität und der ökologischen Bewertung von Bundeswasserstraßen getestet werden. Ziel war es auch, Empfehlungen zu Probenahme und genetischer Charakterisierung zu formulieren. Die BfG führte dieses Projekt bundesweit an den Bundeswasserstraßen durch.

Im Projekt wurde der Aufbau eines voll ausgestatteten molekularbiologischen Labors unterstützt und abgeschlossen. Es stehen nun zwei Laborräume mit der benötigten Infrastruktur für molekularbiologische Arbeiten von der DNA Extraktion bis zur Sequenzierung / Datengenerierung für die BfG zur Verfügung. Das Laborpersonal wurde in Arbeitsroutinen mit einbezogen und setzt diese nun selbstständig um. Im Projekt wurden außerdem Protokolle und Handlungsanweisungen für die Probenahme und molekularbiologische Aufarbeitung für die vier biologischen Qualitätselemente (BQE) Phytoplankton und -benthos, Makrozoobenthos (MZB) und Fische erarbeitet. Konkret wurde festgestellt, dass die herkömmliche Fixierung von Phytobenthos in Ethanol für die genetische Analyse weniger gut geeignet ist. Ferner wurden DNA Extraktionsmethoden getestet und ein Primerset für die Amplikonsequenzierung des 16S rRNA Gens, des 18S rRNA Gens und des *rbc*L Gens etabliert. Ein umfassender Vergleich von molekularbiologischen mit morphotaxonomischen Methoden des Phytoplanktons und Phytobenthos konnte im Projekt wegen technischer Schwierigkeiten beim Dienstleister, sowie verfrühtem Weggang des Projektpersonals nicht vollständig abgeschlossen werden. Die Daten sollen aber in anderen Projekten weitergenutzt werden.

Für das Makrozoobenthos konnte ein Vergleich der molekularbiologischen und morphotaxonomischen Bestimmungsmethoden für die Gewässerbewertung der Bundeswasserstraßen Elbe und Rhein durchgeführt werden. Dabei zeigten sich sowohl eine höhere taxonomische Auflösung durch die molekularbiologischen Methoden, als auch eine ähnliche Bewertung des Gewässers durch beide Methoden. Probenahmestrategien anhand von Umwelt-DNA (eDNA) für verschiedene Fragestellungen, wie Biodiversitätsanalysen oder der Nachweis von nicht-einheimischen invasiven Arten, konnten erarbeitet und getestet werden. Ebenso wurde ein Primerset für die Amplikonsequenzierung des mitochondrialen Cytochrome-*c*-Oxidase I (COI) Gens für das Makrozoobenthos, sowie ein Primerset des 12S rRNA Gens zur Analyse der Fischlebensgemeinschaften etabliert.

Die aufgebaute Infrastruktur, der Kompetenzaufbau beim Labor- und wissenschaftlichen Personal, sowie die erarbeiteten Handlungsanweisungen und Arbeitsroutinen kommen u.a. im Zuge des WRRL-Monitorings 2024 der IKSR, sowie zur *Prymnesium*-Monitoringkampagne 2024 in Kooperation mit den Ländern bereits zur Anwendung. Zudem ist die BfG in Folge des Projektes an der Ausarbeitung von entsprechenden DIN-Normen beteiligt. Die intensive Bearbeitung des Themenkomplexes hat die BfG als einen Ansprechpartner für molekularbiologische Methoden für andere Behörden (Bund und Länder) etabliert. Wissenschaftlich wurden Kooperationen mit anderen aktiven Gruppen, wie der von Prof. Dr. Florian Leese an der Universität Duisburg-Essen, aufgebaut. Ferner wurden im Projekt Lücken wie unzureichend bestückte Datenbanken oder eine zu geringe taxonomische Auflösung mittels herkömmlicher Amplikon-Sequenzierung aufgezeigt, die in zukünftigen Projekten bearbeitet werden müssen, um das Ziel einer zuverlässigen und standardisierten Bewertung anhand von genetischen Methoden zu erreichen.

Langfassung deutsch

Die Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) ist im Rahmen des biologischen Monitorings der Bundeswasserstraßen aktiv und untersucht regelmäßig eine Vielzahl von Organismengruppen sowohl zur Bewertung des ökologischen Zustandes als auch zur Erfassung von Veränderungen der Biodiversität. In diesem Kontext erfährt der Einsatz von DNA-basierten Analyseverfahren eine zunehmende Relevanz, da sich diese Techniken in den vergangenen Jahren zu einer wertvollen Methode entwickelt haben, um die Identität von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen zeit- und kosteneffizient zu erfassen. Das Konzept des DNA-Barcodings ermöglicht dabei die taxonomische Erfassung von Arten anhand spezifischer DNA-Sequenzen. Mittels sogenanntem DNA-Metabarcoding ist es mittlerweile möglich, DNA-Moleküle unterschiedlicher Organismen in einer einzigen Probe taxonomisch zu bestimmen sowie mehrere Proben simultan mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung (Next Generation Sequencing) sowie spezifischer bioinformatischer Auswertungen der Daten zu analysieren. In Kombination mit der Analyse von Umwelt-DNA (eDNA, „environmental DNA“), welche von Organismen beispielsweise in Form von Hautschuppen, Ausscheidungen oder abgestorbenen Zellen freigesetzt wird, erlaubt diese nicht-invasive Technik ebenfalls die Erfassung der Artenvielfalt in einem Gewässer, ohne die Organismen direkt entnehmen zu müssen. Darüber hinaus ermöglicht sie die Identifizierung seltener oder schwer zu erfassender Arten sowie die frühzeitige Erkennung von Neobiota, was die Einleitung entsprechender Maßnahmen zur Eindämmung ermöglicht. Insgesamt können DNA-basierte Methoden somit einen erheblichen Beitrag dazu leisten, das Biodiversitätsmonitoring und die biologische Bewertung von Gewässern im Allgemeinen sowie von Bundeswasserstraßen im Speziellen effizienter, präziser und sensitiver zu gestalten.

Das Projekt verfolgte das Ziel, molekularbiologisch-taxonomische Kompetenz aufzubauen sowie molekularbiologische Verfahren in der Abteilung U der BfG zu etablieren. Neben der Anwendung und Weiterentwicklung der etablierten Methoden sollte die BfG in die Lage versetzt werden, als bundesweit beratende Ressortforschungseinrichtung u. a. sowohl bei der Standardisierung der Methodik als auch bei der Erarbeitung von Anwendungskonzepten im behördlichen Einsatz mitzuwirken. Im Rahmen des Projektes sollte zunächst der aktuelle Forschungsstand molekularbiologischer Bestimmungsmethoden am Beispiel der biologischen Qualitätselemente (BQE) Phytoplankton, Phytobenthos, Makrozoobenthos (MZB) und Fische dargestellt, Ergebnisse mit klassischer Taxonomie verglichen und die Methodik auf seine Anwendbarkeit hinsichtlich der Ermittlung der Biodiversität und der ökologischen Bewertung von Bundeswasserstraßen getestet werden. Ein weiteres Ziel des Projekts war die Formulierung von Empfehlungen zur Probenahme und genetischen Charakterisierung der ausgewählten BQEs. Die entsprechenden Untersuchungen im Rahmen dieses Projektes wurden bundesweit durchgeführt, wobei der Fokus auf den BWaStr Elbe, Rhein, Lahn und Mosel lag.

Im Rahmen des Projektes wurde zunächst die Laborkapazität für molekularbiologische Arbeiten in der Abteilung U aufgebaut. Zu diesem Zweck wurden zwei Laborräume mit der notwendigen Infrastruktur ausgestattet, um molekularbiologische Methoden von der DNA-Extraktion aus Umweltproben über PCR-basierte Verfahren bis hin zur kompletten Probenvorbereitung für externe Sequenzierdienstleistungen durchzuführen. Die beiden Laborräume werden dabei entweder unter Überdruck (Prä-PCR Labor) oder unter Unterdruck (Post-PCR Labor) betrieben, um den notwendigen Anforderungen für kontaminationsempfindliche Arbeiten beim Umgang mit eDNA gerecht zu werden. Im Zuge der Etablierung von Methoden und der Erarbeitung von Protokollen wurde das Laborpersonal in die Arbeitsroutinen eingewiesen und wendet diese nun selbständig an. Das Labor, die etablierten Methoden sowie die aufgebaute Kompetenz stehen nun der gesamten BfG zur Verfügung und werden bereits abteilungsübergreifend für Fragestellungen mit molekularbiologischem Bezug genutzt.

Die etablierten Methoden umfassen dabei sowohl Protokolle und Handlungsanweisungen für die Probenahme der vier im Fokus stehenden BQE sowie die molekularbiologische Aufarbeitung der

entsprechenden Probentypen für DNA-basierte Analysen. So wurde z.B. festgestellt, dass die konventionelle Fixierung von Phytobenthos in Ethanol zwar eine praktische Methode darstellt, für die genetische Analyse jedoch weniger gut geeignet ist, da die DNA-Ausbeute vergleichsweise gering ist (Mora et al. 2022, Anlage 1 oder Kapitel 4.1). Ebenso konnten eDNA Probenahmestrategien für verschiedene Fragestellungen, wie z.B. Biodiversitätsanalysen oder dem Nachweis von invasiven gebietsfremden Arten, entwickelt und erfolgreich getestet werden. Darüber hinaus wurden verschiedene, BQE- bzw. Probentyp-spezifische DNA-Extraktionsmethoden getestet und spezifische Primer-Sets für die Amplikon-Sequenzierung verschiedener genetischer Marker etabliert. Für das Phytoplankton und das Phytobenthos waren dies spezifische Markerregionen des 16S rRNA Gens, des 18S rRNA Gens und des *rbc*L Gens. Ebenso wurde für das Makrozoobenthos ein Primer-Set für das Cytochrom-*c*-Oxidase I (COI) Gen und für die Analyse der Fischartengemeinschaften ein Primer-Set für das 12S rRNA Gen auf Basis aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse etabliert und getestet.

Die erarbeiteten Probenahmemethoden und molekularbiologischen Laborverfahren wurden für die Beprobung und Untersuchung der vier o.g. BQE eingesetzt. Für das Makrozoobenthos wurde im Rahmen des Projektes z.B. ein Vergleich der molekularbiologischen und morphotaxonomischen Bestimmungsmethoden für die Gewässerbewertung der Bundeswasserstraßen Elbe und Rhein durchgeführt (siehe Kapitel 4.6 und 4.7). Dabei zeigte sich gesamt, aber auch über alle einzelnen Probestellen hinweg eine höhere taxonomische Auflösung durch die molekularbiologischen Methoden als durch die klassische Morphotaxonomie. Sowohl im Rhein als auch in der Elbe wurden über 150 Taxa und über 100 Arten identifiziert. Die über beide Methoden nachgewiesenen Taxa liegen zwischen 14% im Rhein und 15% in der Elbe. Bei beiden Fließgewässern kann diese geringe Überlappung der Taxalisten auf eine unvollständige morphotaxonomische Aufarbeitung der Proben zurückgeführt werden. Denn standardmäßig werden die Unterklasse der Wenigborster (Oligochaeta) und die Familie der Zuckmücken (Chironomidae) morphotaxonomisch nicht tiefer bestimmt. Dieses Problem umgeht die molekularbiologische Bestimmungsmethodik mit der Wahl des richtigen Primerpaares, dass diese taxonomischen Gruppen umfasst. Besonders relevant für die Integration der Methodik ins behördliche Monitoring ist die Nutzbarkeit der Ergebnisse für die Gewässerbewertung der Fließgewässer gemäß der EU-Wasserrahmenrichtlinie. Hierfür wurde die Bewertung über die genetischen Taxalisten mit der standardmäßig verwendeten morphotaxonomischen Taxaliste verglichen. Es konnten über beide Methoden ähnliche Bewertungsergebnisse beider Gewässer erzielt werden (siehe Kapitel 4.6 und 4.7). Dies zeigt und bestätigt, dass sich die genetische Art-Identifikation prinzipiell für die Gewässerbewertung der Bundeswasserstraßen eignet und als sinnvolle und vielversprechende Ergänzung zur traditionellen Morphotaxonomie im behördlichen Monitoring integriert und weiterentwickelt werden kann.

Für das Phytoplankton und -benthos wurden ebenfalls vergleichende Untersuchungen in den BWaStr Rhein, Mosel und Lahn durchgeführt. Aufgrund technischer Schwierigkeiten bei einem der Sequenzierdienstleister, die zu erheblichen Verzögerungen bei der Bereitstellung der DNA-Sequenzdaten führten, sowie des vorzeitigen Ausscheidens des Projektpersonals, konnte ein umfassender Vergleich der molekularbiologischen mit den morphotaxonomischen Bestimmungsmethoden im Projektverlauf nicht vollständig abgeschlossen werden. Bei den benthischen Diatomeen als auch beim Phytoplankton konnten >100 verschiedene Taxa identifiziert werden, allerdings war der Anteil nicht zu bestimmender Arten mit beiden Methoden sehr groß. Die Übereinstimmung der dominanten Taxa zwischen beiden Methoden erscheint nach erster Analyse gering. Für beide BQE kann somit geschlossen werden, dass die Taxalisten basierend auf morphologischer und genetischer taxonomischer Bestimmung für eine Bewertung noch nicht ausreichend vergleichbar sind. Dieser Unterschied kann unter anderem auf eine unterschiedliche taxonomische Nomenklatur zurückgeführt werden, wobei verschiedene Referenzbibliotheken oft auch aufgrund der raschen Entwicklung taxonomischer Namen unterschiedliche Nomenklaturen verwenden. Die Erstellung taxonomisch homogener Taxalisten für Morphologie- und Metabarcoding-basierende Datensätze stellt daher eine Herausforderung dar. Um eine bessere Vergleichbarkeit beider Methoden zu erreichen, sind einheitlichen taxonomischen Referenzdaten erforderlich. Zu empfehlen ist

der kuratierte Ausbau der Referenzdatenbanken spezifisch für Arten der Bundestaxaliste der Gewässerorganismen Deutschlands (BTL). Diese bilden die Grundlage dafür, um die in den BWaStr vorkommenden Phytoplankton- und -benthos-Arten mittels DNA-basierter Methoden taxonomisch bestimmen zu können. Auch Lücken- oder sogar fehlerhafte Referenzbibliotheken stellen für eine korrekte Klassifizierung und Interpretation der DNA-Sequenzdaten ein Problem dar, das nur durch die Erstellung kuratierter, qualitätsgesicherter und möglichst umfänglicher Referenzdatenbanken verbessert werden kann. Für die BQE „Makrozoobenthos“, „Fische“ und „benthische Diatomeen“ existieren auf nationaler Ebene bereits Bestrebungen, sogenannte „Gold-Standard“-Referenzbibliotheken zu erstellen. Dies erfolgt im Rahmen des Projekts „dbDNA“ durch die Gruppe um Prof. Leese an der Universität Duisburg-Essen, zu welcher im Zuge des Projekts „BIO-eDNA“ mehrere wissenschaftliche Kooperationen und Beiratstätigkeiten aufgebaut wurden. Auch im Hinblick auf das Phytoplankton inklusive planktischer Diatomeen besteht die Notwendigkeit, sich diesen Bestrebungen anzuschließen.

Neben den aufgezeigten Lücken in den Referenzdatenbanken wurde im Rahmen des Projekts zudem ersichtlich, dass die taxonomische Auflösung bis auf Gattungs- oder Artebene mittels herkömmlich genutzter Amplikon-Sequenzierung relativ kurzer genetischer Marker teilweise unzureichend ist. Die Verwendung alternativer bzw. mehrerer genetischer Marker sowie die Anwendung neuerer Sequenziermethoden, wie beispielsweise das sogenannte „Long-Read Sequencing”, könnten zukünftig zur Lösung dieser Problematik beitragen und sollte deshalb in zukünftigen Forschungsprojekten bearbeitet werden. In nachfolgenden Projekten wird dies bereits teilweise adressiert, um die DNA-basierten Methoden für den behördlichen Einsatz bei der Gewässerbewertung besser nutzbar zu machen und das Ziel einer zuverlässigen und standardisierten Bewertung anhand von genetischen Methoden zu erreichen.

Der generelle Aufbau der molekularbiologischen Infrastruktur und des methodischen Spektrums in der Abteilung U hat die BfG in die Lage versetzt, während der Oderkatastrophe 2022 schnell zur Ursachenaufklärung beizutragen. So konnte mit den etablierten molekularbiologischen Methoden die Art *Prymnesium parvum* zweifelsfrei genetisch identifiziert und bezüglich ihrer potentiellen Toxin-Produktion charakterisiert werden. Mittels DNA-Metabarcoding konnte zudem gezeigt werden, dass neben der Brackwasseralge *P. parvum* auch noch andere, ursprünglich marine oder Brackwasser-liebende Algen während der Algenblüte anwesend waren. Dies ist einerseits ein Hinweis auf die Salzbelastung als Teilursache der Algenblüte. Andererseits deutet es auch darauf hin, dass langfristig auch andere salzliebende invasive Arten langfristig ein Problem darstellen könnten. Neben dem wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn dieser Untersuchungen kann die etablierte Methodik für das Monitoring von *P. parvum* in der Oder bzw. anderen salzbelasteten Gewässern von Nutzen sein. So soll u.a. in Ergänzung zu einem aktuell an der BfG initiierten Forschungsprojekt (RAP) mit dem Fokus auf der Entwicklung schädlicher Algenblüten und in Zusammenarbeit mit den Ländern über die LAWA-AO der aktuelle Stand zur Verbreitung von *P. parvum* in Deutschland erarbeitet werden.

Der im Projekt angestrebte systematische Kompetenzaufbau und die intensive Bearbeitung des Themenkomplexes hat dazu geführt, dass die BfG durch andere Behörden und Akteure im Gewässermonitoring (BSH, BAW, UBA, Länder, IKSR) als Ansprechpartner für molekularbiologische Analysen in diesem Bereich wahrgenommen wird. Über das BMDV-Expertennetzwerk vernetzt sich die BfG mit weiteren Oberbehörden des Bundesministeriums für Digitales und Verkehr zur gemeinsamen Bearbeitung weiterer Projekte innerhalb des Themenkomplexes. Die im Projekt etablierten Methoden und Handlungsanweisungen finden somit nicht nur in Folgeprojekten Anwendung, sondern z.B. auch im Rahmen des WRRL-Monitorings 2024 der IKSR. Neben der Etablierung von wissenschaftlichen Kooperationen hat das Projekt ebenfalls dazu beigetragen, dass die BfG bei nationalen und internationalen Verfahren zur Standardisierung der Methodik und zukünftigen Anwendungen im behördlichen Umfeld sprachfähig ist und über die Arbeit in DIN/CEN Gremien (DIN AK "Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung" / CEN/TC 230/WG 28 „DNA and eDNA Methods“) aktiv mitwirkt.

Executive summary

The objective of the project was to build up and enhance the molecular-taxonomic expertise within the Department U of the BfG. Based on the biological quality elements (BQE) phytoplankton, phytobenthos, benthic macroinvertebrates and fish, the current state of research on molecular biological identification methods was to be reviewed and DNA-based project results to be compared with classical taxonomy, with a view on this method's general applicability for the determination of biodiversity and the ecological assessment of federal waterways. Furthermore, recommendations for sampling strategies and the genetic characterisation of the above mentioned BQE were to be formulated. The BfG carried out this project on several federal waterways throughout Germany.

The project supported and completed the construction of a fully equipped molecular biology laboratory. Two laboratory rooms with the necessary infrastructure for molecular biology work from DNA extraction to sequencing/data generation are now available at the BfG. The laboratory staff were involved early on in the established working routines and are now implementing them independently. In addition, the project developed protocols and instructions for sampling and molecular biological processing of samples from phytoplankton and -benthos, benthic macroinvertebrates and fish. Specifically, it was e.g. found that the conventional fixation of phytobenthos in ethanol is less suitable for genetic analysis. Furthermore, DNA extraction methods were tested, and a primer set for amplicon sequencing of the 16S rRNA gene, the 18S rRNA gene, and the *rbc*L gene was established for the BQE phytoplankton and -benthos. A comprehensive comparison of molecular biological with morphotaxonomic methods of these two BQEs could not be fully completed in the project due to technical difficulties with the sequencing service provider and the early leave of project staff. However, the data will continue to be utilised in other projects.

For the BQE „benthic macroinvertebrates", a comparison was conducted between molecular biological and morphotaxonomic identification methods for the purpose of the ecological assessment of the Elbe and Rhine federal waterways. This demonstrated that both methods yielded comparable results, with the molecular biological methods offering greater taxonomic resolution. Sampling strategies based on environmental DNA (eDNA) were developed and tested for the purpose of addressing various questions, including biodiversity analyses and the detection of non-native invasive species. A primer set for amplicon sequencing of the cytochrome *c* oxidase I (COI) gene for benthic macroinvertebrates, and a primer set for the 12S rRNA gene for analysing fish communities were also established and tested.

The infrastructure that has been set up, the expertise that has been built up among laboratory and scientific staff, and the work routines and instructions that have been developed are already being utilised e.g. in the context of the ICPR's 2024 WFD monitoring programme and the 2024 *Prymnesium parvum* monitoring campaign in collaboration with the federal states. Furthermore, the BfG is engaged in the development of corresponding DIN standards as a consequential result of the project. The extensive work on this topic has positioned the BfG as a partner for molecular biological methods for other authorities (federal and state). A scientific collaboration has been established with other active research groups, including that of Prof. Dr. Florian Leese at the University of Duisburg-Essen. Furthermore, the project identified shortcomings, such as the lack of comprehensive reference databases or inadequate taxonomic resolution using conventional amplicon sequencing. These must be addressed in future projects to achieve the goal of a reliable and standardised ecological assessment of the federal waterways using genetic methods.

Full summary

The Federal Institute of Hydrology (BfG) is engaged in the biological monitoring of the federal waterways and regularly monitors a multitude of organism groups with the objective of assessing the ecological status and recording changes in biodiversity. In this context, the utilisation of DNA-based analysis methods is becoming increasingly pertinent, as these techniques have evolved into a valuable method in recent years for determining the identity of animals, plants and microorganisms in a time- and cost-efficient manner. The concept of DNA barcoding enables the taxonomic identification of species by means of species-specific DNA sequences. Using so-called DNA metabarcoding, it is now possible to taxonomically determine DNA molecules of different organisms in a single sample and to analyse several samples simultaneously via high-throughput sequencing (next generation sequencing) and specific bioinformatic analyses. In conjunction with the analysis of environmental DNA (eDNA), which is released by organisms into their environment e.g. in the form of skin scales, excretions or deceased cells, this non-invasive methodology allows documenting the biodiversity within water bodies without the necessity of directly capturing the organisms. Furthermore, it enables the identification of rare or difficult-to-detect species, as well as the early detection of neobiota, which in turn allows for the implementation of suitable containment measures. In conclusion, DNA-based methods can be expected to make a significant contribution to the efficiency, precision and sensitivity of biodiversity monitoring and the ecological assessment of water bodies in general and federal waterways in particular.

The project's primary objectives were to increase the expertise in molecular taxonomy and to implement molecular biological methods within the methodological portfolio of the Department U of the BfG. In addition to the application and further development of the established methods, the BfG was to be positioned to act as a nationwide consultative research institution, contributing to both the standardisation of the methodology and the development of application concepts for use by other authorities. As part of the project, the current state of research on molecular biological identification methods was to be reviewed based on the biological quality elements (BQE) phytoplankton, phytobenthos, benthic macroinvertebrates and fish. Moreover, the results obtained through DNA-based analysis had to be compared with those derived from classical taxonomy, with a view on the general applicability of this method for the determination of biodiversity and the ecological assessment of federal waterways. Additionally, the project sought to propose recommendations regarding the sampling strategies and the genetic characterisation of the selected BQEs. The investigations conducted within the scope of this project were carried out on a nationwide basis, with a focus on the federal waterways Elbe, Rhine, Lahn and Moselle.

As part of the project, the laboratory capacity for molecular biology work in Department U was initially established. In order to achieve this objective, two laboratories were equipped with the required infrastructure to conduct molecular biological approaches, encompassing DNA extraction from environmental samples, PCR-based techniques, and the entire sample preparation required for external sequencing services. The two laboratories are operated either under positive pressure (pre-PCR laboratory) or under negative pressure (post-PCR laboratory) in order to fulfil the necessary requirements for contamination-sensitive work when handling eDNA. During the establishment of methods and the development of protocols, laboratory staff were already familiarised with the requisite work routines, and now apply them independently. The established laboratory procedures, methods and expertise are now available to the entire BfG and are used across departments for topics in molecular ecology and taxonomy.

The established methods include protocols and guidelines for the sampling of the four BQEs under consideration, as well as the molecular biological processing of the corresponding sample types for DNA-based analyses. For instance, it has been demonstrated that although the conventional fixation of phytobenthos in ethanol is a practical method, it is less suitable for genetic analysis due to the comparatively low DNA yield (Mora et al. 2022, Appendix 1 or Chapter 4.1). Similarly, eDNA sampling strategies for various research questions, such as biodiversity analyses or the detection of invasive alien species,

have been developed and successfully tested. In addition, a number of BQE- and sample type-specific DNA extraction methods were tested, and specific primer sets for the amplicon sequencing of various genetic markers were established. For phytoplankton and phytobenthos, these were specific marker regions of the 16S rRNA gene, the 18S rRNA gene and the *rbc*L gene. A primer set for the cytochrome *c* oxidase I (COI) gene was also established and tested for the benthic macroinvertebrates. Similarly, a primer set for the 12S rRNA gene was established and tested for the analysis of fish species communities on the basis of current scientific knowledge.

The established sampling methods and molecular biological laboratory procedures were used for the sampling and analysis of the four BQEs mentioned above. For benthic macroinvertebrates, the project conducted a comparison of molecular and morphotaxonomic methods for the assessment of the rivers Elbe and Rhine (see Chapters 4.6 and 4.7). The results revealed a more refined taxonomic resolution achieved through molecular biological techniques compared to that attained through the conventional morphotaxonomic approach, both in aggregate and across the entirety of the individual sampling sites. In both the Rhine and the Elbe, more than 150 taxa and more than 100 species were identified. The proportion of taxa identified by both methods ranges from 14% in the Rhine to 15% in the Elbe. In both rivers, this low overlap of taxa can be attributed to incomplete morphotaxonomic processing of the samples. This is because the subclasses of Oligochaeta and the family Chironomidae are not morphotaxonomically analysed in depth as a standard procedure. The molecular biological identification method avoids this problem by selecting the respective primer pair to cover these taxonomic groups.

The usability of the results for an ecological assessment of rivers in accordance with the EU Water Framework Directive is of particular relevance for integrating the aforementioned methodology into regulatory monitoring. In order to assess the viability of this methodology, a comparison was conducted between the assessment using the genetic taxa lists and the standard morphotaxonomic taxa lists. The assessment results were found to be similar for both rivers using both methodologies (see Chapters 4.6 and 4.7). This demonstrates the suitability of genetic species identification for the ecological assessment of federal waterways and indicates that it can be integrated and further developed as a valuable and promising supplement to traditional morphotaxonomy in regulatory monitoring.

Comparative analyses were also conducted for phytoplankton and -benthos in the rivers Rhine, Moselle and Lahn. Due to some technical difficulties at one of the sequencing service providers, which resulted in significant delays in the delivery of DNA sequence data, as well as the early leaving of project personnel, a comprehensive comparison of the molecular biological and morphotaxonomic identification methods could not be fully completed during the project. In the case of benthic diatoms and phytoplankton, over 100 different taxa were identified, although the proportion of species that could not be identified using either method was very high. The agreement of the dominant taxa between the two methods appears to be low after the initial analysis. Consequently, it can be concluded that the taxa lists are not yet sufficiently comparable for an assessment based on morphological and genetic taxonomic determination. The observed disparity can be attributed to several factors. Among these, differing taxonomic nomenclature represents a significant contributor, with reference libraries often utilising distinct nomenclatures due to the rapid evolution of taxonomic names. The creation of taxonomically homogeneous taxa lists for morphology- and metabarcoding-based datasets therefore represents a significant challenge. In order to achieve better comparability of both methods, it is necessary to have standardised taxonomic reference data. It is thus recommended that a curated expansion of reference databases, specifically for species of the Federal Taxa List of Aquatic Organisms of Germany (BTL), is undertaken. These reference databases form the basis for the DNA-based taxonomic identification of phytoplankton and -benthos species occurring in the federal waterways. Furthermore, the use of incomplete or erroneous reference libraries also presents a challenge for the accurate classification and interpretation of DNA sequence data. This issue can be addressed by the creation of curated, quality-assured reference databases that are as comprehensive as possible. With regard to the BQE ‘benthic macroinvertebrates’,

‘fish’ and ‘benthic diatoms’, efforts are already being made at the national level to create so-called ‘gold standard’ reference libraries. This is being conducted as part of the ‘dbDNA’ project by Prof. Leese's group at the University of Duisburg-Essen, with which several scientific collaborations and advisory board activities have been established as part of the ‘BIO-eDNA’ project. There is also a need to join these efforts with regard to phytoplankton, including planktonic diatoms.

In addition to the gaps identified in the reference databases, the project also revealed that the taxonomic resolution down to the genus or species level using conventional amplicon sequencing of relatively short genetic markers is insufficient in some cases. The use of alternative or multiple genetic markers and the application of newer DNA sequencing methods, such as so-called 'long-read sequencing', may offer a solution to this problem in the future and therefore should be addressed in future research projects. This issue is already being partially addressed in subsequent projects with the aim of making DNA-based methods more usable for regulatory water assessments and in order to achieve reliable and standardised ecological assessments using genetic methods.

The general establishment of the molecular biological infrastructure and the methodological spectrum in Department U enabled the BfG to rapidly contribute to the clarification of the causes during the Oder disaster in 2022. Using the established molecular biological methods, the species *Prymnesium parvum* was identified genetically with certainty and characterised with regard to its potential toxin production. Additionally, DNA metabarcoding was employed to demonstrate that, in addition to the brackish water algae *P. parvum*, other originally marine or brackish algae were also present during the algal bloom. This suggests that salt pollution is a contributing factor in the algal bloom. However, it also implies the potential for other halophilic invasive species to become a long-term concern. The scientific knowledge gained from these investigations can be applied to monitor *P. parvum* in the Oder and other salt-polluted waters. For example, in conjunction with a research project currently underway at the BfG (RAP), which is focusing on the development of harmful algal blooms, and in cooperation with the federal states via the LAWA-AO, the current status of the distribution of *P. parvum* in Germany will be assessed.
The project's systematic capacity building of expertise and its intense focus on the subject contributed to the BfG's recognition by other authorities and stakeholders in river monitoring (BSH, BAW, UBA, federal states, ICPR, etc.) as a point of contact regarding molecular biological analyses in this field. The methods and guidelines established in the project are not only employed in subsequent projects but also, for instance, as part of the ICPR's WFD Monitoring 2024. In addition to the establishment of scientific cooperation, the project has also contributed to the BfG's ability to contribute to national and international procedures for the standardisation of the methodology and future applications in the official environment. Furthermore, it has enabled the BfG to actively participate in DIN/CEN committees, including DIN WG ‘Biological-ecological water analysis’ / CEN/TC 230/WG 28 ‘DNA and eDNA Methods’.

1 Einleitung

Die Analyse von Umwelt-DNA (eDNA) ist ein relativ neues Verfahren zur taxonomischen Analyse von Lebensgemeinschaften. Der exponentielle Anstieg von fachbezogenen Publikationen aus Universtäten und Forschungseinrichtungen auf diesem Gebiet unterstreicht die Aktualität und Bedeutung dieses Themas. International wird die Methode bereits seit 2017 in die Gewässerbewertung eingeführt. Die BfG betreibt in vielfältiger Hinsicht biologisches Monitoring oder die projektbezogene Erfassung verschiedenster Tier- und Pflanzengruppen. Die Einführung DNA-basierter Methoden zur Arterfassung im Rahmen des Projektes „BIO-eDNA“ war daher für die BfG von großer Bedeutung, um auf dem neuesten Stand des Wissens zu bleiben und zukünftige Entwicklungen aktiv zu begleiten.

In der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) und in den Flussgebietskommissionen wird die Anwendung solcher Verfahren derzeit intensiv diskutiert, insbesondere für die biologischen Indikatoren Makrozoobenthos und Fische (z.B. LAWA Expertenkreis Fließgewässer, Sitzungsprotokoll vom 01.-02.03.2017; IKSR Arbeitsgruppe BMON, Sitzung mit Schwerpunktthema eDNA am 06.12.2017; ICPDR Arbeitsgruppe MA, Minutes vom 05.-06.10.2017; TrendDNA, 1. NutzerInnenbeiratstreffen am 10.02.2022; GeDNA Abschlusstreffen vom 09.-10.10.2023). Auf EU-Ebene hat die Standardisierung zur Probenahme, Erfassung und Konservierung von eDNA in aquatischen Habitaten bereits begonnen (EN 17805:2023) und nächste Standardisierungsschritte werden folgen. Einzelne Länder haben bereits Guidelines zur Anwendung der Methodik veröffentlicht (Hobbs et al. 2017; Pawlowski et al. 2020) und auch auf internationaler Ebene gibt es Bestrebungen zur Standardisierung der eDNA Methodik für Biodiversitätserhebungen (ISO/TC 147/SC 5/WG 13 „eDNA, DNA and RNA methods“, iESTF - international eDNA standardization Taskforce). In einzelnen Bundesländern gab bzw. gibt es für verschiedene biologische Qualitätselemente (BQE) bereits Pilotprojekte zur Anwendung molekularbiologischer Methoden im behördlichen Umfeld (Dröscher et al. 2022; Greyer et al. 2018; Mischke et al. 2022).

Vor dem geschilderten Hintergrund und der Tatsache, dass sich taxonomische Anforderungen und Methodiken rapide verändern, diente dieses Projekt dem Aufbau molekularbiologisch-taxonomischer Kompetenz in der Abteilung U. Hierfür verfolgte das Projekt folgende Ziele:

- Aufbau der Laborkapazität für (e)DNA-basierte Analyseverfahren
- Erarbeitung und Etablierung von an die BWaStr angepassten Probenahmekonzepten für die biologischen BQE Phytoplankton, Phytobenthos, Makrozoobenthos und Fische
- Entwicklung und Anwendung (e)DNA-basierter Analyseverfahren zur Erfassung der vier o.g. BQE sowie zur Detektion von Neobiota und seltenen heimischen Arten
- Vergleich der morphologischen und molekularen Artidentifikation für Biodiversitäts-Erhebungen sowie Beurteilung der Anwendbarkeit (e)DNA-basierter Verfahren für Bewertungsverfahren gemäß EU-Wasserrahmenrichtlinie (WRRL)

2 Veranlassung und Forschungsbedarf

Die Durchführung biologischer Bewertungsverfahren an Bundeswasserstraßen ist mit hohen Kosten verbunden und erfordert eine hohe taxonomische Kompetenz. Da diese taxonomische Kompetenz zunehmend verloren geht, empfiehlt der Deutsche Bundestag, „die Biodiversität und die taxonomische Forschung mit einem Bündel von Maßnahmen zu fördern“. Hierzu gehört unter anderem, „Strukturen zu unterstützen und gegebenenfalls aufzubauen, die den wissenschaftlichen Nachwuchs im Bereich der Taxonomie unter Berücksichtigung des durch den Einzug molekularbiologischer Methoden gewandelten Anforderungsprofils unterstützen und fördern“ (Bundestag 2017). Parallel zur beobachteten Abnahme taxonomischer Kompetenz werden derzeit molekularbiologische Verfahren entwickelt, die in vielen Bereichen anwendbar sind und klassische taxonomische Verfahren sinnvoll ergänzen, in Teilbereichen zukünftig sogar ersetzen können (Blancher et al. 2022; Leese et al. 2023).

Es ist für die BfG als bundesweit beratende Ressortforschungseinrichtung wichtig, diese Verfahren kompetent vertreten und bewerten zu können. Mit der Weiterentwicklung des molekularbiologischen Methodenkomplexes und dessen Etablierung im behördlichen Monitoring rückt dessen Standardisierung für vergleichbare Monitoring-Ergebnisse in den Vordergrund. Daher ist es unumgänglich, dass die BfG sprachfähig ist und bleibt, um diese Prozesse begleiten zu können.

Die aktuell in der Biodiversitätsforschung zur Diskussion stehenden molekularbiologischen Verfahren sind:

- DNA-Barcoding: Gewebeproben bzw. DNA-Proben von einzelnen Organismen werden genutzt, um mit universellen Primern (ein kurzes, einzelsträngiges DNA-Molekül) spezifische DNA-Sequenzen eines Markergens zu amplifizieren (vervielfältigen) und anschließend zu sequenzieren. Anhand der einzigartigen DNA-Sequenz kann die betreffende Art exakt bestimmt werden. Die Methodik ist sowohl für Reinkulturen von Mikroorganismen (also auch von Algen) als auch für Makroorganismen nutzbar und kann die klassische Taxonomie unterstützen. Mit dieser Form des Einzelartnachweises können durch Kopplung mit weiteren molekularbiologischen Methoden wie quantitative real-time PCR (qPCR) oder Droplet-Digital PCR (ddPCR) auch quantitative Informationen zum Artvorkommen gewonnen werden.
- eDNA-Barcoding: Eine Umweltprobe (Wasser, Boden, Luft) inklusive der darin vorhandenen zellulär gebundenen oder auch freien DNA (eDNA = environmental DNA, Umwelt-DNA) wird mit einem spezifischen Primer für die gesuchte Art oder Artengruppe amplifiziert und ggf. sequenziert. Durch anschließenden Vergleich mit einer Referenz kann das Vorkommen der betreffenden Art bestätigt oder ausgeschlossen werden. Durch Kopplung mit quantitativen molekularbiologischen Methoden (qPCR, ddPCR) können ebenfalls quantitative Informationen zum Artvorkommen gewonnen werden.
- DNA-Metabarcoding: Das Metabarcoding leistet den entscheidenden zusätzlichen Schritt in der Analyse von gesamten Lebensgemeinschaften durch Verwendung von Gewebeproben bzw. DNA-Proben von mehreren Organismen. Dabei kann es sich um Mischproben unterschiedlicher Artengruppen handeln, bspw. Fluginsekten aus Malaise-Fallen oder Makrozoobenthos-Proben. Die DNA wird mit degenerierten Primersets für bestimmte Organismengruppen amplifiziert und mit Hochdurchsatzsequenzierung analysiert. Der entstandene Datensatz an Sequenzen wird mit Datenbanken bekannter Sequenzen der jeweiligen taxonomischen Gruppen abgeglichen und so die in der Probe vorhandenen Taxa identifiziert. Über diese Methode lässt sich das Arteninventar der gesamten Probe qualitativ erheben.
- eDNA-Metabarcoding: Die Gesamt-DNA einer Umweltprobe wird entsprechend wie beim o.g. DNA-Metabarcoding mit gruppenspezifischen Primern (je nach Ziel z.B. Diatomeen, Fische etc.)

amplifiziert und im Anschluss mittels Hochdurchsatzsequenzierung analysiert. Das eDNA-Metabarcoding eröffnet somit die Möglichkeit, die Lebensgemeinschaften aus einer Wasser-, Sediment- oder Biofilmprobe mittels nicht-invasiver Probenahme zu charakterisieren und detailliert zu bestimmen.

Die Anwendung von eDNA-Metabarcoding in Fließgewässern ist vielseitig. Neben der Bestimmung von Artengruppen kann das Verfahren auch zur Analyse ökologischer Fragestellungen, beispielsweise zur Untersuchung der Auswirkungen von Eutrophierungen, eingesetzt werden (Craine et al. 2017). Die Indikatoren Phytoplankton/Phytobenthos eignen sich grundsätzlich für dieses Verfahren (Zimmermann et al. 2015) und führende Arbeitsgruppen auf dem Gebiet empfehlen den Einsatz molekularbiologischer Methoden beim Algen-Monitoring und der Bewertung, da sie die klassische Taxonomie in vielen Bereichen übertreffen und diese sinnvoll ergänzen (Pawlowski et al. 2018; Visco et al. 2015). In Deutschland wird derzeit eine Strategie zur Einbindung molekularer Methoden in die Erfassung aller Biokomponenten nach WRRL entwickelt (Blancher et al. 2022).

Auch bei der Beurteilung der Umweltverträglichkeit von Wasserbauprojekten könnten aufwändige Erhebungs- und Bestimmungsarbeiten, wie z. B. bezüglich des Makrozoobenthos und der Fische, in Zukunft durch die Anwendung des eDNA-Metabarcoding erheblich erleichtert werden.

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die gezielte Erfassung gebietsfremder Arten (Neobiota) sowie seltener Taxa, die naturschutzfachlich von Bedeutung sind. In der Schweiz wird eDNA bei der frühzeitigen Erkennung von aquatischen gebietsfremden Arten erfolgreich eingesetzt. So konnte die Quagga-Muschel (*Dreissena rostriformis bugensis*) im Rhein bei Basel nachgewiesen werden, bevor sie mit klassischen Methoden gefunden wurde (Ventura et al. 2017). Ebenso konnte die Verbreitung invasiver Grundeln im Hochrhein dargestellt werden (Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm 2016). Auch wurden neue Arten identifiziert (z. B. *Gammarus alpinus*), die ohne DNA-Barcoding wahrscheinlich nicht erkannt worden wären (Alther et al. 2017). Die Identifizierung von Arten des Makrozoobenthos mithilfe der eDNA-Analyse ist vielversprechend und auch die Identifizierung von Neobiota mit eDNA zeigt Potential. Die hohe Sensitivität von molekularbiologischen Methoden ermöglicht es, neben Neobiota, auch potentiell pathogene Organismen oder schädlichen Algenblüten in Gewässern frühzeitig zu erkennen. So können z. B. über quantitative PCR Methoden wir qPCR oder ddPCR spezifische Organismen(-Gruppen) schon in kleinsten Mengen in Umweltproben nachgewiesen werden (Feist & Lance 2021; Pearson et al. 2021) und entsprechende Maßnahmen getroffen werden.

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Artdiagnose schwieriger Taxa. Insbesondere die bewertungsrelevanten Diatomeen (Bacillariophyceae) sind mit klassischen Methoden nur sehr schwer und aufwendig zu bestimmen. Molekularbiologische Methoden können hier die klassischen taxonomischen Auswertungen absichern sowie erheblich vertiefen und verbessern.

Es gibt allerdings noch zahlreiche offene Fragen. Limitierend für den Bestimmungserfolg ist insbesondere der Umfang der existierenden DNA-Sequenz-Datenbanken. Dabei unterscheidet sich die Datenbankabdeckung je nach Taxon und Artengruppe von 15% für Kieselalgen, über 20% für Süßwasseralgen bis zu 65% für MZB und ca. 90% für Fische (Schulte et al. 2024; Vasselon et al. 2017; Weigand et al. 2019) je nach Art des verwendeten Markers und der Sequenzregion (Salmaso et al. 2022). Nur Taxa, die in den Datenbanken repräsentiert sind, können durch einen Abgleich mit der jeweiligen Umweltprobe bestimmt werden; gleichzeitig decken aber molekularbiologische Methoden einen hohen Anteil von Fehlbestimmungen bei den klassischen Methoden auf (Vasselon et al. 2017).

Eine weitere Herausforderung der molekularbiologischen Methodik ist, dass aus dem molekularbiologischen Nachweis nicht direkt auf die Abundanz der Taxa geschlossen werden kann. Die Ermittlung der Abundanzen ist derzeit jedoch für alle biologischen Qualitätskomponenten zur Bestimmung des ökologischen Zustandes nach WRRL erforderlich. Hierfür gibt es verschiedene Lösungsansätze, z. B. besteht eine Beziehung zwischen der Menge der DNA und der Biomasse bzw. Abundanz bei Fischarten (Doi et al. 2017; Stoeckle et al. 2017). Alternativ zur Angabe der Abundanz kann auch die Präsenz/Absenz der

jeweiligen Art angegeben werden. Diese führt beispielsweise beim Makrozoobenthos zu vergleichbaren Bewertungsergebnissen und kann mittels eDNA ermittelt werden.

Die molekulare Taxonomie stellt ein Forschungs- und Anwendungsfeld dar, dem sich die BfG auf lange Sicht nicht verschließen kann, da sie die klassische Taxonomie in idealer Weise ergänzt und somit die Analysen zuverlässiger macht. Diesbezüglich sei auf die oben zitierten Referenzen sowie auf die Arbeit von Pawlowski et al. (2016) verwiesen. Eine anwendungsfreundliche Standardisierung der Methodik, die es den Landesämtern und Kommunen ermöglicht diese Methoden in ihr Monitoring zu integrieren, wird dringend benötigt und kann mit der aufgebauten Kompetenz in der BfG mitgestaltet werden.

3 Methodik

Die Methodenentwicklung war Kernziel dieses Projektes, daher werden diese hier nur grob umrissen und sind im Detail in Kapitel 4 bzw. in den Anlagen zu finden.

Im Wesentlichen wurde wie folgt vorgegangen:

- Recherche zu
    - Metabarcoding von Protisten- und Makrozoobenthosgemeinschaften sowie eDNA-Analyse von Fisch-Lebensgemeinschaften und ihre Anwendung in der gewässerökologischen Praxis.
    - verfügbaren Primern für die verschiedenen BQE (z. B. spezifische Primer für die zu untersuchenden Algengruppen, bspw. für Diatomeen *rbc*L oder 18S-rRNA Gen Primer).
    - Umfang und Nutzbarkeit verfügbarer Datenbanken.
- Aufbau molekularbiologischer Grundlagenmethoden in der Abteilung U (BfG):
    - Zu Projektbeginn wurden molekularbiologische Labore (pre- und post-PCR Labor) in der Abteilung U, verwaltet durch U2, aufgebaut. Diese beinhalten alle notwendigen Gerätschaften von der DNA-Extraktion über die DNA-Amplifikation bis hin zur Visualisierung. Die Labore sind so aufgebaut, dass sie auch für die kontaminationsanfälligen Aufarbeitungsschritte von Umwelt-DNA genutzt werden können.
    - Methodik Probenkonservierung und DNA Extraktion: Zur Probenkonservierung wurden Versuche mit unterschiedlichen Konservierungsmitteln (z.B. Ethanol) bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die DNA Extraktion für verschiedene BQE und Probentypen wurde mit DNA-Extraktionskits unterschiedlicher Hersteller evaluiert.
    - DNA-Amplifikation: Verschiedene Protokolle und Primer wurden zur Untersuchung von Makozoobenthos (COI), Fischen (12S-rRNA), Phytoplankton/-benthos (18S-rRNA, *rbc*L) und Bakterioplankton (16S-rRNA) etabliert.
    - Zur Hochdurchsatzsequenzierung von Gen-Amplikons wurde ein Rahmenvertrag mit einem Auftragnehmer geschlossen.

4 Projektergebnisse

4.1 Konservierungsmethoden benthische Diatomeen

Für das BQE der benthischen Diatomeen wurde die Eignung verschiedener Konservierungsmethoden für die spätere molekularbiologische Analyse getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die klassische Methode, die Proben in Ethanol zu fixieren, für die DNA Analytik weniger gut geeignet ist. Diese Daten wurden als Conference Paper veröffentlicht. Diese ist als Anlage dem Bericht beigefügt.

Anlage 1: Mora, D; Kleinteich, J; Zimmermann, J; Fischer, H; Krenek, S (2022): Influence of preservation methods for phytobenthos samples on the detection of microbial communities through eDNA metabarcoding – first results. Deutsche Gesellschaft für Limnologie – Ergebnisse der Jahrestagung 2021.

4.2 Erarbeitung von Probenahmeleitfäden

Zum besseren Verständnis für die ausführenden Anwender aus Praxis und Behörden sowie als Ergänzung zu den Probenahmeleitfäden, die von der Universität Duisburg Essen zur genetischen Probenahme von Phytobenthos und Makrozoobenthos entwickelt wurden, sind in diesem Projekt Probenahmeleitfäden für die genetische Beprobung von Phytoplankton, Zooplankton und für die eDNA-Probenahme mittels selbstkonservierender Filter erstellt wurden.

Anlage 2: Leitfaden Phytoplankton-Probenahme

Anlage 3: Leitfaden Zooplankton-Probenahme

Anlage 4: Leitfaden eDNA-Probenahme mit selbstkonservierenden Filtern

4.3 Etablierung von Standardroutinen für die molekularbiologische Erfassung der BQEs Phytoplankton / benthische Diatomeen an Mosel, Lahn und Rhein und Vergleich mit herkömmlichen morphotaxonomischen Methoden

4.3.1 Hintergrund/Ziel und Zweck

Ziel dieses Projektabschnittes war die Etablierung von Protokollen zur genetischen Erfassung der biologischen Qualitätskomponenten Phytoplankton und Phytobenthos (benthische Diatomeen) von der Probenahme über die DNA-Extraktion bis hin zu Sequenzierprotokollen. Ziel war es auch, die genetische Bestimmung mit der klassischen morphologischen Bestimmung durch mikroskopische Auswertung zu vergleichen. Dies sollte an Proben aus Mosel und Lahn erfolgen, um die Artengemeinschaften in diesen Gewässern auch vor dem Hintergrund der Cyanobakterienproblematik in der Mosel besser zu verstehen.

4.3.2 Methodisches Vorgehen

4.3.2.1 Untersuchungsgebiet und Probenahme

Messstationen Mosel und Rhein in Koblenz

An der Mosel (Flusskilometer 6) sowie am Rhein (Flusskilometer 590,3) bei Koblenz werden vom Referat U2 / BfG routinemäßig wöchentliche Beprobungen vorgenommen. Diese Messreihe geht zurück bis in die 1990er Jahre. Zusätzlich wurden an der Lahn bei Lahnstein in den Jahren 2021-2023 im 2-wöchentlichen Turnus zwischen März und Oktober Wasserproben entnommen.
Für das vorliegende Projekt wurden die Probenahmen aus dem Jahr 2021 an allen drei Standorten herangezogen. An allen Probestellen wurden sowohl physikalische Parameter wie Wassertemperatur oder Leitfähigkeit, chemische Parameter wie Nährstoffkonzentration, als auch biologische Parameter wie Chlorophyll und Phytoplanktonzusammensetzung erfasst. Im Rahmen des Projektes BIO-eDNA wurden zusätzlich zu diesen Messungen Wasserproben für molekularbiologische Untersuchungen entnommen und filtriert. Dabei wurde aus der entnommenen homogenisierten Flusswasser-Gesamtprobe innerhalb von 6 Stunden ein Volumen von 100-1000 mL entnommen und über einen speziellen Filter (Pall 300-mL MicroFunnel™ Filtertrichter mit 0,45 µm GN-6 Metricel Membran) und mittels eines 3-fach Filtrationssystems (Pall GmbH) filtriert. Das filtrierte Volumen richtete sich dabei nach der Trübung bzw. der Gesamtmenge an Algen.

Längsprofile

An der Mosel finden seit 2017 jährlich im August/September Beprobungen im gesamten Längsverlauf von der französischen Grenze bis Koblenz statt. Für das Projekt BIO-eDNA wurde die Kampagne im September 2021 begleitet (Tabelle 1). Zusätzlich wurde im Sommer 2021 die Lahn im Längsverlauf beprobt. An der Mosel wurden 23 Probestellen und an der Lahn 19 Probestellen einschließlich einiger Zuflüsse untersucht. Neben den physikalisch-chemischen und biologischen Wasserqualitätskomponenten wurden auch Phytoplankton und benthische Diatomeen zur mikroskopischen Bestimmung beprobt. Für den Vergleich mit genetischen Methoden wurde gleichzeitig eine Referenzprobe für die molekularbiologische Analyse entnommen. Die Proben für die Phytoplanktonanalyse wurden wie oben beschrieben prozessiert, die Proben zur Bestimmung benthischer Diatomeen wurden wie in Kapitel 4.1 dargestellt konserviert.

Tabelle 1: Probenahmestationen an der Mosel und an der Lahn mit Ort, Datum, Gewässer und GPS Koordinaten. Die Buchstaben B und P in der Probenbezeichnung verweisen entweder auf Benthos- oder Planktonproben und werden in nachfolgenden Abbildungen und Kapiteln entsprechend verwendet

Standort	Datum	Gewässer	Bezeichnung	GPS Koordinaten
Längsprofil Mosel				
Perl	23.08.2021	Mosel	MOLB/P-01A	49.471739, 6.367902
Wincheringen	23.08.2021	Mosel	MOLB/P-02A	49.607269, 6.403940
Grevenmacher	23.08.2021	Mosel	MOLB/P-03A	49.675821, 6.443851
Saarburg	24.08.2021	Saar	MOLB/P-04A	49.607785, 6.554477
Konz	24.08.2021	Saar	MOLB/P-05A	49.698133, 6.569838
Trier	24.08.2021	Mosel	MOLB/P-06A	49.739377, 6.626719
Schweich	24.08.2021	Mosel	MOLB/P-07A	49.814216, 6.752652
Longuich	24.08.2021	Mosel	MOLB/P-08A	49.807382, 6.777390
Mehringen	24.08.2021	Mosel	MOLB/P-09A	49.796764, 6.830587
Detzem-Thörnich	25.08.2021	Mosel	MOLB/P-10A	49.836430, 6.836526
Piesport	25.08.2021	Mosel	MOLB/P-11A	49.885239, 6.916545
Mühlheim	25.08.2021	Mosel	MOLB/P-12A	49.915051, 7.007653
Zeltingen	25.08.2021	Mosel	MOLB/P-13A	49.954626, 7.007113
Reil	25.08.2021	Mosel	MOLB/P-14A	50.022947, 7.118173
Bullay	26.08.2021	Mosel	MOLB/P-15A	50.048841, 7.133337
Nehren, oberer Altarm	26.08.2021	Altarm Mosel	MOLB/P-16A	50.081042, 7.192044
Nehren-Brücke	26.08.2021	Mosel	MOLB/P-17A	50.082703, 7.204115
Bruttig-Fankel	26.08.2021	Mosel	MOLB/P-18A	50.138375, 7.235760
Treis-Karden	26.08.2021	Mosel	MOLB/P-19A	50.177445, 7.300070
Löf	26.08.2021	Mosel	MOLB/P-20A	50.239289, 7.443267
Kobern-Gondorf	27.08.2021	Mosel	MOLB/P-21A	50.297309, 7.463244
Koblenz Moselweiss	27.08.2021	Mosel	MOLB/P-22A	50.345102, 7.553658
Koblenz Balduinbrücke	27.08.2021	Mosel	MOLB/P-23A	50.363249, 7.593329
Längsprofil Lahn				
Kernbach	31.08.2021	Lahn	LALB/P-01A	50.858944, 8.641069
Bürgeln	31.08.2021	Ohm	LALB/P-02A	50.851957, 8.811534
Wehrda	31.08.2021	Lahn	LALB/P-03A	50.838866, 8.762274
Marburg	31.08.2021	Lahn	LALB/P-04A	50.795369, 8.760974
Roth	01.09.2021	Lahn	LALB/P-05A	50.726485, 8.724010
Ruttershausen	01.09.2021	Lahn	LALB/P-06A	50.661169, 8.712637
Gießen	01.09.2021	Lahn	LALB/P-07A	50.596344, 8.670795
Naunheim	01.09.2021	Lahn	LALB/P-08A	50.580553, 8.526853
Wetzlar	01.09.2021	Dill	LALB/P-09A	50.553352, 8.492142
Wetzler	01.09.2021	Lahn	LALB/P-10A	50.559092, 8.492027
Niederbiel	02.09.2021	Lahn	LALB/P-11A	50.551136, 8.411169
Leun	02.09.2021	Lahn	LALB/P-12A	50.540415, 8.366653
Löhnberg	02.09.2021	Lahn	LALB/P-13A	50.510155, 8.276581
Villmar	02.09.2021	Lahn	LALB/P-14A	50.395120, 8.187368
Limburg	02.09.2021	Lahn	LALB/P-15A	50.390311, 8.064447
Diez	02.09.2021	Lahn	LALB/P-16A	50.371028, 8.005293
Obernhof	03.09.2021	Lahn	LALB/P-17A	50.316409, 7.851979
Bad Ems	03.09.2021	Lahn	LALB/P-18A	50.332047, 7.713438
Lahnstein	03.09.2021	Lahn	LALB/P-19A	

4.3.2.2 Morphologische Bestimmung

Das Phytoplankton wurde vom Dienstleister Limnologie Büro Höhn (Freiburg) nach der Methode von UTERMÖHL (Beschreibung in Mischke & Behrendt 2007) bestimmt und ausgewertet. Für den Vergleich mit den DNA-basierten Daten wurde neben der Zellzahl auch das Biovolumen jedes lichtmikroskopisch

bestimmten Taxons berechnet. Diese ergibt sich aus der Multiplikation der für das jeweilige Taxon ermittelten Zellzahl mit einem taxonspezifischen Zellvolumen, das in der Auswertesoftware „PhytoFluss“ hinterlegt ist oder durch eigene Messungen ermittelt wurde. Die Summe aller Einzelvolumina der Algen ergibt das Gesamtbiovolumen der Probe.
Die benthischen Diatomeen wurden von Frau Lydia King als externe Dienstleistung gemäß der aktuellen Literatur (z.B. Lange-Bertalot et al. 2017) bestimmt.

4.3.2.3 Molekularbiologische Bestimmung

Die molekularbiologische Analyse der Phytoplanktongemeinschaft und der benthischen Diatomeen erfolgte mit der Methode des DNA-Metabarcoding. Im Folgenden sind die einzelnen Analyseschritte kurz dargestellt.

DNA Extraktion
Die DNA-Extraktion wurde aus je einem halben Probenfilter mit dem NucleoSpin Soil DNA Extraction Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei einzelne Schritte wie folgt modifiziert wurden: halbierte Filter wurden mit einem scharfen, sterilen Skalpell in 4-6 Stücke geschnitten und mit der mit Zellmaterial benetzten Seite nach Innen in die vom Hersteller zur Verfügung gestellten 2 mL Gefäße überführt. In dieser Studie wurde der Lysepuffer SL2 verwendet, der vorher auf 40 °C vorgewärmt wurde. Nach Zugabe des Lysepuffers wurden die Proben 5 min bei 3000 RPM in einem Vortexmixer inkubiert und anschließend unmittelbar für 3 min bei 50 °C inkubiert. Um den Zellaufschluss zu verbessern wurden die Proben anschließend zusätzlich mit einer Schwingmühle (MM400, Retsch GmbH) für 1 min bei einer Frequenz von 30 Hz homogenisiert. Nach Hinzufügen des Lysepuffers SL3 und dem anschließenden Zentrifugationsschritt wurde die gesamte Probe, inkl. der Zellreste des re-suspendierten Pellets, in zwei Zentrifugationsschritten auf die Reinigungssäule aufgetragen. Zudem wurde die Zentrifugationszeit während der Waschschritte auf 1 min verlängert und die Spinsäule nach den Waschschritten in zwei Schritten (erst 1 min, dann 2,5 min) durch Zentrifugation getrocknet; anschließend wurde die DNA in 100 µL warmem SE-Puffer (50 °C) gelöst und einem 1 min Zentrifugationsschritt eluiert.

Die Konzentration der extrahierten DNA wurde anschließend spektrophotometrisch gemessen (NanoDrop™ OneC, Thermo Fisher Scientific) und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

PCR Amplifikation
Die extrahierte DNA wurde für die Amplifikation der V4-Region des 18S rRNA Gens (Phytoplankton), der V3V4-Region des 16S rRNA Gens (Cyanobakterien) sowie des *rbc*L Gens (benthische Diatomeen) verwendet. Die entsprechenden Primer sind in Tabelle 2 angegeben. DNA-Proben mit einer Konzentration von mehr als 10 ng/µL wurden vor der Verwendung auf 10 ng/µL verdünnt und jeweils 2 µL DNA-Lösung in einer 25 µL PCR-Reaktion eingesetzt.

Die PCR wurde mit dem DreamTaq HotStart Mastermix Green (Thermo Scientific™) und einer Endkonzentration der Primer von 400 nM in Duplikaten durchgeführt. Zusätzlich zu den Umweltproben wurden Negativproben verwendet, wobei diese aus DNA-Extraktionskontrollen und sogenannten No-Template-Controls bestanden. Die Amplifikationsbedingungen für die beiden genetischen Marker 18S-V4 und *rbc*L waren wie folgt: 2 min bei 94 °C; 28 Zyklen (33 Zyklen für *rbc*L) mit 45 sec bei 94 °C, 45 sec bei 50 °C, 1 min bei 72 °C; 10 min bei 72 °C; Hold bei 10 °C. Die Amplifikationsbedingungen für die 16S-V3-V4 Region mit dem Primerpaar Bakt_341F/ Bakt_805R_mod waren folgende: 5 min bei 95 °C; 26 Zyklen mit 40 sec bei 95 °C, 2 min bei 55 °C, 1 min bei 72 °C; 7 min bei 72 °C; Hold bei 10 °C.

Alle Amplifikationsprodukte wurden anschließend elektrophoretisch auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt (25 min bei 120V). Dazu wurde das Agarosegel mit peqGREEN DNA Färbemittel (VWR,

Deutschland) nach Herstellervorgaben angefärbt und 5 µL PCR-Produkt verwendet. Anschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht visualisiert (UVP Gelstudio Plus, Analytik Jena). Die PCR-Duplikate wurden anschließend zusammengeführt (PCR-Poolproben) und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Tabelle 2: Verwendete Primer, Sequenzen und Literaturangaben

Name	Sequenz	Target	Quelle
TAReuk454FWD1	5′-CCAGCASCYGCGGTAATTCC-3′	18S V4	Stoeck et al. 2010
TAReukREV3_mod	5′-ACTTTCGTTCTTGATYRATGA-3′	18S V4	Piredda et al. 2017
Bakt_341F	5′-CCTACGGGNGGCWGCAG-3′	16S V3-V4	Herlemann et al. 2011
Bakt_805R_mod	5′-GACTACNVGGGTWTCTAATCC-3′	16S V3-V4	Klindworth et al. 2013, Walters et al. 2016
341 F	5′-CCTAYGGGRBGCASCAG-3′	16S V3-V4	Yu et al. 2005
806 R	5′-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3′	16S V3-V4	Yu et al. 2005
rbcL_F4	5′- GGTGAAGYTAAAGGTTCWTAYTTAAA -3′	*rbc*L	modifiziert nach Vasselon et al. 2017
rbcL_R1	5′- CCTTCTAATTTACCWACWACTG-3′	*rbc*L	Vasselon et al. 2017

Hochdurchsatz-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurden durch zwei verschiedene Sequenzierdienstleister mittels Amplikon-Sequenzierung durchgeführt (Aufschlüsselung siehe Tabelle 3).

Die Sequenzierung für die V3-V4 Region des 16S rRNA Gens aller Proben der wöchentlichen Probenahme an Rhein, Mosel und Lahn sowie der Längsprofilbeprobung an Mosel und Lahn erfolgte mit den vom Sequenzierdienstleister angebotenen 16S-V3V4 Primern (341F und 806R, siehe Tabelle 2). Zusätzlich wurden alle Proben der wöchentlichen Probenahme an Rhein, Mosel und Lahn mit den in Tabelle 2 aufgeführten Primern für die V4-Region des 18S rRNA-Gens durch Sequenzierdienstleister A sequenziert. Hierfür wurden 21 µL extrahierte Probe in 1,5 mL DNA LoBind Tubes (Eppendorf, Deutschland GmbH) auf Trockeneis zum Sequenzierdienstleister versendet. Dort wurden die Proben nach dem Standardprotokoll des Sequenzierdienstleisters bearbeitet. In Kürze: Die Proben wurden nach Ankunft mit den angegebenen Primerpaaren mittels des Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs), 2 µM der jeweiligen Primer und ca. 10 ng DNA-Template amplifiziert. Amplifiziert wurde wie folgt: 1 min 98 °C, gefolgt von 30 Zyklen mit 10 sec Denaturierung bei 98°C, 30 sec Annealing bei 50°C und 30 sec bei 72°C, mit einem abschließenden 5-minütigen Schritt bei 72°C. Die PCR Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und die PCR-Produkte mit der erwarteten Länge mittels des Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Deutschland) aufgereinigt. Die Vorbereitung der Sequencing-Library wurde mit dem TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illuimna, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Qualitätskontrollen wurden mittels Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, USA) Messungen, real-time PCR und dem Agilent Bioanalyzer 2100 System (Agilent, USA) durchgeführt. Die quantifizierten Libraries wurden vereint und anschließend auf einer Illumina NovaSeq Plattform sequenziert (250bp Paired-End Reads). Dabei wurde für die 16S-V3V4 und die 18S-V4 Amplikons jeweils eine Sequenziertiefe von 30.000 bzw. 50.000 Paired-End Reads angestrebt.

Für die Proben der Längsprofilprobenahme an Mosel und Lahn wurden alle drei o.g. Marker genutzt, wobei der *rbc*L Marker nur für die Phytobenthos-Proben zum Einsatz kam. Die oben beschriebenen PCR-Poolproben (siehe Abschnitt PCR Amplifikation) wurden zur Analyse mittels Amplikon-

Sequenzierung dem Sequenzierdienstleister B übergeben. In diesem Fall enthielten die Amplifikationsprimer spezifische Adapter am 5'-Ende der in Tabelle 3 aufgeführten Primersequenzen (Forward-Primer Adapter: 5'-CGACAGGTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC-3', Reverse-Primer Adapter: 5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'). Die Amplikon-Proben wurden vom Sequenzierdienstleister zunächst mittels AMPure XP Beads (Beckman Coulter GmbH) aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Index-PCR mit 5 µL aufgereinigtem PCR-Produkt in einem Gesamtvolumen von 50 µL unter Verwendung einer Proofreading-DNA-Polymerase (Pfu, Promega GmbH). Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt: 5 min bei 94 °C; 8 Zyklen mit 1 min bei 94 °C, 1 min bei 60 °C, 2 min bei 72 °C; 10 min bei 72 °C; Hold bei 12 °C. Nach einer erneuten Aufreinigung mittels AMPure XP Beads (Beckman Coulter GmbH) und einer Konzentrationsbestimmung mittels Qubit Fluorometer (HS-Kit, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.) wurden die Proben äquimolar gepoolt und auf einer Illumina MiSeq Plattform sequenziert (300bp Paired-End Reads). Dabei wurde eine Sequenziertiefe von 50.000 Paired-End Reads angestrebt.

Tabelle 3: Übersicht über die sequenzierten Genabschnitte, die Sequenzierdienstleister und die Mindestanzahl generierter Reads in den verschiedenen Proben (LP = Längsprofil Probe, WP = wöchentliche Probe)

Jahr	Fluss	Beprobung	Probe	Barcode	Anbieter	Sequenziertiefe
2021	Lahn	LP	Benthos	16S V3-V4	B	50.000
2021	Lahn	LP	Benthos	18S V4	B	50.000
2021	Lahn	LP	Benthos	*rbc*L	B	50.000
2021	Lahn	LP	Plankton	16S V3-V4	A	30.000
2021	Lahn	LP	Plankton	18S V4	B	50.000
2021	Lahn	LP	Plankton	*rbc*L	B	50.000
2021	Lahn	WP	Plankton	16S V3-V4	A	30.000
2021	Lahn	WP	Plankton	18S V4	A	50.000
2021	Mosel	LP	Benthos	16S V3-V4	B	50.000
2021	Mosel	LP	Benthos	18S V4	B	50.000
2021	Mosel	LP	Benthos	*rbc*L	B	50.000
2021	Mosel	LP	Plankton	16S V3-V4	A	30.000
2021	Mosel	LP	Plankton	18S V4	B	50.000
2021	Mosel	LP	Plankton	*rbc*L	B	50.000
2021	Mosel	WP	Plankton	16S V3-V4	A	30.000
2021	Mosel	WP	Plankton	18S V4	A	50.000
2021	Rhein	WP	Plankton	16S V3-V4	A	30.000
2021	Rhein	WP	Plankton	18S V4	A	50.000

Bioinformatische Analyse

Die von den Sequenzierdienstleistern bereitgestellten demultiplexierten Sequenzdateien für den 18S-V4 Marker wurden bioinformatisch in QIIME2 (Bolyen et al. 2019) mit dem Denoising-Algorithmus von DADA2 (Callahan et al. 2016) ausgewertet, um Amplikon-Sequenzvarianten (ASVs) abzuleiten. Die taxonomische Zuordnung der ASVs für die 18S-V4 Region erfolgte durch den in QIIME2 implementierten VSEARCH-Klassifizierungsalgorithmus (Rognes et al. 2016) unter Verwendung der kuratierten Referenzdatenbank PR2 v.4.14.0 (Guillou et al. 2013), deren Sequenzdaten zuvor auf die entsprechende Amplikon-Region getrimmt wurden.

Die demultiplexierten Sequenzdateien für den *rbc*L Marker wurden bioinformatisch in APSCALE-GUI (Buchner et al. 2022) mit dem Denoising-Algorithmus von VSEARCH (Rognes et al. 2016) ausgewertet, um Exakt-Sequenzvarianten (ESVs) abzuleiten. Die taxonomische Zuordnung der ESVs erfolgte durch das in APSCALE-GUI implementierte local BLAST-Modul unter Verwendung der kuratierten Datenbank Diat.barcode v.10.1 (Rimet et al. 2019).

Die resultierenden Taxonomie-Tabellen wurden anschließend in TaxonTableTools zur Datenexploration, Datenfilterung und Datennormalisierung importiert (Macher et al. 2018). ASVs/ESVs mit weniger als 4 Reads (*rbc*L) bzw. 2 Reads (18S) wurden aus dem Datensatz entfernt. Dann wurde der Datensatz auf die niedrigste beobachtete Read-Anzahl pro Probe normalisiert, um einen unverfälschten Vergleich

der Proben zu ermöglichen. Anschließend wurde der Datensatz auf Taxa der Biokomponente Phytoplankton (18S-V4) oder Diatomeen (*rbc*L) gefiltert, um einen besseren Vergleich mit den morphotaxonomischen Daten zu gewährleisten. Darüber hinaus wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt, um die taxonomische Annotation eines bemerkbaren ESV der Gattung *Cymbella* zu verfeinern, einer Art, die in Europa als Neobiont einzustufen ist. Die phylogenetischen Analysen wurden wie in Wiederhold et al. (2023) (siehe Anlage 6) durchgeführt.

Für die bioinformatische Analyse wurde die vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte de.NBI Cloud innerhalb des deutschen Netzwerks für Bioinformatik-Infrastruktur (de.NBI) genutzt.

4.3.3 Auswertung der benthischen Diatomeen in Mosel und Lahn

4.3.3.1 Morphotaxonomische Auswertung benthische Diatomeen

An Lahn und Mosel wurden morphologisch 189 unterschiedliche benthische Diatomeenarten identifiziert. Nach dem Bewertungsschlüssel aus PhyLib ergab sich für alle Messstellen eine Zustands-/Potentialklasse von mäßig bis schlecht (Daten nicht gezeigt).

In den morphotaxonomischen Taxalisten der benthischen Diatomeen waren die Gattungen *Melosira*, *Navicula* und *Nitzschia* in ihrer relativen Abundanz sowohl an Lahn als auch an der Mosel am häufigsten vertreten (Abbildung 1). Auf Artebene waren *Melosira varians*, *Nitzschia dissipata*, *Amphora pediculus* und *Staurosira construens* an beiden Flüssen die am häufigsten vertretenen Arten (Abbildung 2).

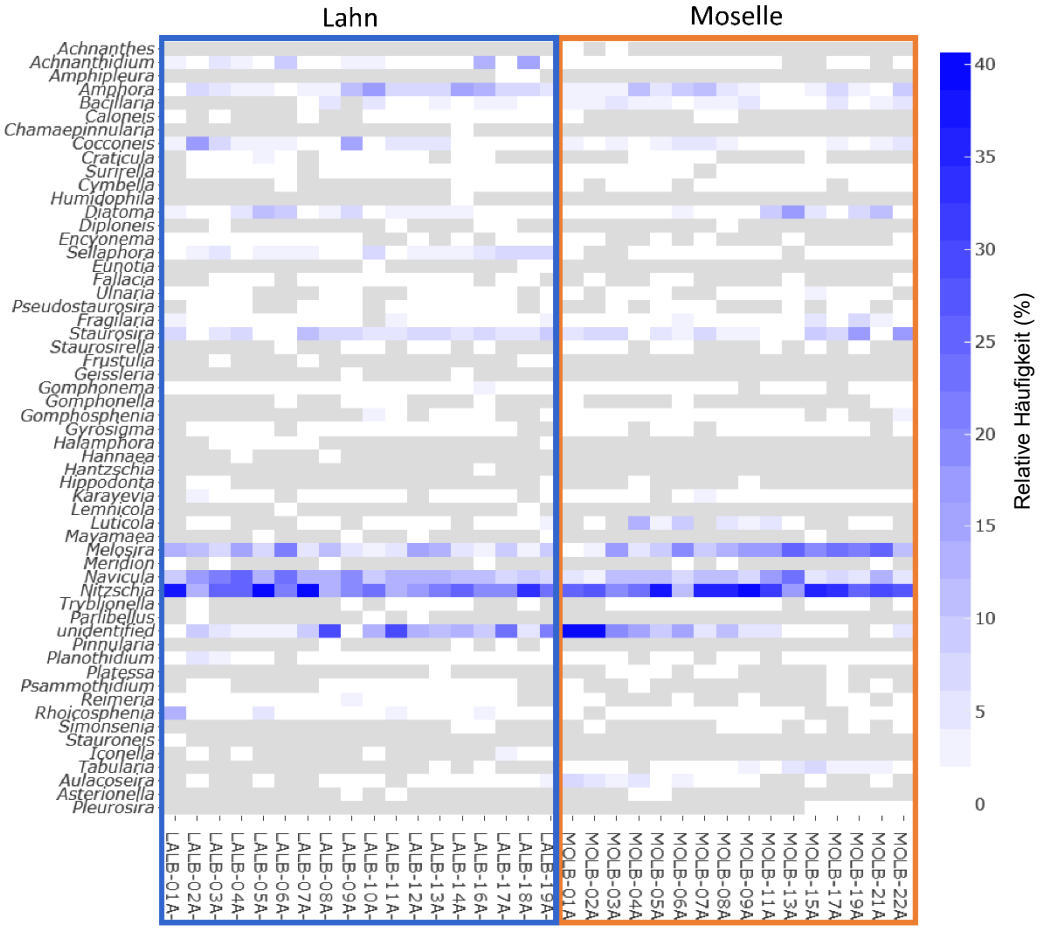


Abbildung 1: Relative Abundanz der Diatomeen-Gattungen an der Mosel und Lahn basierend auf morphologischer Auswertung.

Auch die Gattungen *Amphora* und *Staurosira* waren in beiden Gewässern häufig. Insgesamt ähneln sich die benthischen Diatomeengemeinschaften der beiden Gewässer stark. Unterschiede zeigten sich etwa bei *Achnathidium* oder *Sellaphora*, die an der Lahn stärker vertreten waren, oder *Luticola* und *Aulacoseira*, die an der Mosel häufiger zu finden waren.



Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen der am häufigsten vertretenen Arten an beiden Flüssen; Nitzschia dissipata (A), Staurosira construens (B), Melosira varians (C), und Amphora pediculus (D), Bilder: Lydia King.

In der morphologischen Bestimmung konnten je nach Probe bis zu 40% der Taxa nicht bis auf Gattungsebene bestimmt werden. Dies zeigt sich auch auf Ebene der Arten, in der die nicht-bestimmbaren Anteile an Arten im niedrigen einstelligen Bereich und bis zu 50% schwankten (Abbildung 3).

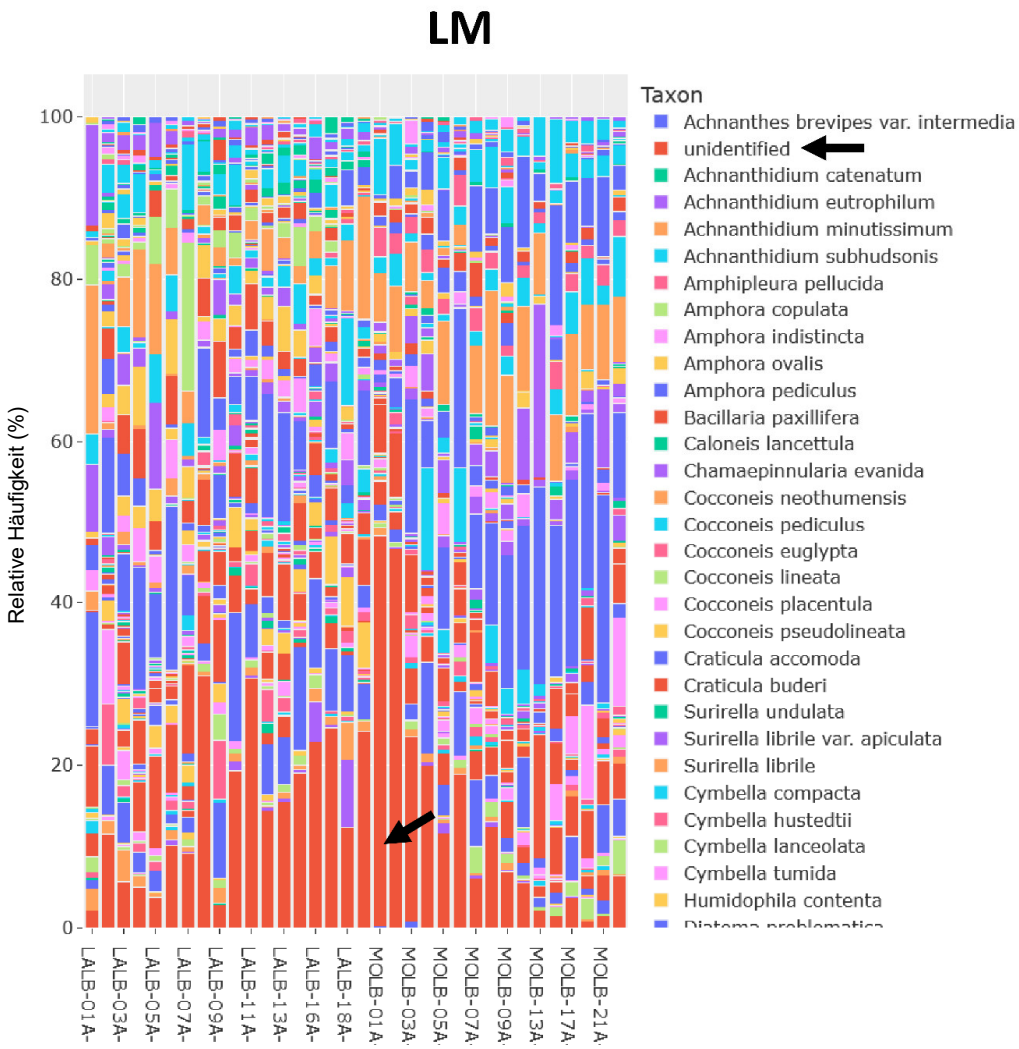


Abbildung 3: Relative Abundanz der identifizierten Arten benthischer Diatomeen basierend auf morphotaxonomischer Auswertung. Der Pfeil markiert den Anteil (%) an nicht-identifizierbaren Schalen auf Artebene.

4.3.3.2 Genetische Auswertung benthische Diatomeen

In der Auswertung der genetischen Daten (basierend auf dem *rbc*L Gen) zeigte sich ähnlich wie in der Morphologie eine Dominanz der Gattungen *Melosira*, sowie *Nitzschia*. Die Dominanz weniger Arten ist im genetischen Datensatz stärker ausgeprägt, als im morphologischen Datensatz. Dadurch zeigen die Gewässer Mosel und Lahn im genetischen Datensatz größere Unterschiede. In der Mosel sind hier zusätzlich die Gattungen *Staurosira*, *Pleurosira,* sowie *Cymbella* stark vertreten, an der Lahn *Navicula*, *Amphora* und *Surirella*. Die ersten drei Standorte an der Mosel (vor der Mündung der Saar in die Mosel) werden von anderen Arten dominiert als der Rest der Mosel. Hier finden sich die typischen planktischen Gattungen *Discostella*, *Aulacoseira*, *Thalassiosira* und *Cyclotella*, während der Unterlauf der Mosel von den in der Saar vorkommenden Gattungen überprägt zu sein scheint (siehe Abbildung 4).

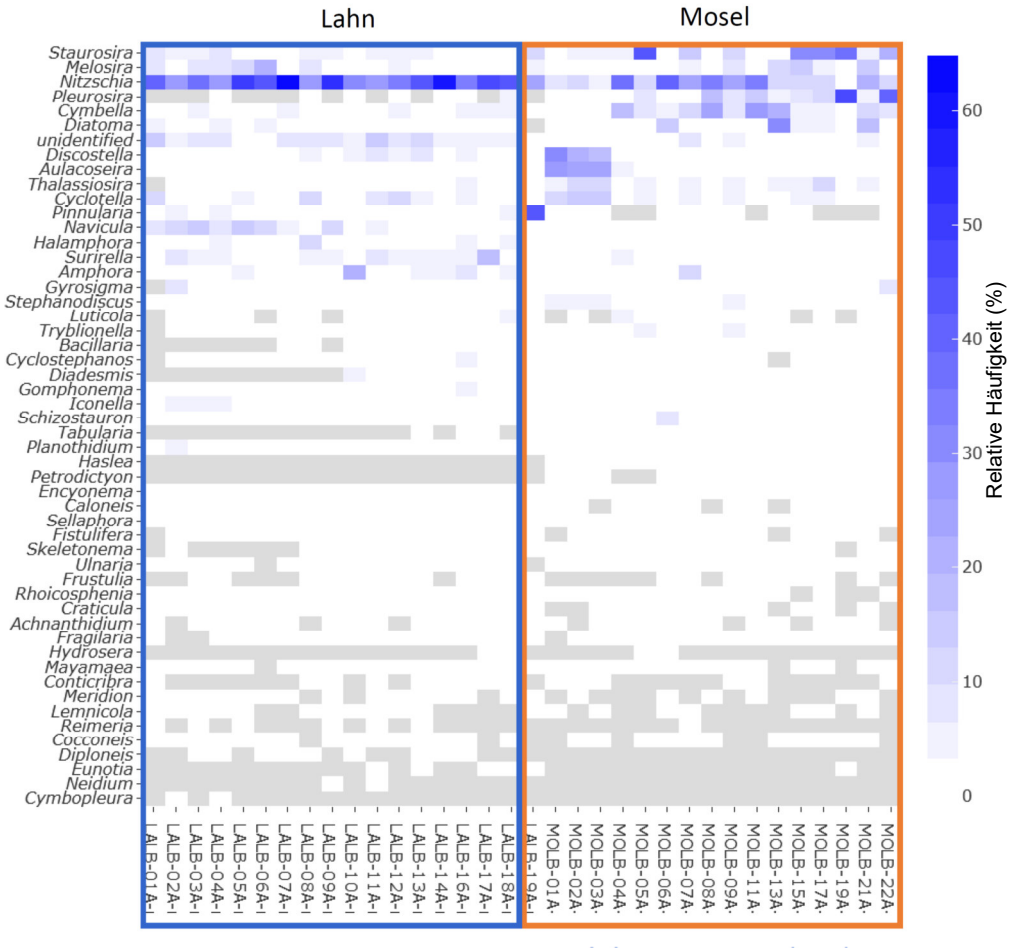


Abbildung 4: Relative Abundanz der benthischen Diatomeen-Gattungen an der Mosel und Lahn basierend auf genetischer Bestimmung (rbcL Gen).

Der Anteil nicht-bestimmbarer Gattungen in der genetischen Auswertung ist geringer als im morphologischen Datensatz. Auf Ebene der Arten ist der Anteil nicht bestimmbarer Taxa allerdings deutlich höher als bei der morphologischen Auswertung. Der Anteil der Arten, die per genetischer Bestimmung nicht eindeutig zuzuordnen sind, liegt hier zwischen 20 und ~85 % (siehe Abbildung 5). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der genutzte *rbc*L Marker in Verbindung mit der verwendeten Diat.barcode v.10.1 Datenbank auf Gattungsebene eine gute Abdeckung bietet, während auf Artebene noch großes Optimierungspotenzial besteht.

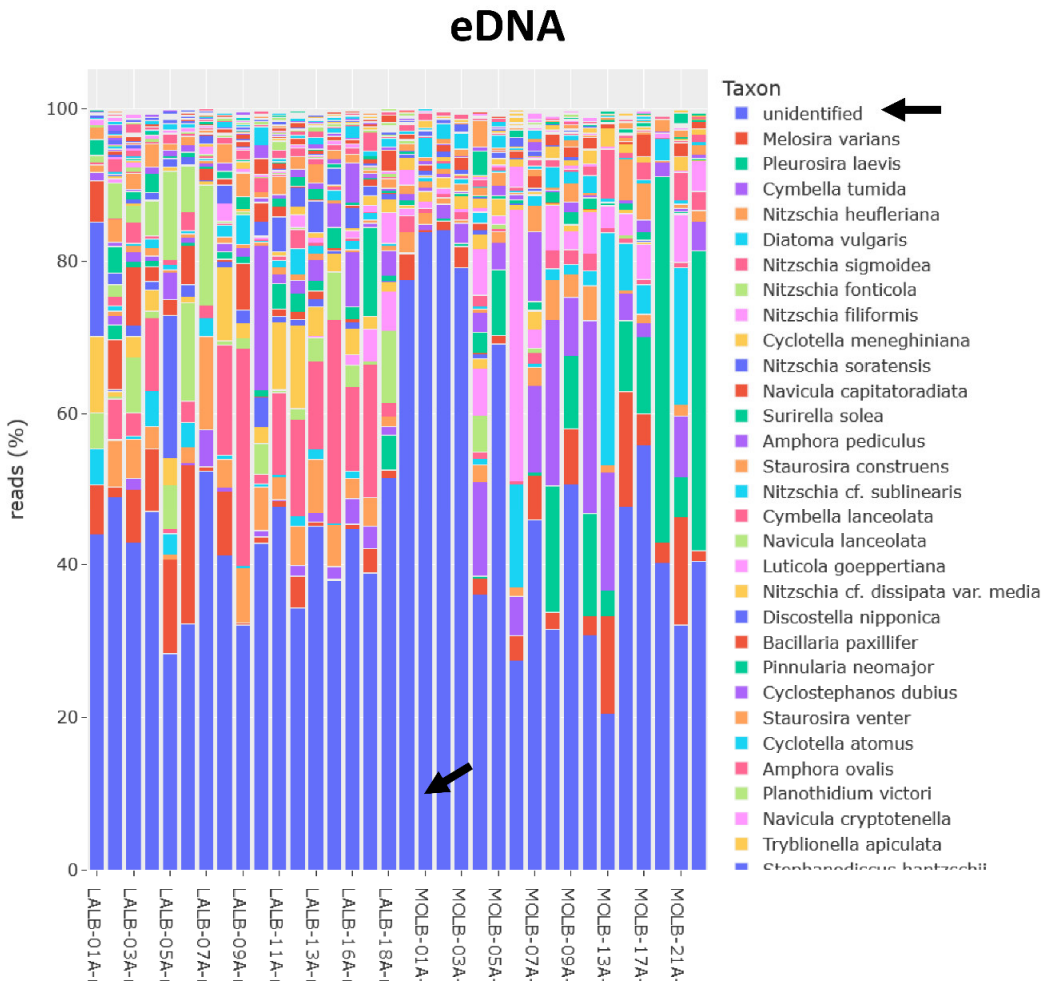


Abbildung 5: Relative Abundanz der identifizierten Arten benthischer Diatomeen basierend auf genetischer Auswertung (rbcL Gen). Der Pfeil kennzeichnet den Anteil (%) der auf Artniveau nicht-identifizierbaren Read-Sequenzen.

Eine der herausstechenden Entdeckungen der Phytobenthosanalysen an Lahn und Mosel, die sich als Zufallsbefund herausstellte, war das Vorkommen der Kieselalge *Cymbella mexicana* (Abbildung 6), einer in Nordamerika heimischen Kieselalge, die in Europa bisher nicht bekannt war. Das Vorkommen dieser Kieselalge wurde erstmals im genetischen Datensatz (*rbc*L) sowohl für die Lahn als auch für die Mosel nachgewiesen. Eine anschließende Untersuchung von mikroskopischen Präparaten bestätigte das Vorkommen der Kieselalge in beiden Flüssen. An der Probestelle MOLB-05A (Saar bei Konz) lag die Abundanz dieser Art bei bis zu 2 %. Hervorzuheben ist, dass diese Art bei der ersten Inspektion der 34 Objektträger (17.072 gezählte Schalen) nicht nachgewiesen wurde. Erst nach einer gezielten Untersuchung der Objektträger wurden Schalen dieser Art gefunden. Dabei ist zu beachten, dass diese Kieselalgenart nah mit anderen Arten verwandt ist (Abbildung 7), die Schleimstängel bilden und als invasiv gelten, darunter *Cymbella janischii* und die hoch invasive Art *Didymosphenia geminata* (Blanco & Ector 2009; Bothwell et al. 2014; Kato-Unoki et al. 2021).



Abbildung 6: Lichtmikroskopische Aufnahme der in Nordamerika heimischen Kieselalgenart Cymbella mexicana. Aus Probe MOLB-05A, Saar bei Konz.

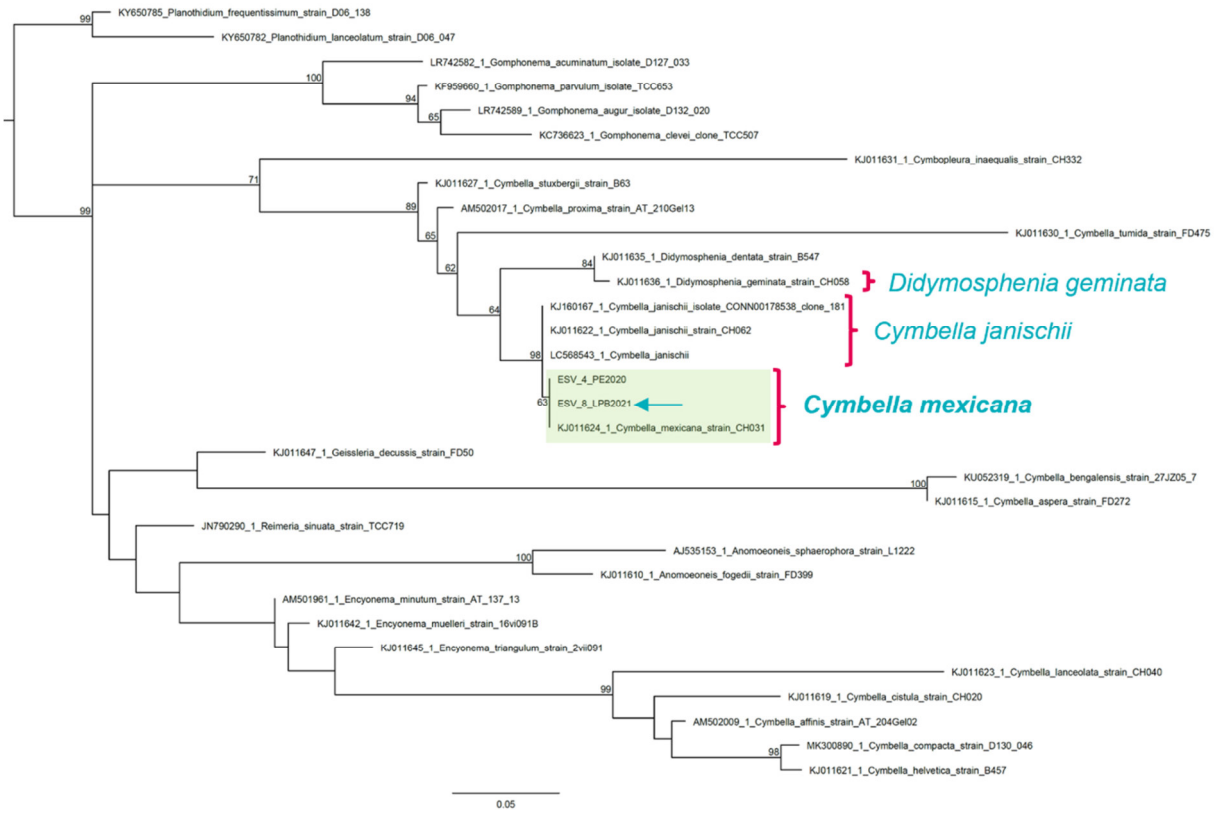


Abbildung 7: Maximum-Likelihood-Phylogenie ausgewählter Stämme innerhalb der Cymbellales, mit der Gattung Planothidium als Außengruppe, basierend auf einem 263-Positionen-Alignment des plastidären rbcL Gens. Der Pfeil markiert die ESV aus dieser Studie, die zu Cymbella mexicana zugeordnet wurde. Angegeben sind Bootstrap-Werte ≥60. Skala = Anzahl der Substitutionen pro Base.

4.3.3.3 Vergleich Morphologie vs. genetische Analyse benthischer Diatomeen

Aufgrund erheblicher Verzögerungen bei der Sequenzierung durch den Dienstleister sowie des vorzeitigen Weggangs von Projektpersonal konnte der abschließende Vergleich von Morphologie und Taxonomie nicht wie geplant vollständig durchgeführt werden.

Erste Analysen zeigten jedoch, dass die Gesamtzahl der identifizierten Arten benthischer Diatomeen bei der mikroskopischen Auswertung mit 184 höher lag, als bei der genetischen Analyse mit 102 Arten (Abbildung 8). Des Weiteren wurden nur 56 Arten mit beiden Methoden detektiert. Auf Gattungsebene überschnitten sich 36 Gattungen zwischen den beiden Methoden, während 20 Gattungen nur im morphologischen und 15 Gattungen nur im genetischen Datensatz vorkamen.



Abbildung 8: Vergleich morphologischer und genetischer Erfassung benthischer Diatomeen auf Gattungs- (links) und Art-Ebene (rechts).

In beiden Datensätzen waren *Melosira* sowie *Nitzschia* die Gattungen mit den höchsten Abundanzen. Auf Gattungsebene war der Anteil nicht-identifizierbarer Taxa in der morphologischen Auswertung höher als in der genetischen (Abbildung 1, Abbildung 3). Die genetische Analyse zeigt auf Gattungsebene also einen kleinen Vorteil. Auf Artebene war jedoch der Anteil nicht-identifizierbarer Arten in der genetischen Analyse deutlich höher als in der morphologischen Auswertung und umfasste alle analysierten Proben (Abbildung 3, Abbildung 5).

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Technologien muss daher zum jetzigen Zeitpunkt noch als sehr eingeschränkt bezeichnet werden. Dies ist vor allem auf die mangelnde Harmonisierung und die Lückenhaftigkeit der genetischen Datenbanken zurückzuführen. Artnamen und taxonomische Zuordnung in der Bundestaxaliste, die der morphologischen Taxonomie zugeordnet sind, stimmen häufig nicht mit der Taxonomie in den Online-Referenzdatenbanken überein, die für die molekularbiologische Identifizierung herangezogen werden. Zudem werden Namen und taxonomische Zuordnung regelmäßig überarbeitet und geändert. Es wird daher dringend empfohlen, kuratierte Referenzdatenbanken zu erstellen, die den Taxa aus der Bundestaxaliste entsprechen.

Des Weiteren liefern die herkömmlich genutzten genetischen Marker in Verbindung mit der Standard-Sequenziermethode für das DNA-Metabarcoding (Amplikon-basierte Illumina Sequenzierung) nur relativ kurze DNA-Sequenzen von typischerweise 200 bis 500bp (263 bp für den *rbc*L Marker). Diese Sequenzinformation ist häufig zu gering, um eine genetische Sequenz eindeutig einer Art zuordnen zu können. Die Identifizierung ist daher oft nur auf Familien- oder Gattungsniveau möglich. Dieses Problem könnte in Zukunft durch neuere Sequenziertechnologien, wie sie von Oxford Nanopore Technologies (ONT) oder Pacific Biosciences (PacBio) angeboten werden, und die daraus resultierenden längeren DNA-Sequenzen gelöst werden. Es ist jedoch zu beachten, dass auch bei der morphologischen

Bestimmung nicht immer bis auf Artniveau bestimmt werden kann und bestimmte Gruppen wie z.B. zentrische Diatomeen auf noch höherer Ebene zusammengefasst werden. Hier kann die Sequenzierung bereits heute einen Mehrwert liefern.

4.3.4 Auswertung des Phytoplanktons in Mosel, Rhein und Lahn

4.3.4.1 Morphotaxonomische Auswertung Phytoplankton

Die morphotaxonomischen Auswertungen des Phytoplanktons an Mosel, Rhein und Lahn zeigen einen typischen Jahresgang (Daten nicht gezeigt). Im Jahr 2021 wurde sowohl die Mosel und der Rhein bei Koblenz, als auch die Lahn bei Lahnstein von Diatomeen dominiert. In der Mosel steht dies im Gegensatz zu den Cyanobakterienblüten der Jahre 2017-2020 sowie 2022 und ist mit den relativ kühlen und feuchten Witterungsbedingungen im Sommer zu erklären. Im Rhein und in der Lahn kommen im Lauf der Saison vermehrt Cryptophyceen und Chlorophyceen hinzu, Cyanobakterien und Dinoflagellaten machen nur einen kleinen Teil des Biovolumens aus. Das höchste Biovolumen wird im Rhein im April erreicht, ist aber insgesamt sehr viel geringer als in Mosel und Lahn. An der Mosel wurde das höchste Biovolumen bei der ersten Probenahme Mitte März und an der Lahn im Juni beobachtet. Eine dominante Phytoplanktonklasse sind die Mediophyceae, die den Kieselalgen zugehörig sind und zu einem großen Teil aus der nicht näher bestimmbaren Gruppe „Centrales“ bestehen. Diese Gruppe von runden Kieselalgen sind außer in ihrer Größenklasse morphologisch schwierig zu unterscheiden sind.

Auch im Längsprofil der Lahn (September 2021) ist die Klasse der Mediophyceae dominierend. Die Phytoplanktonzusammensetzung im Längsprofil weist insgesamt betrachtet eine relativ hohe Konstanz auf. Insgesamt sind unter den 20 häufigsten Arten in der Lahn 10 Diatomeen, 3 Cryptomonaden, 5 Grünalgen, 1 Dinoflagellat und 1 Cyanobakterium (Abbildung 9) zu finden. Die häufigsten Arten im oberen und mittleren Teil der Lahn sind die Diatomeen *Melosira varians* (10-24%) und *Diatoma vulgaris* (max. 13%). Die letztgenannte ist besonders dominant im Zufluss Dill (LALP-09A) mit 31%. Die beiden Arten nehmen an relativer Häufigkeit in Richtung Unterlauf ab und werden von dem Dinoflagellaten *Peridiniopsis cunningtonii* (max. 15%) und dem Cryptomonaden *Plagioselmis nannoplanctica* (max. 8%) abgelöst. In den meisten Probestellen konnten 50-70% der Taxa nicht bis auf das Artniveau bestimmt werden.

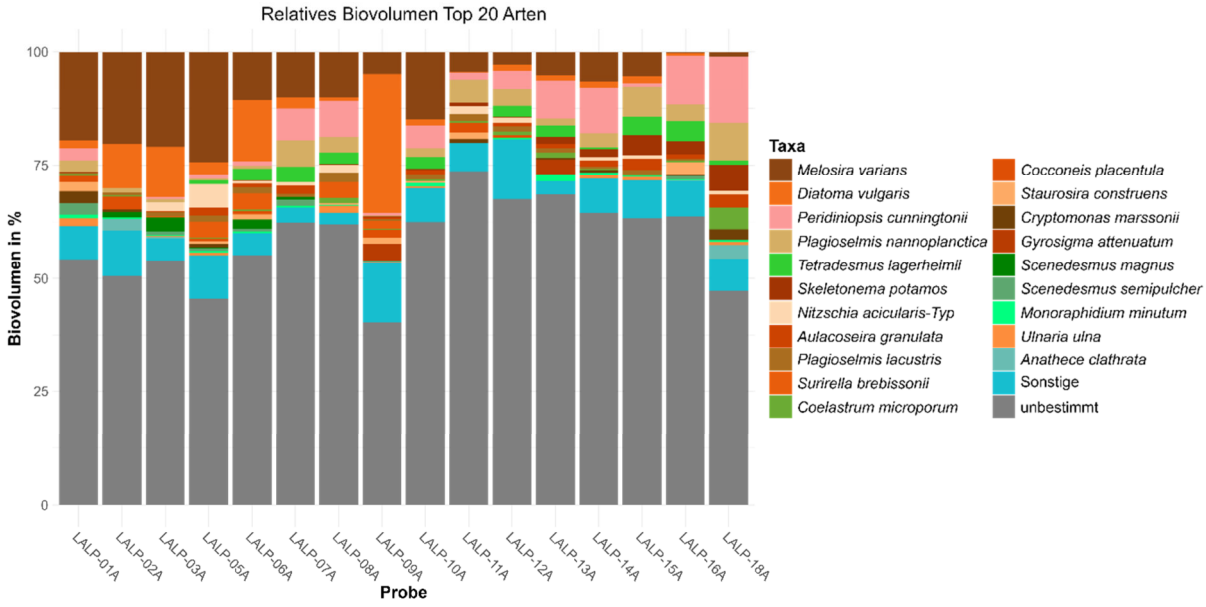


Abbildung 9: Die 20 häufigsten identifizierten Phytoplankton-Arten im morphotaxonomischen Datensatz der Lahn auf Grundlage des Biovolumens. Taxa die nicht auf Artniveau bestimmt wurden sind in grau dargestellt.

Wie an der Lahn dominieren auch in der Mosel Kieselalgenarten der Mediophyceae und Bacillariophyceae. Unter den 20 häufigsten Arten in der Mosel befinden sich 10 Diatomeen, 3 Cryptomonaden, 5 Grünalgen, 1 Dinoflagellat und 2 Cyanobakterien (Abbildung 10). Die häufigsten Arten im oberen Teil der Mosel (MOLP01-02) sind die Diatomeen *Skeletonema potamos* und *Skeletonema subsalsum*, welche zusammen 17 – 30% der gesamten Phytoplanktongemeinschaft ausmachen. In dem Zufluss Saar dominieren die Kieselalge *Melosira varians* (5 – 11%, MOLP04-05) und der Cryptomonade *Plagioselmis nannoplanctica* (4.5 – 9%), welche danach auch in der Mosel stärker vertreten sind. Im mittleren und unteren Teil der untersuchten Mosel macht *P. nannoplanctica* bis zu 25% und *M. varians* bis zu 20% der Artengemeinschaft aus. Im Altarm der Mosel in Nehren (MOLP-16A) konnte das Cyanobakterium *Oscillatoria limosa* in einem nennenswerten Biovolumen (6.7%) gefunden werden, welches sonst nicht in der Mosel identifiziert worden war. Das andere Cyanobakterium *Planktothrix agardhii* erreichte in der Mosel nie mehr als 2%. Wie oben beschrieben, stellt dies eine starke Abweichung zu den Vorjahren dar, in denen das Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa* mehr als 80% des Biovolumen ausmachte (Daten nicht gezeigt). Auch in der Mosel können 50 – 70% der Taxa nicht bis auf Art-Level bestimmt werden.

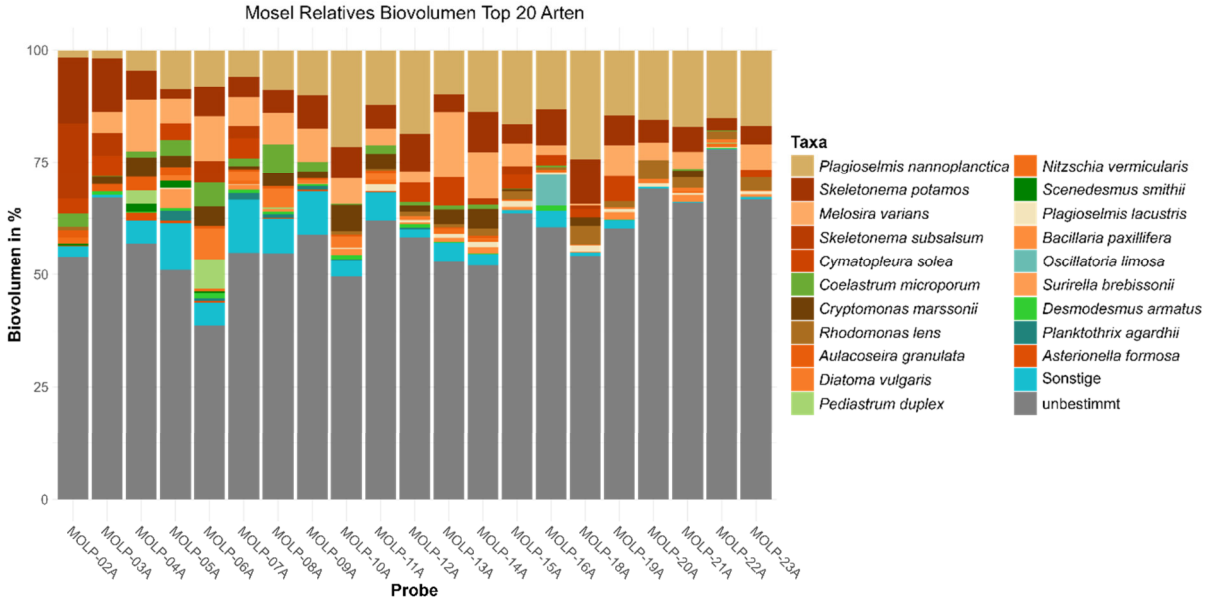


Abbildung 10: Die 20 häufigsten identifizierten Phytoplankton-Arten im morphotaxonomischen Datensatz der Mosel auf Grundlage des Biovolumens. Taxa die nicht auf Artniveau bestimmt wurden sind in grau dargestellt.

4.3.4.2 Genetische Analyse des Phytoplanktons

Insgesamt wurden 129 Proben zur Analyse des Bakterioplanktons sowie 141 Proben zur Analyse des Phytoplanktons aus Rhein, Mosel und Lahn entnommen und bei externen Dienstleistern sequenziert. Leider kam es bei einem Dienstleister zu erheblichen zeitlichen Verzögerungen, so dass die Ergebnisse mehrere Monate später vorlagen als ursprünglich geplant. Da auch das Projektpersonal frühzeitig das Projekt verließ konnten die Daten nicht mehr innerhalb des Projektes vollständig ausgewertet werden. Im Folgenden wird sich daher auf die 18S-V4 Daten der Längsprofile von Mosel und Lahn fokussiert, die während des Projekts beprobt wurden.

Lahn

Der Verlauf der Lahn wurde anhand von 18 Probenahmestellen beprobt, wobei zwei Zuflüsse zur Lahn (Ohm und Dill) untersucht wurden (s. Tabelle 1). In diesem Datensatz konnten 1.400 verschiedene ASVs identifiziert werden. Insgesamt sind 7 verschiedene Phyla, 23 Klassen, 20 Ordnungen, 30 Familien, 81 Gattungen und 23 Arten mittels der PR2-Referenzdatenbank eindeutig identifiziert worden. Der Großteil der ASVs (n = 458) konnte nur bis auf Familienebene eindeutig bestimmt werden. 138 ASVs wurden bis auf Artniveau bestimmt. Im Gesamtdatensatz der Lahnproben (inklusive der Nebenflüsse Ohm und Dill) dominierten die Bacillariophyta mit 41% aller Reads, gefolgt von Chrysophyceae mit 26% und Cryptophyceae mit 12%.

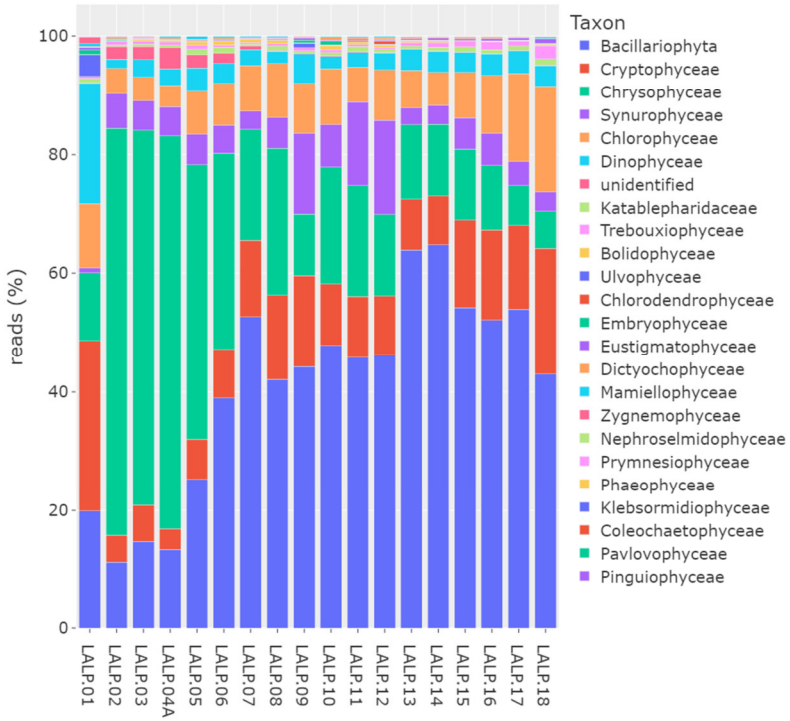


Abbildung 11: Relative Abundanz der Phytoplanktonklassen (Zuordnung basierend auf der PR2 Datenbank) an der Lahn basierend auf genetischer Bestimmung (18S rRNA Gen). Anmerkung: In der Gruppe Bacillariophyta sind Taxa enthalten, die in der verwendeten PR2 Referenzdatenbank auf Klassenebene keine Zuordnung zu einer spezifischen Klasse aufweisen und daher diesem übergeordneten Rang zugeordnet sind. Dies ist für folgende Abbildungen im Kapitel zu beachten.

Entlang des Flussverlaufs kann man deutliche Unterschiede in den relativen Anteilen der Phytoplanktonklassen erkennen (Abbildung 11). Vor dem Zusammenfluss der Ohm, dem größten Nebenfluss der Lahn, ist die Gemeinschaft noch dominiert von Cryptophyceae, Dinophyceae und Bacillariophyta. Die Phytoplanktongemeinschaft der Ohm wird zu >60% (Read-Anzahl) von Chrysophyceae dominiert, welche ein deutliches Signal in der Lahn hinterlässt.

Die relative Häufigkeit der Read-Anzahl der Bacillariophyta nimmt im Längsverlauf deutlich zu und macht ab Gießen (LALP.07) mehr als 50% der Gemeinschaft aus. Des Weiteren gewinnt die Klasse der Chlorophyceae erst im Verlauf an Bedeutung, bis sie schließlich ~20% der Read-Anzahl in Bad Ems ausmachen (LALP-18). Der Zufluss der Dill (LALP.08) in die Lahn führt nur zu geringen Veränderung der Gemeinschaft auf Klassenebene, da die Phytoplanktongemeinschaft der Dill sehr ähnlich zur Lahn ist. Allerdings nimmt der Anteil der Synurophyceae nach dem Zusammenfluss von ~ 5% auf > 10% zu. Der Wechsel von einer Chrysophyceae Dominanz im oberen Teil der Lahn zu einer Bacillariophyta Dominanz im unteren Teil vollzieht sich in der Region zwischen Ruttershausen und Gießen.

Mosel

Im Datensatz der Mosel waren 23 Probenahmeorte enthalten, in denen insgesamt 941 ASVs ermittelt werden konnten. Diese konnten 6 verschiedenen Phyla, 19 Klassen, 26 Ordnungen, 27 Familien, 64 Gattungen und 15 Arten zugeordnet werden. Dabei konnten 105 ASVs bis auf Artniveau bestimmt werden. Die meisten ASVs (n = 230) wurden den Bacillariophyta zugeordnet, dicht gefolgt von den Chrysophyceae mit 223 ASVs und den Chlorophyceae mit 188 ASVs.

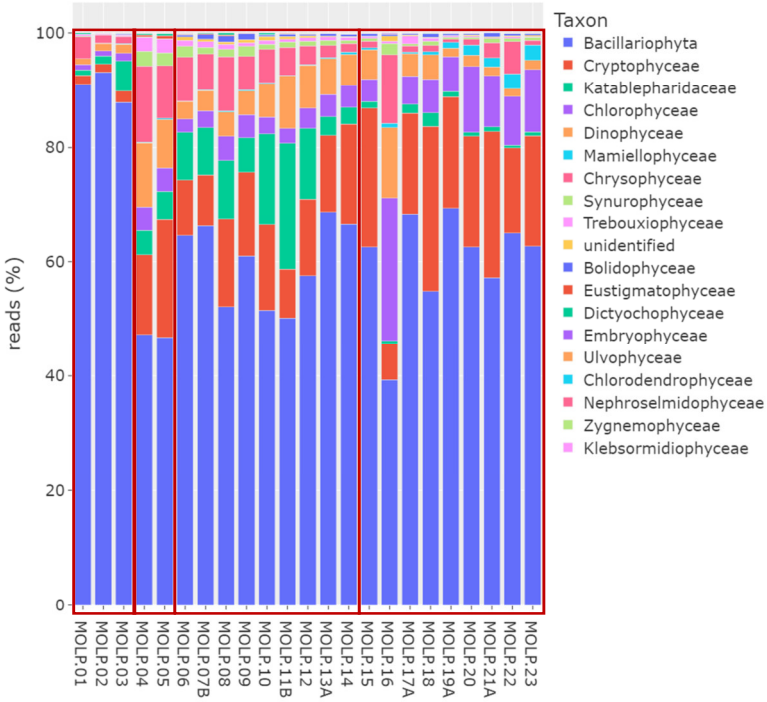


Abbildung 12: Relative Read-Abundanz der Phytoplanktonklassen (Zuordnung basierend auf der PR2 Datenbank) im Längsprofil der Mosel. Die roten Rahmen markieren die Einteilung der Proben in Obermosel, Saar, Mittel- und Untermosel (von li. nach re.).

Betrachtet man aber den relativen Anteil der Reads, welche den Bacillariophyta zugeordnet wurden, sind dies 63,26%. Wobei weniger als 7% der Reads jeweils auf Chrysophyceae und Chlorophyceae entfallen. Die relativen Anteile der Reads anderer Phyla im Mosellängsprofil sind in Abbildung 12 dargestellt. Im Gegensatz zur Lahn wird die Mosel im gesamten untersuchten Längsverlauf von Bacillariophyta zu 50 – 90% (Read-Anzahl) dominiert. Die Einteilung des Längsverlaufs in Ober-, Mittel- und Untermosel aufgrund ihrer Morphologie, zeigt sich auch in der Phytoplanktongemeinschaft. Der Oberlauf der Mosel zwischen der Grenze zu Frankreich und dem Zufluss der Saar wird mit bis zu 90% der relativen Read-Abundanz von Bacillariophyta dominiert. In der Saar macht der Anteil der Bacillariophyta Reads nur ~45% aus. Der Rest besteht hauptsächlich aus Cryptophyceae, Dinophyceae und Chrysophyceae. Dieses Verhältnis zeigt sich auch noch nach dem Zusammenfluss in der Moselgemeinschaft bis Mühlheim (MOLP.12; Abbildung 12).

In der Mittelmosel zwischen Trier und Reil zeigte sich ein Peak von Katablepharidaceae (max. 22% Read-Abundanz), die zu den Cryptophyten gehören und welche zuvor in Ober- und Untermosel sehr geringe Anteile ausmachten. Die Untermosel von Reil bis Koblenz unterschied sich durch deutlich mehr Chlorophyceae (bis 11% Read-Abundanz), welche im Rest der Mosel weniger als 5% ausmachten. Die zweithäufigste Klasse in der Untermosel sind die Cryptophyceae, welche bis zu einem Viertel der Phytoplanktongemeinschaft basierend auf der relativen Read-Abundanz ausmachten. Zusätzlich wurde ein

Altarm der Mosel in Nehren beprobt, welcher sich durch hohe Read-Anteile an Bacillariophyta (40%), Chlorophyceae (25%), Dinophyceae (12%) und Chrysophyceae (12%) merklich vom Hauptfluss unterschied. Cyanobakterien konnten hier aufgrund des genetischen Markers nicht detektiert werden.

4.3.4.3 Vergleich der 10 häufigsten Gattungen des Phytoplanktons im morphotaxonomischen und genetischen Datensatz

Der Vergleich der 10 häufigsten Gattungen soll zeigen, ob mit den zwei unterschiedlichen taxonomischen Bestimmungsmethoden dieselben häufigsten Gattungen gefunden werden können. Der direkte Vergleich zeigt, dass die jeweiligen Zusammensetzungen der detektierten Top 10 Gattungen große Unterschiede aufweisen. Für das Mosellängsprofil lassen sich nur zwei Gattungen, *Skeletonema* und *Cryptomonas*, in beiden Datensätzen wiederfinden. Das relative Verhältnis (Biovolumen vs. Read-Abundanz) der beiden Gattungen zeigt ähnliche Verläufe über die verschiedenen Probenahmeorte hinweg (Abbildung 13). Der Anteil der nicht bis auf Gattungslevel identifizierbaren Taxa beträgt für den morphotaxonomischen Datensatz ~25 - 60%, wohingegen es im sequenzbasierten Datensatz nur ~10 – 45% sind. Einen Großteil machen hier, wie auch bei den Phytobenthosproben, die zentrischen Mediophyceae aus, welche lichtmikroskopisch nur schwer zu bestimmen sind und daher nur als „Centrales“ zusammengefasst werden. Es ist daher zu vermuten, dass sich unter den lichtmikroskopisch als „unclassified“ definierten Taxa die durch genetische Analyse bestimmten Gattungen *Cyclotella*, *Thalassiosira* und *Stephanodiscus* befinden. Die molekularbiologischen Analysen können hier also weiterhelfen, um diese Taxa näher zu bestimmen (vgl. Abschnitt 4.3.3.1). Allerdings kann dies auch zu den offensichtlichen Diskrepanzen im Vergleich beider Datensätze führen.

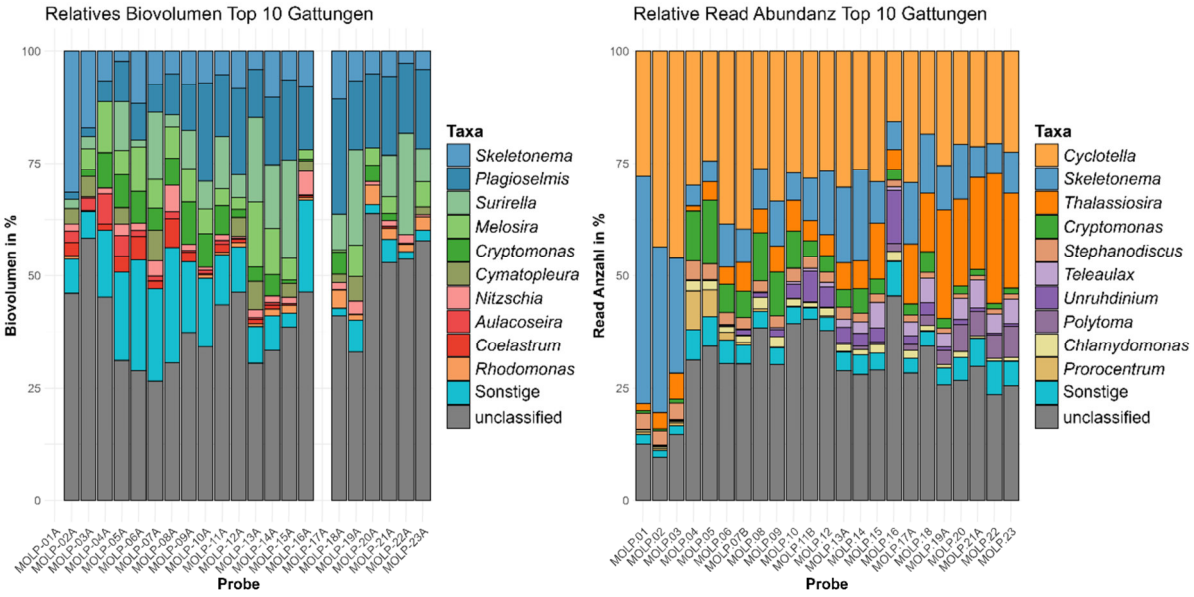


Abbildung 13: Relatives Biovolumen (links) und relative Read Abundanz (rechts) der 10 häufigsten Gattungen im Mosellängsprofil.

In der Lahn sind in beiden Datensätzen die Gattungen *Cryptomonas*, *Chlamydomonas*, *Diatoma* und *Navicula* unter den Top 10 vertreten. Im Längsprofil der Lahn zeigt sich gegenüber den Daten der Mosel ein anderes Bild bezüglich der nicht zu identifizierbaren Taxa auf Gattungsebene (Abbildung 14). Hier sind teilweise bis zu 80% der Reads der Proben im oberen Verlauf der Lahn nicht auf Gattungsebene bestimmbar. Demgegenüber sind in diesen Proben lediglich ~10-25% der Taxa im morphotaxonomischen Datensatz nicht bis auf Gattungsebene identifiziert. Der Großteil der „unclassified“ Reads im

DNA-basierten Datensatz wird zu ~45% von „Chrysophyceae Clade-F“ und zu 20-30% von „Chrysophyceae Clade-C“ gestellt, welche nicht tiefer klassifiziert sind. Im Mikroskopie-Datensatz sind neben *Synura* weitere verschiedene Gattungen der Chrysophyceen vorhanden, erreichen aber nicht so hohe Biovolumen-Anteile.

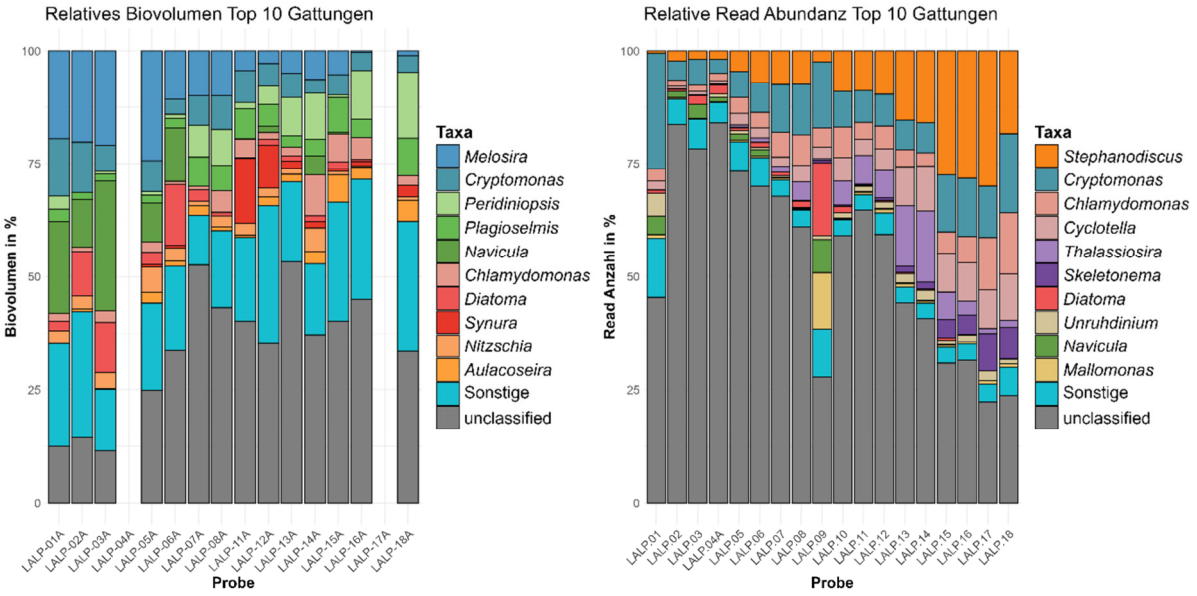


Abbildung 14: Relatives Biovolumen (links) und relative Read Abundanz (rechts) der 10 häufigsten Gattungen im Lahnlängsprofil.

Die Untersuchungen des Phytoplanktons in Mosel und Lahn mittels der V4-Region des 18S rRNA Gens als molekularen Marker zeigen, dass keine allgemeingültige Aussage darüber getroffen werden kann, mit welcher Methode eine höhere Anzahl an Taxa bis auf Gattungsebene bestimmt werden kann. Dies hängt in hohem Maße von den untersuchten Taxa selbst sowie deren Erfassung in den Datenbanken ab. Zudem ist die Unterscheidbarkeit der Taxa sowohl auf morphologischer als auch genetischer Ebene von entscheidender Bedeutung. Der Verglich zeigt aber auch die Schwierigkeiten auf, die sich aus unterschiedlicher taxonomischer Einordung ergeben. Für eine eindeutige Zuordnung und einen Vergleich wäre eine kurierte Phytoplanktondatenbank mit einer eindeutigen Zuordnung von morphologischer Charakterisierung und genetischer Identität absolut notwendig!

Aus den hier beschriebenen Gründen, sowie dem Vorzeitigen Weggang von Projektpersonal war ein umfassender vergleich des morphologischen und des genetischen Datensatzes in diesem Projekt nicht möglich. Die etablierten Protokolle und Daten werden aber in weiteren Projekten und Anwendungen genutzt:

- Die Probenahme und Analyse zur **genetischen Erfassung der Phytoplanktongemeinschaft wird** seit 2021 nach den etablierten Protokollen an Mosel und Rhein **routinemäßig fortgeführt**. Dies betrifft sowohl die wöchentliche Probenahme, als auch die jährlich stattfindenden Längsprofile an der Mosel zur Erfassung der Cyanobakterienblüten.
- Langfristig soll die genetische Probenahme und Analyse routinemäßig in das **Monitoring der IKSR** einbezogen werden. Schon in 2024 werden die im Projekt etablierten Protokolle genutzt, um die anstehende WRRL Probenahme der Länder über die IKSR zu unterstützen. Die gewonnenen Proben sollen nach den etablierten Workflows sequenziert und analysiert werden. Die Daten werden im Anschluss den Ländern und der IKSR zur Verfügung gestellt.

- Im **TG02 Projekt MeskalMon** werden die vorliegenden Sequenzierungsdaten aus dem Projekt BIO-eDNA derzeit weiteranalysiert, um die treibenden Faktoren der Cyanobakterienblüte zu beschreiben. Hier ist es geplant Teile der Daten in einer Publikation zusammen mit anderen Daten aus dem Projekt MeskalMon zu publizieren.
- Im **TG02 Projekt DigiTax** werden derzeit aufbauend auf den etablierten Protokollen mobile Sequenzierungsmethoden etabliert. Ferner dienen die Proben/Daten aus BIO-eDNA als Referenzproben für diese Analysen.
- Im **TG02 Projekt BLooM**, das im Januar 2025 starten wird, sollen die genetischen Datensätze der Mosel der vergangenen Jahre im Detail untersucht und mit Datensätzen zu Spurenstoffen verschnitten werden.

4.4 Etablierung eines Protokolls zur Identifizierung und Quantifizierung von *Prymnesium parvum* in der Oder und anderen Bundeswasserstraßen

Im Sommer 2022 kam es zu einem massiven Fischsterben an der Oder, das von der Brackwasseralge *Prymnesium parvum* ausgelöst wurde und großes öffentliches und politisches Interesse hervorrief. Die BfG wurde im Rahmen der Amtshilfe für die Brandenburger Behörden zur Unterstützung bei der Aufklärung der Ursachen des Ereignisses eingebunden. Zum Nachweis und zur Quantifizierung von *P. parvum* Zellen in der Oder wurde im Rahmen des Projektes ein spezifisches PCR-Protokoll etabliert. Ferner wurden uni-algale Kulturen von *P. parvum* isoliert und charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden sowohl in einem BfG-Bericht als auch in der peer-reviewed Zeitschrift Harmful Algae publiziert.

Anlage 5: Mora, D; Schlüsener, M; Fischer, H; Kleinteich, J; Schulz, M; Ternes, T; Thiel, J; Wick, A; Krenek, S (2024): From Genes to Toxins: Profiling Prymnesium parvum during a riverine harmful algal bloom. Harmful Algae 136. DOI: 10.1016/j.hal.2024.102644

Anlage 6: Wiederhold, J. et al. (2023): Untersuchungen zum Fischsterben in der Oder im August 2022. Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, 137 Seiten. BfG-Bericht 2143. DOI: 10.5675/BfG-2143.

4.5 Untersuchungen des Phytoplanktons im Rahmen des BBD-Modellprojekts „Ufer- und Auenrenaturierung Monsterloch“

4.5.1 Hintergrund/Ziel und Zweck

Im Rahmen des Bundesprogramms „Blaues Band Deutschland (BBD)“, einer gemeinsamen Initiative des Bundesverkehrs- und des Bundesumweltministeriums, ist eine Umgestaltung der Anbindung des sich in der Rheinaue befindlichen Baggersees „Monsterloch“ an den Rhein geplant. Ziel dieser Maßnahme ist die Verbesserung der Vernetzung zwischen Hauptstrom und Aue, um somit die ökologische Durchgängigkeit sowie die Vielfalt und Qualität des Gewässer- und Auenlebensraumes zu erhöhen. Zudem könnte eine erhöhte Durchströmung dazu beitragen, den Sauerstoffgehalt im Monsterloch zu stabilisieren und die Gewässergüte zu verbessern. Die vorgesehenen Maßnahmen sollen dazu beitragen, dass das Projektgebiet Monsterloch zukünftig als „ökologischer Trittstein“ für einen Biotopverbund von nationaler Bedeutung fungiert.

Die Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) begleitete das Projekt im Rahmen eines mehrjährigen Monitorings zur Ermittlung von Grundlagendaten für die Beurteilung des Einflusses der geplanten Maßnahmen. Das Referat U2 - Mikrobielle Ökologie hat hierfür die Gewässergüte des Monsterlochs von 2017 bis 2021 untersucht. Schwerpunkte der Untersuchungen waren dabei die Wassertemperatur, der Sauerstoffgehalt, die Nährstoffe sowie das Phyto- und Zooplankton in verschiedenen Wassertiefen.

Die Erfassung der Artengemeinschaften des Phytoplanktons erfolgte klassisch nach den Vorgaben zur Implementierung der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) hinsichtlich Probenahme und mikroskopischer Analyse. Für das Projekt BIO-eDNA wurde die Probenahmekampagne 2021 begleitet, um Artenlisten des Phytoplanktons sowohl mit klassischer Lichtmikroskopie als auch mit einem DNA-Metabarcoding-Ansatz zu erstellen, zu vergleichen und die Anwendbarkeit der im Projekt BIO-eDNA etablierten (e)DNA-basierten Methoden für Bewertungsverfahren nach EU-WRRL zu evaluieren.

4.5.2 Methodisches Vorgehen

4.5.2.1 Untersuchungsgebiet und Probenahme

Projektgebiet Monsterloch

„Monsterloch“ ist der Name des Abgrabungsgewässers im BBD-Projektgebiet Monsterloch, Rheinkilometer 397,5 bis 403,0 auf der rechten Uferseite in Baden-Württemberg gegenüber der Stadt Speyer (Abbildung 15). Das Gewässer erstreckt sich ca. 1 km parallel entlang des Rheinufers und weist eine durchschnittliche Tiefe von 6,4 m auf, wobei die tiefste Stelle fast 14 m erreicht. Das Stillgewässer ist geprägt durch interne Stoffumsätze, den Einfluss von meist sauerstoffarmem Grundwasser und sauerstoffreichem Rheinwasser. Im Jahresverlauf bilden sich regelmäßig stabile Temperaturschichtungen aus, die durch kurzzeitig höhere Abflüsse des Rheins durchbrochen werden können. In den fünf Untersuchungsjahren wurde in den unteren Wasserschichten ab 5 m Wassertiefe in der Regel ab März kaum Sauerstoff gemessen. Im Spätsommer können bei einsetzender Volldurchmischung kritische Sauerstoffverhältnisse im gesamten Wasserkörper auftreten.



Abbildung 15: Lageplan des Modellprojekts Monsterloch (aus BMVI/BMU Broschüre „Bundesprogramm „Blaues Band Deutschland“ Modellprojekte als ökologische Trittsteine an den Bundeswasserstraßen“, November 2020, 2. Auflage).

Probenahme

Die Beprobungen erfolgten an zwei Probenahmestellen im See, eine nahe des Auslassbauwerks in den Rhein (Bezeichnung MLA) und eine nahe der tiefsten Stelle des Sees (Bezeichnung MLM). An beiden Probestellen wurden sowohl physikalische Parameter wie Wassertemperatur oder Leitfähigkeit, chemische Parameter wie Nährstoffkonzentrationen als auch biologische Parameter wie Chlorophyll und Planktonzusammensetzung erfasst, wobei an der Probestelle MLM in unterschiedlichen Tiefen (0,5 m, 2 m, 4 m, 9 m, 11 m) beprobt wurde. Im Jahr 2021 wurden im Jahresverlauf an drei Terminen Beprobungen durchgeführt, am 15.04.2021, 27.05.2021 und 07.09.2021.

Die Probenahme und Auszählung des Phytoplanktons erfolgte nach der in Mischke et al. (2011) beschriebenen Methodik, wobei für die Probenahme in Tiefen von 2 m bis 11 m ein Wasserschöpfer nach

Ruttner mit 2 L Volumen (Hydro-Bios Apparatebau GmbH) zum Einsatz kam. Im Rahmen des Projektes BIO-eDNA wurde diese Probenahme um die Entnahme und Filtration einer Wasserprobe für die molekularbiologische Analyse erweitert. Die Lugol-fixierten Proben für die mikroskopische Analyse und die eDNA-Proben für die molekularbiologische Analyse wurden dabei jeweils aus Teilproben derselben Schöpfprobe hergestellt. Jede eDNA-Probe wurde als Duplikat genommen. Die eDNA-Proben wurde anschließend direkt vor Ort innerhalb von 2 Stunden über einen speziellen Einwegfilter (Pall 300-mL MicroFunnel™ Filtertrichter mit 0,45 µm GN-6 Metricel Membran) filtriert. Das filtrierte Volumen war abhängig von der Trübung bzw. der Gesamtmenge an Algen und reichte von 0,5 bis 1 Liter. Die Filter wurden anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

4.5.2.2 Morphologische Bestimmung

Die taxonomische (mikroskopische) Analyse des Phytoplanktons erfolgte durch den Dienstleister Limnologie Büro Höhn (Freiburg) nach der Methode von UTERMÖHL (Beschreibung in Mischke et al. 2011). Für den Vergleich mit den DNA-basierten Daten wurde neben der Zellzahl auch das Biovolumen jedes lichtmikroskopisch bestimmten Taxons berechnet. Diese ergibt sich aus der Multiplikation der für das jeweilige Taxon ermittelten Zellzahl mit einem taxonspezifischen Zellvolumen, das in der Auswertesoftware „PhytoFluss“ hinterlegt ist oder durch eigene Messungen ermittelt wurde. Die Summe aller Einzelvolumina der Algen ergibt das Gesamtbiovolumen der Probe. Für den Vergleich mit den DNA-basierten Daten wurden Taxa der Cyanobacteria aus dem Datensatz entfernt, da diese mittels des verwendeten molekularen Markers (18S rDNA) nicht nachgewiesen werden können.

4.5.2.3 Molekularbiologische Bestimmung

Die molekularbiologische Analyse der Phytoplanktongemeinschaft erfolgte mit der Methode des DNA-Metabarcoding. Im Folgenden sind die einzelnen Analyseschritte kurz dargestellt.

DNA Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde aus je einem halben Probenfilter mit dem NucleoSpin Soil DNA Extraction Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland) nach Herstellerangaben (mit leichten Modifikationen) durchgeführt. Die Modifikationen waren wie folgt: ein halber Probenfilter wurde in 4 bis 6 Stücke zerkleinert; der verwendete Lysepuffer SL2 wurde auf 40 °C vorgewärmt; nach Zugabe des Lysepuffers wurden die Proben für 3 min bei 50 °C inkubiert; statt der Probenlyse mittels Vortexmischer wurden die Proben mit einer Schwingmühle (MM400, Retsch GmbH) für 1 min bei einer Frequenz von 30 Hz homogenisiert; die Zentrifugationszeit während der Waschschritte betrug 1 min statt 30 sec; nach den Waschschritten wurden die Spinsäulen in zwei Schritten durch Zentrifugation getrocknet; anschließend wurde die DNA in 100 µL warmem SE-Puffer (50 °C) gelöst.

Die Konzentration der extrahierten DNA wurde anschließend spektrophotometrisch gemessen (NanoDrop™ OneC, Thermo Fisher Scientific; Konzentrationen zwischen 2,3 und 47,5 ng/µL) und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

PCR Amplifikation

Die extrahierte DNA wurde für die Amplifikation der V4-Region des 18S rRNA-Gens mit den Primern TAReuk454FWD1 (5′-CCAGCASCYGCGGTAATTCC-3′; (Stoeck et al. 2010)) und TAReukREV3_mod (5′-ACTTTCGTTCTTGATYRATGA-3′; (Piredda et al. 2017)) verwendet. Die Primer wurden mit einem spezifischen 5‘-Überhang modifiziert (Forward Primer: 5′-CGACAGGTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC-3′; Reverse Primer: 5′-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3′), um sie für die GT-seq Methode nach Campbell et al. (2015) einsetzen zu können. DNA-Proben mit einer Konzentration von mehr als 10 ng/µL wurden vor der Verwendung auf 10 ng/µL verdünnt und jeweils 2 µL DNA-Lösung in einer 25 µL PCR-Reaktion eingesetzt. Die PCR wurde mit dem DreamTaq HotStart Mastermix Green (Thermo Scientific™) und einer Endkonzentration der Primer von 400 nM durchgeführt. Von

jeder Probe wurden drei PCR-Replikate hergestellt, die nach der PCR-Amplifikation zu einer PCR-Poolprobe vereinigt wurden. Zusätzlich zu den Umweltproben wurden Negativ- und Positivproben verwendet, wobei die Negativproben aus DNA-Extraktionskontrollen und sogenannten No-Template-Controls bestanden. Als Positivkontrolle diente eine DNA-Probe aus der Mosel von 2021. Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt: 2 min bei 95 °C; 28 Zyklen mit 45 sec bei 95 °C, 45 sec bei 50 °C, 1 min bei 72 °C; 10 min bei 72 °C; Hold bei 16 °C. Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend elektrophoretisch auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt (25 min bei 120V). Dazu wurde das Agarosegel mit peqGREEN DNA Färbemittel (VWR, Deutschland) nach Herstellervorgaben angefärbt und 5 µL PCR-Produkt verwendet. Anschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht visualisiert (UVP Gelstudio Plus, Analytik Jena). Alle PCR-Poolproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Hochdurchsatz-Sequenzierung

Die PCR-Poolproben wurden zur Analyse mittels Amplikon-Sequenzierung an den Sequenzierdienstleister übergeben. Zunächst wurden die Proben mittels AMPure XP Beads (Beckman Coulter GmbH) aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Index-PCR mit 5 µL aufgereinigtem PCR-Produkt in einem Gesamtvolumen von 50 µL unter Verwendung einer Proofreading-DNA-Polymerase (Pfu, Promega GmbH). Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt: 5 min bei 94 °C; 8 Zyklen mit 1 min bei 94 °C, 1 min bei 60 °C, 2 min bei 72 °C; 10 min bei 72 °C; Hold bei 12 °C. Nach einer erneuten Aufreinigung mittels AMPure XP Beads (Beckman Coulter GmbH) und einer Konzentrationsbestimmung mittels Qubit Fluorometer (HS-Kit, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.) wurden die Proben äquimolar gepoolt und auf einer Illumina MiSeq Plattform sequenziert (300bp Paired-End Reads). Dabei wurde eine Sequenziertiefe von 50.000 Paired-End Reads angestrebt.

Bioinformatische Analyse

Die vom Sequenzierdienstleister bereitgestellten demultiplexierten Sequenzdateien wurden bioinformatisch in QIIME2 (Bolyen et al. 2019) mit dem Denoising-Algorithmus von DADA2 (Callahan et al. 2016) ausgewertet, um Amplikon-Sequenzvarianten (ASVs) abzuleiten. Die taxonomische Zuordnung der ASVs erfolgte durch den QIIME2 Naïve Bayes Klassifizierungsalgorithmus unter Verwendung eines ‚pre-trained classifiers' der kuratierten Datenbank PR2 v.4.14.0 (Guillou et al. 2013). Für die bioinformatische Analyse wurde die vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte de.NBI Cloud innerhalb des deutschen Netzwerks für Bioinformatik-Infrastruktur (de.NBI) genutzt. Die resultierende Taxonomie-Tabelle wurde anschließend in ‚TaxonTableTools' zur Datenexploration, Datenfilterung und Datennormalisierung importiert (Macher et al. 2021). Hierbei wurden die Reads der Negativkontrollen zunächst subtrahiert, ASVs mit weniger als 2 Reads („singletons") wurden aus dem Datensatz entfernt und die Daten der beiden biologischen Replikate pro Probe vereinigt. Anschließend wurde der Datensatz auf die niedrigste beobachtete Read-Anzahl pro Probe (174.884 Reads) normalisiert. Für den Vergleich mit den morphotaxonomisch erhobenen Daten wurde der Datensatz auf Taxa der Biokomponente Phytoplankton (Bigyra, Charophyta, Chlorophyta, Cryptista, Dinoflagellata, Euglenophyta, Haptophyta, Heterokontophyta) gefiltert.

4.5.3 Datenanalyse

Für den Vergleich der morphotaxonomischen mit den molekularbiologischen Artenlisten mussten die Daten zunächst harmonisiert werden. Hierfür wurden die Phytoplankton-Artenlisten anhand der in der AlgaeBase-Datenbank hinterlegten taxonomischen Klassifikation aktualisiert (https://www.algaebase.org/, abgerufen im März 2024).

Die Datenvisualisierungen und statistischen Analysen wurden mit R 4.3.1 (R Core Team 2022) in RStudio 2022.12.0 (RStudio Team 2020) durchgeführt.

Im Rahmen des Vergleichs von Sequenzähnlichkeiten zwischen ASVs mit entsprechenden Referenzsequenzen wurde eine BLASTn-Suche (Altschul et al. 1990) durchgeführt, um die ASV-Sequenzen mit der NCBI Nucleotide Collection (Sayers et al. 2022) abzugleichen.

4.5.4 Auswertung

4.5.4.1 Morphotaxonomische Auswertung

Insgesamt wurden aus dem Probensatz (N=13) 364 Taxa mittels lichtmikroskopischer Analyse bestimmt, die 97 unterschiedlichen Taxa zugeordnet wurden. Von diesen 97 Taxa konnten 58 bis auf Artniveau und 88 bis auf Gattungsebene bestimmt werden. Der überwiegende Anteil der relativ dominanten Phytoplanktonklasse Mediophyceae, die zu den Heterokontophyta zählen, konnte lediglich als nicht näher bestimmbare „Centrales“ unterschiedlicher Größenklassen klassifiziert werden. Im Gesamtdatensatz machte diese Gruppe zentrischer Kieselalgen ca. 21% des gesamten Biovolumens aus. Eine andere Algengruppe, die nur auf Klassenniveau bestimmt werden konnte, waren die sonstigen loricaten Chrysophyceae, begeißelte und mit einer Hülle umgebene einzellige Goldbraune Algen, die allerdings nur vereinzelt detektiert wurden.

Die drei Probenahmen im April, Mai und September unterschieden sich sehr stark in ihren Algen-Biomassen (Abbildung 16). So entsprach das ermittelte Biovolumen im Mai nur etwa 13% des gesamten Biovolumens im September. Dabei wurde das Monsterloch durchgehend von Cryptophyceen und Diatomeen dominiert. Grünalgen spielten meist nur eine untergeordnete Rolle und Blaualgen (Cyanobacteria) wurden ebenfalls nur in geringer Abundanz und Biomasse detektiert.

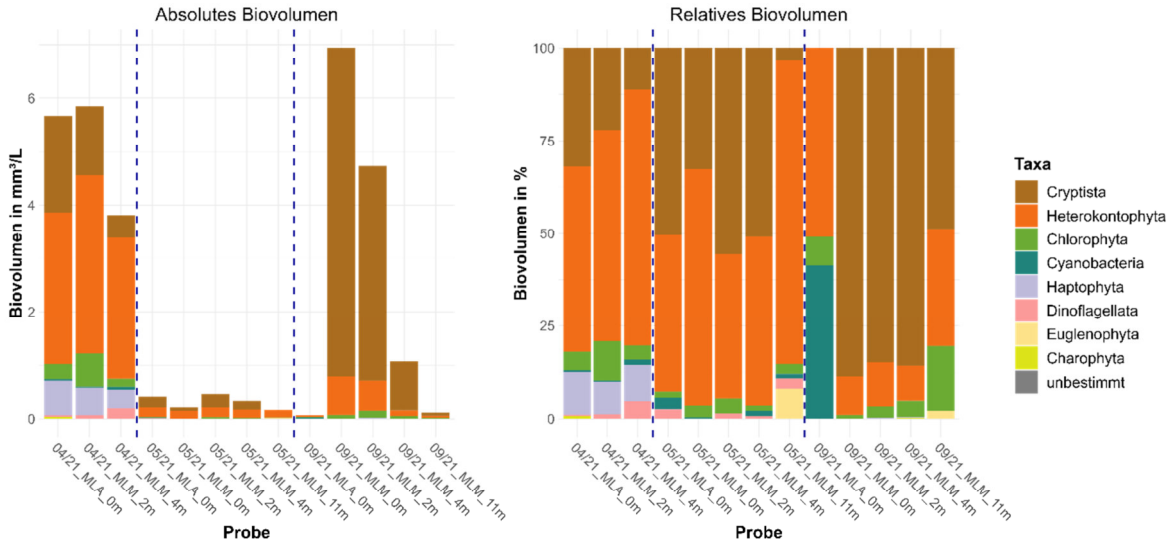


Abbildung 16: Absolute und relative Biovolumina der Phytoplanktongruppen (Phylum) im morphotaxonomischen Gesamtdatensatz.

Die Cryptophyceae, die mit 51,5% die höchste Biomasse im Gesamtdatensatz aufwiesen, wurden von den drei Arten *Cryptomonas marssonii*, *Rhodomonas lens* und *Plagioselmis nannoplanctica* dominiert. Diese Arten sind typische Phytoplanktonarten des Rheins.

Weitere häufige Vertreter der Heterokontophyta waren neben den Mediophyceae die Taxa der Chrysophyceae, Bacillariophyceae und Coscinodiscophyceae, die zusammen 36,4% des Biovolumens des Gesamtdatensatzes ausmachten. Neben den nicht auf Artebene klassifizierten „Centrales“ stellten

Ulnaria grunowii (Bacillariophyceae), *Pseudokephyrion entzii* (Chrysophyceae) und *Pseudopedinella erkensis* (Dictyochophyceae) die drei häufigsten Arten der Heterokontophyta dar (siehe Abbildung 17).

Die häufigsten Grünalgen wurden den Klassen Chlorophyceae, Trebouxiophyceae und Pyramimonadophyceae zugeordnet. Die Art *Coelastrum microporum* konnte als häufigste Grünalge während der Probenahme im September sogar in einer Tiefe von 11 Metern detektiert werden. Diese weit verbreitete Grünalge, die in Süßgewässern und auch im Rhein anzutreffen ist, bildet kugelförmige, nicht-motile Kolonien. Aufgrund dessen neigt sie dazu in ruhigen Gewässern in größere Tiefen abzusinken.

Im Rahmen der im April durchgeführten Probenahme konnte das Indikatortaxon *Chrysochromulina parva* mit einem Anteil von ca. 10% an der Gesamtbiomasse in den drei Proben nachgewiesen werden. Diese zu den Haptophyta zählende Art ist weltweit in Seen, Teichen und Flüssen verbreitet (Nicholls 2003) und gilt als einzige Süßwasser-Art der Gattung (Kasten et al. 2018). In eutrophen Gewässern kann sie dabei hohe Dichten mit bis zu 59 Millionen Zellen pro Liter aufbauen. Ihr Temperaturoptimum scheint unter 20°C zu liegen, weshalb sie typischerweise im Frühjahr gelegentlich einen dominanten Bestandteil des Phytoplanktons darstellt (Nicholls 2003).

Die wenigen detektierten Blaualgen waren vorwiegend durch die Art *Planktothrix agardhii* und *Pseudanabaena limnetica* vertreten (Abbildung 17), wobei die Probe MLA vom September 2021 durch die beiden Arten *Aphanocapsa holsatica* und *Anathece minutissima* dominiert wurde. Bis auf *A. minutissima* sind diese Arten typischerweise ebenfalls in geringen Abundanzen im Rhein zu finden.

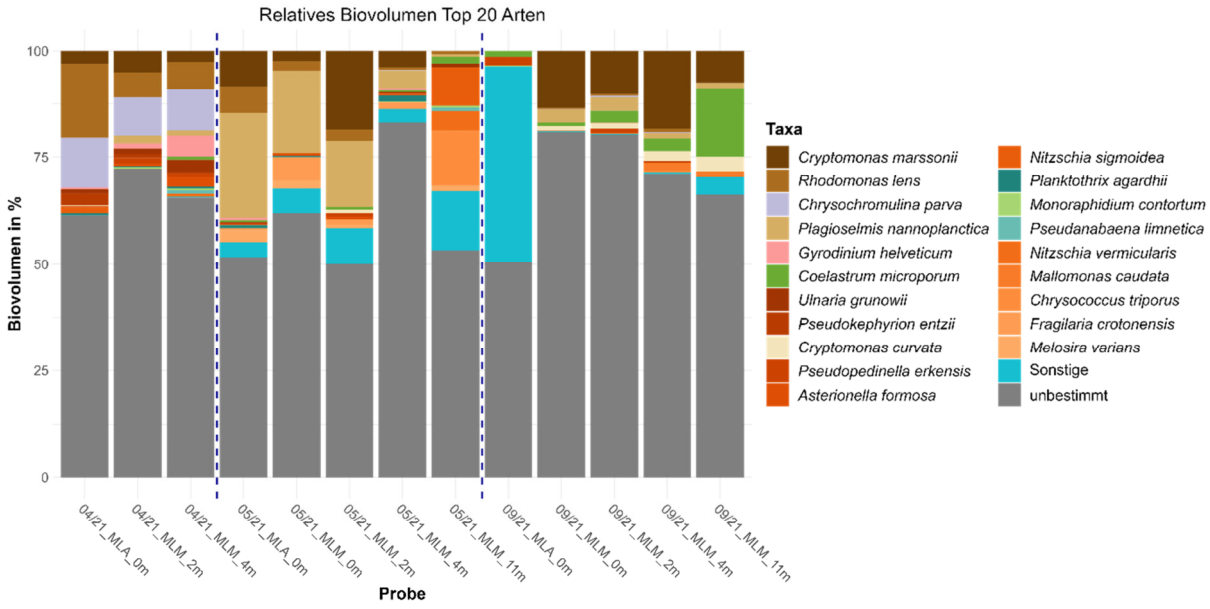


Abbildung 17: Relative Biovolumina der 20 häufigsten Arten, basierend auf ihren absoluten Biovolumenanteilen im morphotaxonomischen Gesamtdatensatz. Die Farbe der Arten entspricht ihrer Zuordnung zu den Phyla Chlorophyta = grün, Cryptista = braun, Cyanobakterien = blaugrün, Dinoflagellata = rosa, Haptophyta = violett, Heterokontophyta = orange-braun. Taxa, die nicht auf Artniveau bestimmt wurden, sind in grau dargestellt.

4.5.5 Genetische Auswertung

Mittels DNA-basierter Analyse konnten in dem Datensatz (N = 15 Proben nach Vereinigung der biologischen Duplikate) insgesamt 3601 ASVs aus einer Gesamtanzahl von 2.623.260 Reads ermittelt werden. Die ASVs konnten dabei 49 Phyla, 103 Klassen, 196 Ordnungen, 289 Familien, 357 Gattungen und 269 Arten zugeordnet werden, wobei 728 ASVs nur bis auf Phylum-Level und 559 ASVs bis auf Art-Level klassifiziert werden konnten. Die Heterokontophyta (u.a. Kieselalgen, Braunalgen, Goldbraunen Algen,

Gelbgrüne Algen, nach GUIRY 2024) stellten dabei die Gruppe (Phylum) mit der größten Anzahl an ASVs (699) und Arten (64) dar, gefolgt von den Ciliophora (Wimpertierchen) mit 492 ASVs und 54 klassifizierten Arten. Die Chlorophyta („Grünalgen“) wiesen die drittgrößte Artenzahl im Datensatz auf (39 Arten bei 307 ASVs). Die meisten Reads im Gesamtdatensatz (29,1%) entfielen jedoch auf die Cryptista (u.a. Cryptomonaden) gefolgt von den Heterokontophyta (17%) und Ciliophora (16,8%), wobei die Arthropoda (Gliederfüßer) mit 16.6% der Gesamtreadanzahl ebenfalls einen hohen Anteil aufwiesen. In Abbildung 18 ist die Verteilung der verschiedenen Phyla im Gesamtdatensatz basierend auf dem Anteil des jeweiligen Taxons in einer Probe dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die Reads, die den Ciliophora zugeordnet werden konnten, vor allem in den beiden Proben aus 9 m (15.04.2021) und 11 m (07.09.2021) Tiefe sehr große Anteile aufwiesen. In der 9 m Probe vom 15.04.2021 wurde der Großteil der Ciliophora-Reads (54%) den Scuticociliaten zugeordnet, mit bis zu 100% Sequenz-Identität zu den beiden Arten *Histiobalantium comosa* und *Histiobalantium bodamicum*. Letztere Art ist u.a. aus dem Pelagial des Bodensees mit hohen Dichten bis 20 m Tiefe bekannt und beschrieben wurden (Krainer & Müller 1995; Müller & Weisse 1994). In der 11 m Probe vom 07.09.2021 entfiel hingegen der Großteil der Ciliophora-Reads auf Taxa der Halteriidae (71%), wobei die Sequenzähnlichkeiten der Reads zu Sequenzen der Art *Halteria grandinella*, einem häufigen und ubiquitär verbreitetem planktischen Ciliaten, zwischen 98,4% und 99,2% lagen.

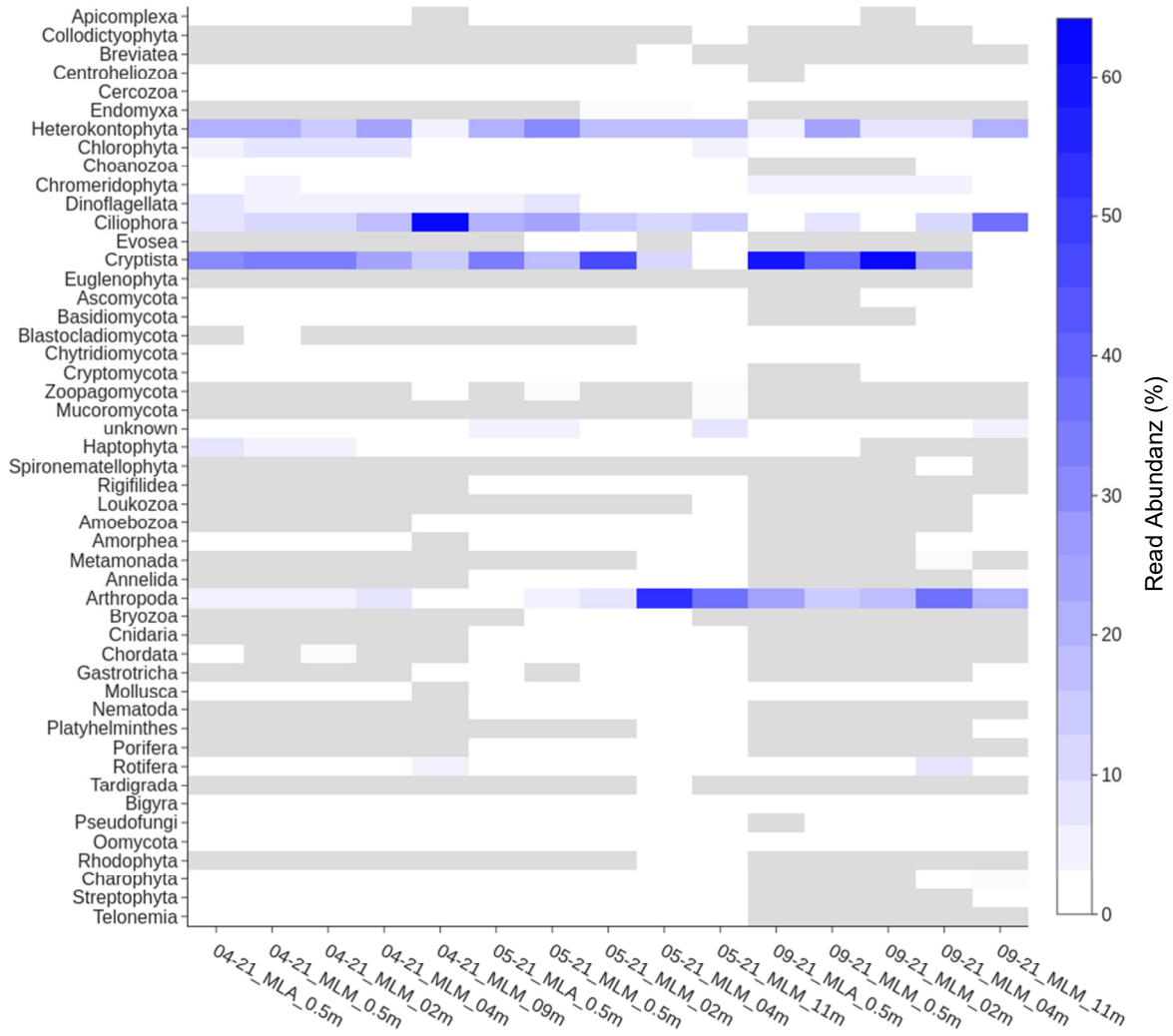


Abbildung 18: Heatmap zur Darstellung der Read-Anteile im Gesamtdatensatz der DNA-basierten Analyse, wobei die Farbskala den relativen Anteil des jeweiligen Taxons (Phylum) in einer Probe angibt. Graue Zellen bedeuten, dass in der jeweiligen Probe für dieses Taxon keine DNA detektiert wurde.

Die Cryptista, auf die an den drei Probenahmeterminen prozentual der höchste (Probenahme April und September) bzw. zweithöchste Anteil an Reads (Probenahme Mai) entfiel, waren dagegen in den tiefen Wasserschichten in eher geringeren Anteilen zu finden, im Vergleich zu Proben aus höheren Wasserschichten (siehe Abbildung 18). Der Großteil der Cryptista-Reads im Gesamtdatensatz konnte dabei der Gattung *Cryptomonas* zugeordnet werden (78%, siehe Abbildung 19), wobei das häufigste ASV (79% aller *Cryptomonas* ASVs) eine Sequenz-Identität von 100% zu Referenzsequenzen der Arten *C. curvata*, *C. lucens*, *C. obovata, C. ovata, C. parapyrenoidifera, C. rostratiformis* und *C. tetrapyrenoidosa* aufwies und somit nicht auf Artniveau bestimmt werden konnte. Dabei ist jedoch anzumerken, dass andere vorhandene Referenzsequenzen der jeweiligen Arten deutliche Sequenzunterschiede aufweisen. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die PR2 Referenzdatenbank Sequenzen fehlbestimmter Arten enthält. Neben der 100% Sequenz-Identität der o.g. Arten wies das häufigste ASV im Gesamtdatensatz die geringste genetische Distanz zu anderen Referenzsequenzen der Art *C. curvata* auf.

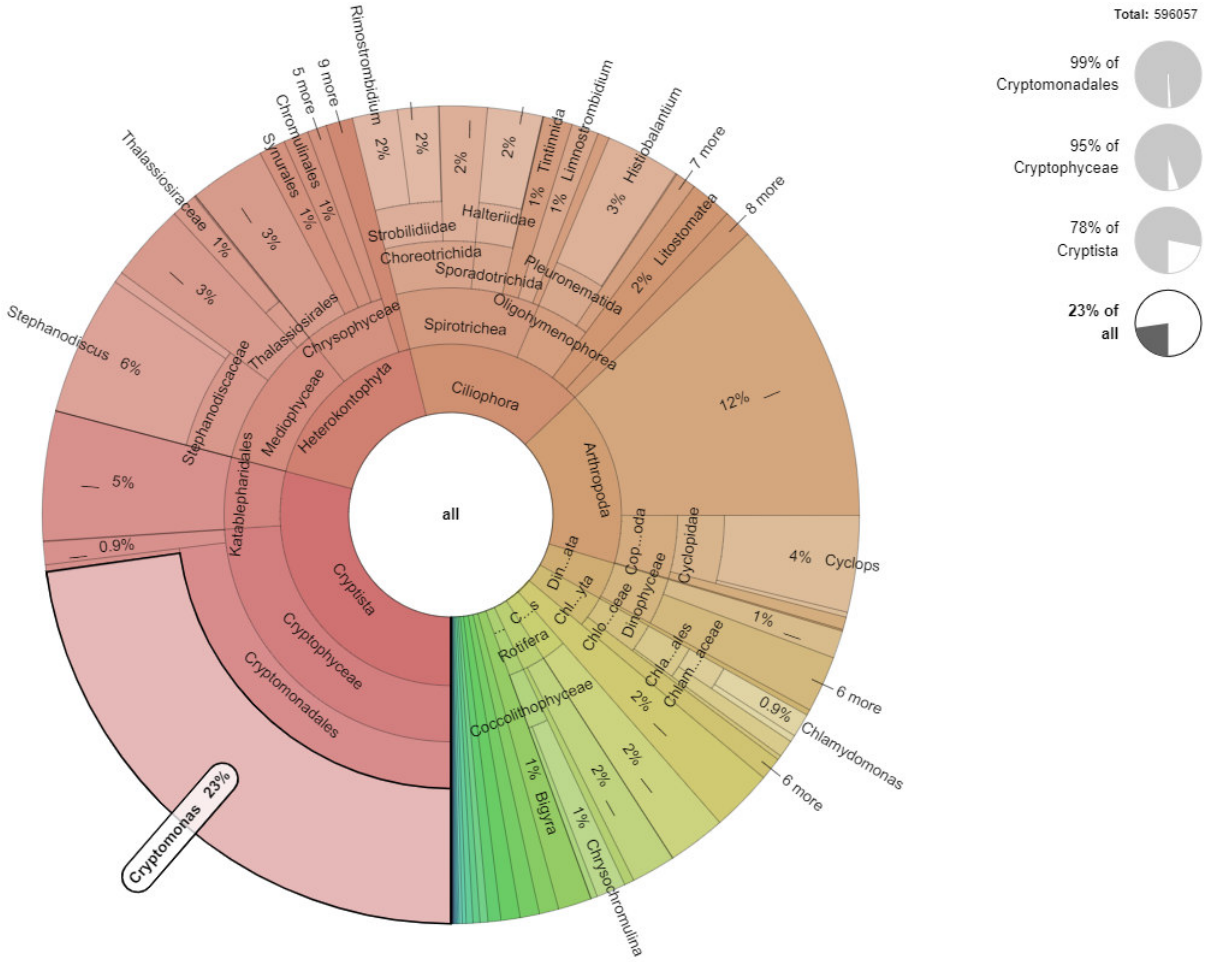


Abbildung 19: KRONA Diagramm zur Darstellung der taxonomischen Vielfalt der DNA-basierten Analyse. Die verschiedenen Farben repräsentieren die taxonomischen Gruppen auf unterschiedlichen phylogenetischen Ebenen. Die Größe der Abschnitte spiegelt die relative Häufigkeit der jeweiligen Gruppen auf der Basis der relativen Read-Abundanzen wider, hier am Beispiel Cryptomonas verdeutlicht.

4.5.6 Vergleich Morphologie vs. Genetische Analyse

Nach Reduktion der Daten auf Taxa der Biokomponente Phytoplankton mit den Phyla Bigyra, Charophyta, Chlorophyta, Cryptista, Dinoflagellata, Euglenophyta, Haptophyta, Heterokontophyta verblieben im DNA-basierten Datensatzes noch 32 Klassen, 71 Ordnungen, 110 Familien, 156 Gattungen und 135 Arten. Im morphotaxonomischen Datensatz wurden lediglich die Cyanobakterien mit 6 Arten in 6 Gattungen, 5 Familien, 4 Ordnungen und 1 Klasse herausgefiltert.

Im Vergleich beider Datensätze auf Gattungs-Ebene wird deutlich, dass *Cryptomonas* in beiden Analysen das häufigste Taxon darstellte, bezogen auf die relativen Biovolumina als auch die relativen Read-Abundanzen (Abbildung 20). Als weitere gemeinsame Taxa unter den häufigsten zehn Gattungen fanden sich lediglich *Chysochromulina* und *Mallomonas*. Die Art *Chrysochromulina parva* wurde dabei konsistent sowohl in der morphologischen als auch DNA-basierten Artenliste an allen drei Probenahmeterminen nachgewiesen, mit den jeweils höchsten Biovolumina oder Read-Abundanzen in den Aprilproben. Bei den *Mallomomas* Arten wurden im Morphologie-basierten Datensatz die beiden Arten *Mallomonas akrokomos* und *Mallomonas caudata* nachgewiesen, wobei im DNA-basierten Datensatz neben *M. akrokomos* und *M. caudata* vor allem *M. elongata* und *M. tonsurata* hohe Read-Abundanzen aufwiesen. Die beiden letzteren Arten wurden bei der lichtmikroskopischen Analyse allerdings nur bis auf Gattungsebene bestimmt und könnten unter den klassifizierten *Mallomonas* spec. zu finden sein. Obwohl die DNA-basierte Analyse in diesem Fall eine Klassifizierung auf Art-Ebene ermöglichte ist anzumerken, dass in der NCBI Datenbank für das als *M. elongata* klassifizierte ASV eine Sequenz der Art *M. alpina* mit 100%-iger Sequenzidentität existiert, die in der verwendeten Version der PR2 Datenbank nicht vorhanden war. Ähnlich verhält es sich mit denen als *M. tonsurata* klassifizierten ASVs, für die in der NCBI Datenbank teilweise ebenfalls 100% identische Sequenzen der Arten *M. intermedia* und *M. portae-ferreae* existieren.



Abbildung 20: Vergleich der relativen Biovolumina des morphotaxonomischen Datensatzes mit den relativen Read-Abundanzen des DNA-basierten Datensatzes für die häufigsten 10 Gattungen je Datensatz. Für den Vergleich wurden beide Datensätze auf Taxa der Biokomponente Phytoplankton ohne Cyanobacteria reduziert. Die häufigsten 10 Gattungen wurden basierend auf ihren relativen Gesamtanteilen im jeweiligen Datensatz definiert.

Für die im morphologischen Datensatz als „Centrales“ bestimmten Diatomeen konnte die verwendete genetische Bestimmungsmethode allerdings eine deutlich höhere taxonomische Auflösung erreichen. So wurde z.B. die Art *Cyclotella meneghiniana* bzw. nach neuerer Taxonomie *Stephanocyclus meneghinianus* (Kulikovskiy et al.) eindeutig detektiert sowie weitere ASVs den Gattungen *Acanthoceras,*

Conticribra, Discostella, Skeletonema, Stephanodiscus und *Thalassiosira* zugeordnet. Obwohl mit der V4 Region des 18S RNA Gens nicht der optimale genetische Marker zur Artunterscheidung von Diatomeen genutzt wurde, zeigt dieses Beispiel, dass moderne Verfahren einen deutlichen Mehrwert für schwerbestimmbare Arten bieten können.

Alle anderen in der vorliegenden Analyse ermittelten Top10 Gattungen waren jeweils nur in einem der beiden Datensätze (Morphologie oder DNA) enthalten. Wie in Abbildung 20 ebenfalls zu erkennen ist, war der Anteil nicht-identifizierbarer Taxa auf Gattungs-Ebene in der DNA-basierten Auswertung (32% der Reads, 60% der ASVs) insgesamt höher als in der morphologischen Analyse (21% der Biomasse, 13% der Taxa). Dabei ist allerdings zu beachten, dass in der morphologischen Analyse nur 90 verschiedene Phytoplankton-Taxa ermittelt wurden und im DNA-basierten Phytoplankton-Datensatz 1681 ASVs enthalten waren. Auf Art-Ebene waren die Anteile unbestimmbarer Taxa sowohl für die genetische (86% der Reads, 82% der ASVs) als auch die morphologische Analyse (72% der Biomasse, 47% der Taxa) relativ hoch. Dies zeigt, dass beide Analysearten bei der Bestimmung auf Art-Ebene deutliche Grenzen haben. Obwohl die V4-Region des 18S rRNA Gens eine der am häufigsten verwendete Markerregion für Metabarcoding-Studien eukaryotischer Mikroorganismen ist, können viele Taxa häufig nur auf Familien- oder Gattungsniveau bestimmt werden. Dies liegt u.a. an der relativ kurzen Sequenzlänge von ca. 420bp und dem damit eingeschränkten Informationsgehalt. Die Verwendung längerer Fragmente des Gens könnte hier entsprechend helfen, diese Taxa bis auf Artniveau zu identifizieren. Des Weiteren könnten für eine bessere taxonomische Auflösung andere genetische Marker wie etwa die V1-V2 oder V8-V9 Region der 18S rDNA, die D2-D3 Region das 28S rRNA Gens, oder die ITS (Internal Transcribed Spacer) Region genutzt bzw. auch ein Multimarker-Ansatz angewendet werden (Choi & Park 2020; Esenkulova et al. 2020; Gaonkar & Campbell 2023; Kezlya et al. 2023).

Die vergleichende Analyse der morphotaxonomischen und DNA-basierten Datensätze auf verschiedenen phylogenetischen Ebenen (siehe Abbildung 21) zeigt mit Zunahme der taxonomischen Stufe eine immer geringer werdende Konsistenz und Komplementarität dieser beiden Ansätze. Das Venn-Diagramm in Abbildung 21 veranschaulicht, dass die Anzahl der mittels genetischem Verfahren ermittelten Taxa zwar immer deutlich größer war als mittels morphologischer Analyse, allerdings waren die Überlappungen auf Gattungs- und Art-Ebene relativ gering. So konnten im DNA-basierten Datensatz nur 29 der 56 Gattungen und 13 der 52 Arten der morphologischen Taxaliste detektiert werden.

Unter den 13 Arten, die mit beiden Methoden nachgewiesen wurden, befinden sich *Cryptomonas marssonii*, welches bei beiden Analysen das häufigste Taxon auf Artniveau war, sowie *Chrysochromulina parva* und *Gyrodinium helveticum*, die bei beiden Methoden zu den 10 häufigsten Arten gehörten. *Rhodomonas lens, Plagioselmis nannoplanctica* und *Coelastrum microporum* als weitere Top10 Arten im morphotaxonomischen Datensatz wurden mittels genetischer Analyse allerdings nicht detektiert. Demgegenüber wurde beispielsweise lediglich im DNA-basierten Datensatz die zentrische Kieselalge *Thalassiosira pseudonana* oder etwa der Dinoflagellat *Unruhdinium penardii* mit relativ hohen Read-Abundanzen (ca. 1,3% bzw. 1,2%) detektiert, wobei letztere Art z.B. nicht in der „harmonisierten Taxaliste Phytoplankton (HTL)“ enthalten ist. Die Gattung *Unruhdinium* umfasst Süßwasser-Dinoflagellaten, die einen tertiären Kieselalgen-Endosymbionten beherbergen. Einige der zu dieser Gattung gehörenden Arten wie etwa *Unruhdinium penardii* können Blüten mit hoher Biomasse bilden (Kim & Ki 2022) und dadurch zu einer Rotfärbung des Wassers führen.

Des Weiteren konnte mittels DNA-Analytik die Art *Chromulinospumella sphaerica* nachgewiesen werden. Diese Art ist Teil der Chrysophyceae und wurde daher im Phytoplankton-Datensatz berücksichtigt. Es handelt sich dabei allerdings um einen heterotrophen Nanoflagellaten und keinen Vertreter des auto- oder mixotrophen Planktons. Hierbei ist ebenfalls anzumerken, dass der verwendete Klassifizierungsalgorithmus (QIIME2 Naïve Bayes classifier) zwar sehr hohe Konfidenzwerte nahe 1.0 ergab, die ASV Sequenzen aber lediglich eine Sequenzähnlichkeit von 92,2% bis 97,7% aufwiesen. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass zu der Referenzsequenz von *C. sphaerica* keine weiteren sehr ähnlichen

Sequenzen in der Referenzdatenbank vorhanden waren und der Klassifizierungsalgorithmus dadurch zu einer Fehlschätzung bzgl. des Konfidenzlevels gelangt.

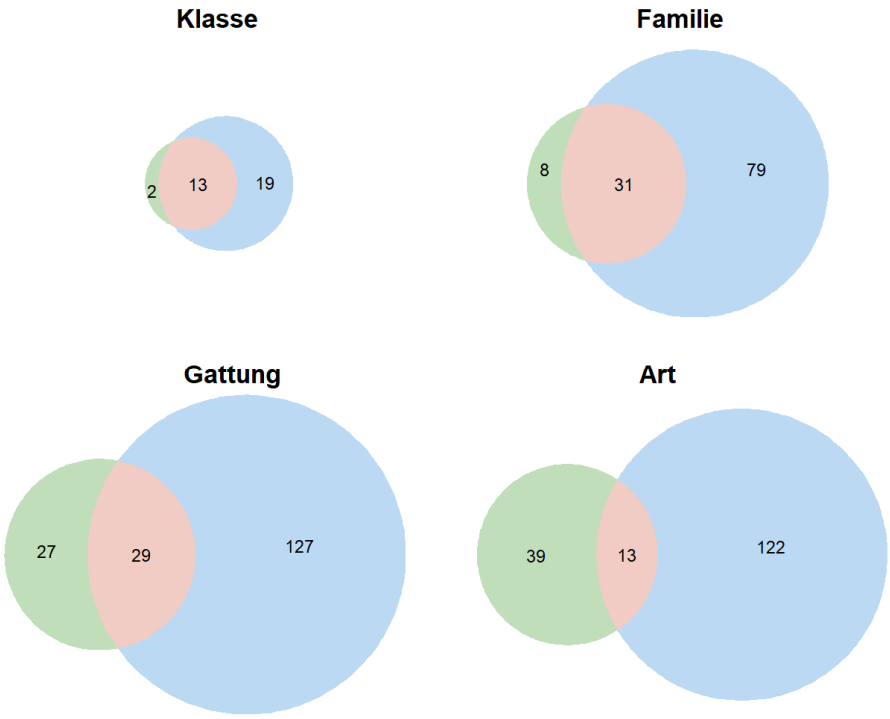


Abbildung 21: Venn-Diagramm zur Gegenüberstellung von morphotaxonomischen und DNA-basierten Daten auf verschiedenen phylogenetischen Ebenen (Klasse, Familie, Gattung und Art). Die Überlappungsbereiche (●) zeigen konsistente Taxa zwischen den beiden Methoden (● Morphologie, ● DNA), während die einzigartigen Bereiche spezifisch für jede Methode sind.

4.5.7 Fazit

Die vorliegende Pilotstudie sollte u.a. die Anwendbarkeit und den Nutzen von (e)DNA-basierten Methoden, die im Zuge des BIO-eDNA Projektes erarbeitet wurden, für Biodiversitätserhebungen an BWaStr untersuchen. Dafür wurde ein Projekt des Bundesprogramms „Blaues Band Deutschland“ ausgewählt, an welchem durch das Referat U2 u.a. das Phytoplankton untersucht wurde. In der Pilotstudie wurden entsprechend die etablierten Beprobungsleitfäden und Analyseprotokolle inkl. bioinformatischer Auswerteverfahren für die Zielgruppe Phytoplankton getestet und die DNA-basierten Taxalisten mit den Ergebnissen der morphotaxonomischen Analysen vergleichend beurteilt.

Die Wiederfindungsraten morphotaxonomisch bestimmter Taxa mittels DNA-basierter Analysen lagen auf Gattungsniveau bei ca. 52% und auf Artniveau bei nur 25%. Die DNA-basierten Analysen konnten z.B. die lichtmikroskopisch als „Centrales“ bestimmten Diatomeen teilweise auf Art- oder mindestens auf Gattungsniveau bestimmen. Unter anderem dadurch konnten mittels Metabarcoding viele zusätzliche Gattungen und Arten nachgewiesen werden. Diese fanden sich vorwiegend bei den Chlamydomonadales, Bacillariales und Paraphysomonadales, wohingegen viele zusätzliche Gattungen und Arten im morphotaxonomischen Datensatz vorwiegend unter den Sphaeropleales, Chromulinales und Pyrenomonadales vorhanden waren. Dies deutet auf eine systematische Fehlschätzung der Metabarcoding-Daten hin, die u.a. durch sog. PCR Stochastizität und Primer-Bias (ungleichmäßige Amplifikation

bestimmter DNA-Sequenzen durch die verwendeten Primer) verursacht werden und zu Verzerrungen in der Zusammensetzung der erfassten genetischen Vielfalt führen kann.

Wie bereits in Kapitel 4.3.4.3 dargestellt, sind zum einen lückenhafte genetische Referenzdatenbanken häufig ein weiterer Grund dafür, dass die ermittelten Sequenzdaten nicht korrekt klassifiziert und dem eigentlichen Taxon zugeordnet werden können. Zum anderen kann der verwendete Marker (hier die V4-Region des 18S rRNA Gens) für einige Taxa eine zu geringe Sequenzinformation enthalten, so dass eine Zuordnung auf Art- oder Gattungsebene nicht möglich ist. Die Verwendung anderer bzw. mehrerer Markergene, ggf. in Verbindung mit neueren Sequenziermethoden (Long-Read Sequencing), könnte zukünftig zur Lösung dieser Problematik beitragen.

4.6 Methodenvergleich morphologischer und genetischer Artbestimmung von Makrozoobenthosproben des Rheins zwischen Basel und Brohl, Juli/August 2020

Die Art-Identifikation von Makroinvertebraten-Lebensgemeinschaften wird derzeit standardmäßig anhand morphologischer Merkmale mit optischer Vergrößerung ermittelt. Das vorliegende Teilprojekt sollte einen Beitrag zur Evaluierung der DNA-basierten Taxonomie-Bestimmung als alternative Bestimmungsmethode für zukünftige Projekte der BfG leisten.

Es stellte sich heraus, dass die genetische Aufarbeitung von Makrozoobenthos-Proben eine vielversprechende Alternative und Ergänzung zur morphologischen Artdiagnose hinsichtlich der Gewässerüberwachung und darüber hinaus auch zur Erfassung der Biodiversität darstellt. Der BfG-Bericht ist als Anlage diesem Bericht beigefügt.

Anlage 7: BfG – Bundesanstalt für Gewässerkunde (2021): Methodenvergleich morphologischer und genetischer Artbestimmung von Makrozoobenthosproben des Rheins zwischen Basel und Brohl, Juli/August 2020. Bearbeiter: Saskia Schmidt & Dr. Franz Schöll. BfG-Bericht Nr. 2069

4.7 Methodenvergleich morphologischer und genetischer Artbestimmung von Makrozoobenthosproben der Elbe von Schmilka bis nach Hamburg, Mai 2021

4.7.1 Hintergrund/Ziel und Zweck

Standardmäßig wird das Monitoring der Makrozoobenthos-Lebensgemeinschaften der Elbe durch Mitarbeitende der BfG alle zwei Jahre durchgeführt. Dabei wird die BfG durch die Wasserstraßenschifffahrtsverwaltung (WSV) unterstützt. Zwischen der polnischen Grenze bei Schmilka und der Staustufe Geesthacht werden in 50 Fluss-km Abschnitten entlang der Elbe alle 10 Flusskilometer Proben im Querprofil genommen. Diese Proben werden standardmäßig durch Mitarbeitende der BfG morphotaxonomisch bestimmt.

Analog zur Auswertung des Makrozoobenthos des Rheins (s. Kapitel 4.6) wurden auch ausgewählte Proben der 2021 stattgefundenen Elbe-Probenahme sowohl morphotaxonomisch als auch genetisch ausgewertet. Ziel ist der Vergleich der ausgewerteten Artengemeinschaften zwischen den beiden Bestimmungsmethoden der Morphologie und des DNA Metabarcodings. Die Ergebnisse der ökologischen Gewässerbewertung durch Taxalisten der beiden Methoden sollen ebenfalls verglichen werden und zu einer besseren Einschätzung der Anwendbarkeit der Methode in der behördlichen Anwendung zum derzeitigen Zeitpunkt beitragen.

4.7.2 Methodisches Vorgehen

4.7.2.1 Untersuchungsgebiet und Probenahme

Im Zuge des alle zwei Jahre stattfindenden Makrozoobenthos-Monitorings wurde die Elbe im Mai 2021 zwischen Schmilka (Fluss-km 1,8) und Geesthacht (Fluss-km 560) alle 50 Fluss-km beprobt.

An jeder Probestelle wurden 3 Teilproben im Querprofil genommen (ufernah links, Strommitte, ufernah rechts). Dabei wurden mit einem Zweischalengreifer von Bord eines Arbeitsschiffes der Wasserstraßenschifffahrtsverwaltung (WSV) Substratproben aus der Sohle entnommen. Die Probefläche je Probe beträgt ca. 0,125 m^2. Das Standard-Probenahme-Protokoll der BfG kann (Tittizer & Schleuter 1986) entnommen werden. Die Variationsbreite des Substrates in der Elbe reicht von Sand und Kies bis zu größeren Gesteinsblöcken im Oberlauf.

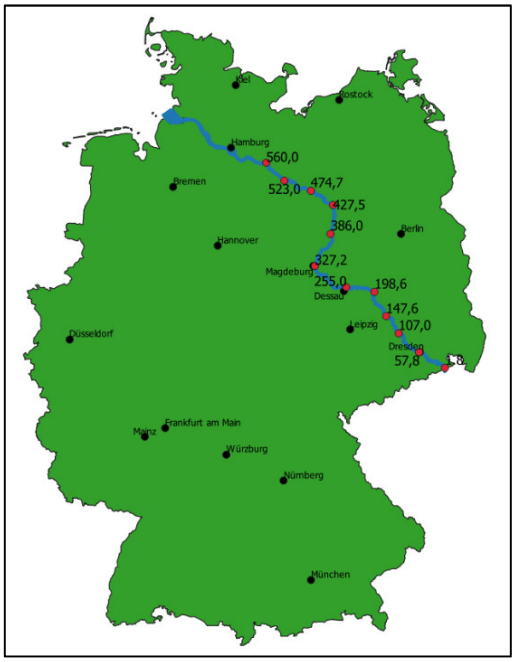


Abbildung 22: Probenahmestellen an der Elbe.

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte direkt nach der Entnahme auf den Arbeitsschiffen der WSV. Zur Isolierung der Organismen wurden größere Steine in einem wassergefüllten Behälter mit einer weichen Bürste abgebürstet. Das so gewonnene, suspendierte Material wurde zusammen mit dem feinkörnigen Sediment in Sieben von 500µm Maschenweite durch mehrmaliges Waschen von Trübstoffen befreit. Die geringe Maschenweite des Feinsiebes gewährleistet, dass auch Jugendstadien der Benthos-Organismen erfasst werden können, während feines Sediment aus der Probe entfernt wird.

Das biologische Probematerial wurde abschließend in 96%igem Ethanol in Polyethylen-Flaschen konserviert. Da der Alkoholgehalt durch die Konservierung der wasserhaltigen Organismen gesenkt wird, wurde das Ethanol innerhalb von 48 Stunden erneuert und eine optimale DNA-Konservierung gewährleistet. Die Proben wurden kühl und dunkel gelagert.

4.7.2.2 Morphotaxonomische Bestimmung

Die morphotaxonomische Bestimmung der Organismen wurde von Expertinnen der BfG durchgeführt. Dabei wurden die konservierten Organismen unter optischer Vergrößerung und Belichtung im Labor begutachtet und anhand ihrer morphologischen Merkmale taxonomischen Gruppen zugeordnet. Es wurde auf eine saubere Bearbeitung der Proben geachtet, um eine Kreuzkontamination der Proben untereinander auszuschließen und die Ergebnisse der anschließenden genetischen Analyse nicht zu verfälschen. Dies umfasst die Dekontamination der mehrfach verwendeten Materialien, wie Pinzetten oder Petrischalen durch 4 % Bleiche oder abflämmen.

Im Anschluss an die morphologische Untersuchung wurde das biologische Material der Proben ohne möglicherweise zuvor vorhandene Substratreste in seine ursprünglichen Probengefäße zurück überführt und bis zur Weiterverarbeitung kühl und dunkel gelagert.

4.7.2.3 Molekularbiologische Bestimmung

DNA Extraktion

Zur genetischen Auswertung der Mischproben wurden die Organismen einer Probe zunächst homogenisiert. Dies kann in Lösung oder getrocknet erfolgen.

Die Probenaufbereitung erfolgte im trockenen Zustand. Da sie in 96%igem Ethanol konserviert vorlagen, wurde das Ethanol zunächst abgeschüttet, bevor die Organismen in BMT-50-S oder BMT-20-S Mischgefäße mit Edelstahlkugeln überführt wurden. Diese wurden zum restlichen Abdampfen des Ethanols für 24 bis 48 Stunden abgedeckt aber offen, stehen gelassen. Proben mit größeren Organismen, wie Muscheln, wurden zusätzlich für 24 Stunden im Trockenschrank getrocknet. Leeres Muschelschill wurde aus den Proben entfernt.

Zur Homogenisation wurde das gesamte Probenmaterial einer Probe in einem Behälter mit Edelstahlkugeln für 15 Minuten mit einem ULTRA-TURRAX® Tube Drive (IKA-Werke GmbH & CO. KG, Ident-Nr.: 0003646000) bei 5.000 rpm gemahlen. Je nach Notwendigkeit wurde dieser Schritt wiederholt, bis ein feines Gewebepulver hergestellt werden konnte.

Die DNA-Extraktion aus dem Gewebepulver wurde mit dem Extraktions-Kit „NucleoMag Tissue Kit für DNA Aufreinigung aus Zellen und Gewebe“ (Macherey-Nagel, REF 744300.4) nach Anweisungen des Herstellerprotokolls durchgeführt. Für jede Probe wurden 2 Extraktionsreplikate durchgeführt um einer möglichen unvollständigen Homogenisation entgegenzuwirken. Im Anschluss an die DNA-Extraktion wurde die DNA mit dem „Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit“ (REF 740609.250) aufgereinigt und die Extraktionsreplikate wurden zusammengeführt.

PCR Amplifikation

Zur Auswertung des Makrozoobenthos wurde ein Abschnitt des mitochondrialen COI-Gens (Cytochrome c Oxidase) mit dem „Freshwater“-Primerset fwhF2/fwhR2n (5‘-TGTAAAACGACGGCCAGT GGDACWGGWTGAACWGTWTAYCCHCC-3‘ und 5‘-CAGGAAACAGCTATGACCAAACAAATARD-GGTATTCGDTY-3‘) für das Makrozoobenthos (Vamos et al. 2017) für alle Proben erfolgreich amplifiziert. Dabei wurde der Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix von New England Biolabs (NEB #M049) verwendet (25 µl Ansätze). Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt: 30 sec bei 98 °C; 30 Zyklen mit 10 sec bei 98 °C, 30 sec bei 54 °C, 30 sec bei 72 °C; 2 min bei 72 °C; Hold bei 4 °C. Jede Probe wurde doppelt amplifiziert, um stochastische Fehler bei der PCR in der bioinformatischen Auswertung leichter identifizieren und bereinigen zu können und möglichen Falsch-Positiven Ergebnissen entgegen zu wirken. Der PCR-Erfolg wurde mittels Agarose-Gel-Elektrophorese übergeprüft.

Tagging-PCR und Hochdurchsatzsequenzierung

Die zweite PCR zur Markierung („tagging“) der Einzelproben wurde beim Sequenzierdienstleister durchgeführt. Hier wurde ebenfalls die Library erstellt (Aufreinigung der Proben, äquimolares Pooling der Proben, Aufreinigung der Library) und über einen MiSeq Run mit einer angestrebten Sequenziertiefe von 50.000 DNA-Sequenzen pro Replikat sequenziert (Details sind in Abschnitt 4.3.2.3 zu finden).

Die Rohdaten des Sequenzierungslaufes wurden der BfG übermittelt und dort auf Qualität überprüft. Die bioinformatische Aufarbeitung der Proben erfolgte über die Pipeline „apscale“ (Advanced Pipeline for Simple yet Comprehensive AnaLysEs of DNA metabarcoding data; https://github.com/DominikBuchner/apscale, Buchner et al. 2022), die taxonomische Zuordnung über das Programm BOLDigger v.1.2.2 (https://github.com/lokalmatador123/BOLDigger, Buchner and Leese 2020) und die BOLD-Datenbank.

Bioinformatische Analyse

Für die finale Taxaliste wurden die PCR-Replikate der Proben zusammengeführt, dabei wurden Taxa, die nur in einem PCR-Replikat einer Probe vorhanden waren entfernt, um falsch-positive Signale auszuschließen. Durch diese konservative Herangehensweise kann es dazu kommen, sehr seltene Organismen nicht zu finden, daher muss die Wahl zwischen der Gefahr falsch-positiver Signale und der Nicht-Detektion seltener Taxa gut abgewogen werden.

Die Taxalisten wurden konservativ ausgewertet, nur Sequenzen mit einer Übereinstimmung von 90% mit den in den Datenbanken hinterlegten Sequenzen wurden für die weiteren Auswertungen verwendet. Für eine Zuordnung auf Artniveau wurde eine Übereinstimmung von mindestens 98% gewählt, für die Gattung 95%. Ebenfalls wurden die zugeordneten Taxa auf Plausibilität, sowie Zugehörigkeit zum aquatischen Lebensraum überprüft.

4.7.2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden jeweils die 3 Teilproben (ufernah links, Strommitte, ufernah rechts) einer Probestelle zusammengeführt.

Die Ergebnisse wurden sowohl auf Artenbestand, Stringenz, Konvergenz und Anwendbarkeit bei der Berechnung bestehender ökologischer Indizes verglichen.

Für die Berechnung des ökologischen Potentials und des ökologischen Zustandes nach den Vorgaben der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) wurden die Datensätze über die offizielle Software Perlodes Online (https://www.gewaesser-bewertung-berechnung.de/index.php/home.html) bewertet.

4.7.2.5 Ergebnisse: Morphologie vs. Genetik

Insgesamt wurden an den 12 Probestellen 152 Taxa gefunden, von denen 107 bis auf das Artniveau bestimmt werden konnten (s. Abbildung 23). Damit wurden 70,39% der Taxa auf dem höchsten Bestimmungsniveau identifiziert. Über das DNA-Metabarcoding wurden 80,26% der insgesamt bestimmten Taxa und 88,79% der Gesamt-Arten identifiziert, über die morphologische Bestimmung 34,87% der Gesamt-Taxa und 29,90% der Gesamt-Arten. Der Fokus dieser Auswertung liegt auf den nachgewiesenen Arten.

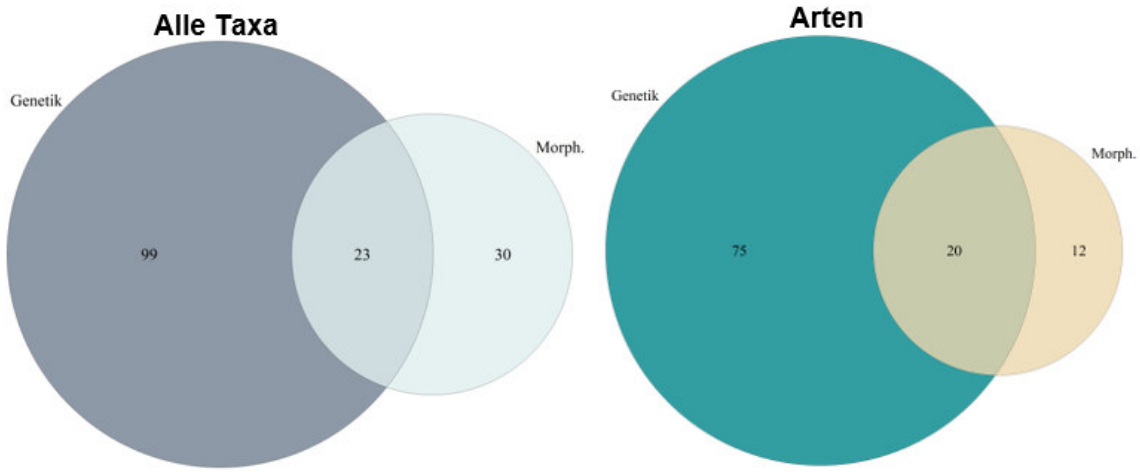


Abbildung 23: Venn-Diagramm zur Gegenüberstellung von morphotaxonomischen und DNA-basierten Daten gesamt und auf Artniveau.

Über die morphotaxonomische Bestimmung konnten insgesamt 53 Taxa und 32 Arten zugewiesen werden. Dies entspricht einer taxonomischen Bestimmung bis zum Artniveau für 60,38% der Taxa. 14 weitere Taxa konnten auf Gattungsniveau bestimmt werden. Darunter zählten unter anderem Juvenilstadien, die noch keine morphotaxonomische Bestimmungsmerkmale ausgebildet haben (Bsp. *Corbicula*, *Dikerogammarus*, *Dreissena* und *Pisidium*) und daher nicht auf das Artniveau bestimmt werden konnten. Ebenfalls kommt es vor, dass morphotaxonomische Merkmale vor oder durch die Probenahme beschädigt wurden, oder Organismen nur unvollständig in der Probe vorhanden sind. Acht weitere Taxa konnten nur auf höhere taxonomische Ebenen bestimmt werden (Bsp. Nematoda, Acari, Chironomidae, Ceratopogonidae).

Über die genetische Artbestimmung konnten insgesamt 123 Taxa und 96 Arten nachgewiesen werden. Dies entspricht einer taxonomischen Bestimmung bis zum Artniveau für 78,04% der Taxa. 16 weitere Taxa konnten auf Gattungsniveau bestimmt werden, und 11 auf Familienniveau. Zu einer unvollständigen Artbestimmung kommt es in der genetischen Bestimmung, wenn die DNA-Sequenz unter 98% mit in den Datenbanken hinterlegten Referenz-DNA Sequenzen übereinstimmt. Als Hauptursache für die fehlende Übereinstimmung der DNA-Sequenzen mit Referenz-Sequenzen können unvollständigen Datenbanken angenommen werden.

Morphotaxonomische Bestimmungsniveaus, die außerhalb der Standardtaxonomie für die molekularbiologische Artbestimmung liegen (Phylum, Klasse, Ordnung, Familie, Gattung und Art), können bei der direkten Gegenüberstellung der beiden Bestimmungsmethoden zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der Ergebnisse führen. Ein Beispiel dafür ist die anerkannte taxonomische Gruppe der Wenigborster (Oligochaeta) als eine Unterklasse der Ringelwürmer (Annelida). In dieser Unterklasse werden mehrere Familien der Ringelwürmer zusammengefasst (z.B. Enchytraeidae, Lumbricidae, Tubificidae etc.). Diese Unterklasse wird durch die genetische Artbestimmung nicht bedient, kann aber künstlich hergestellt werden, indem Taxa innerhalb dieser Familien unter dem Deckmantel „Oligochaeta“ zusammengefasst werden.

Bei der morphotaxonomischen Bestimmung für dieses Projekt wurden diese Taxa als „Oligochaeta“ zusammengefasst und nicht tiefer bestimmt (derzeit Standardvorgehen in der BfG). Daher wurden in der morphotaxonomischen Bestimmung nur drei Annelida-Taxa auf Artniveau bestimmt, während über die genetische Bestimmung 22 Anneliden-Arten nachgewiesen werden konnten.

Eine ähnliche Herausforderung tritt bei der Familie der Zuckmücken (Chironomidae) auf, die morphologisch ebenfalls nicht tiefer bestimmt worden sind, während über die Genetik ohne zusätzlichen Aufwand 36 Taxa auf Artniveau und 5 weitere auf Gattungsniveau bestimmt werden konnten, wodurch der direkte Vergleich verzerrt wirkt.

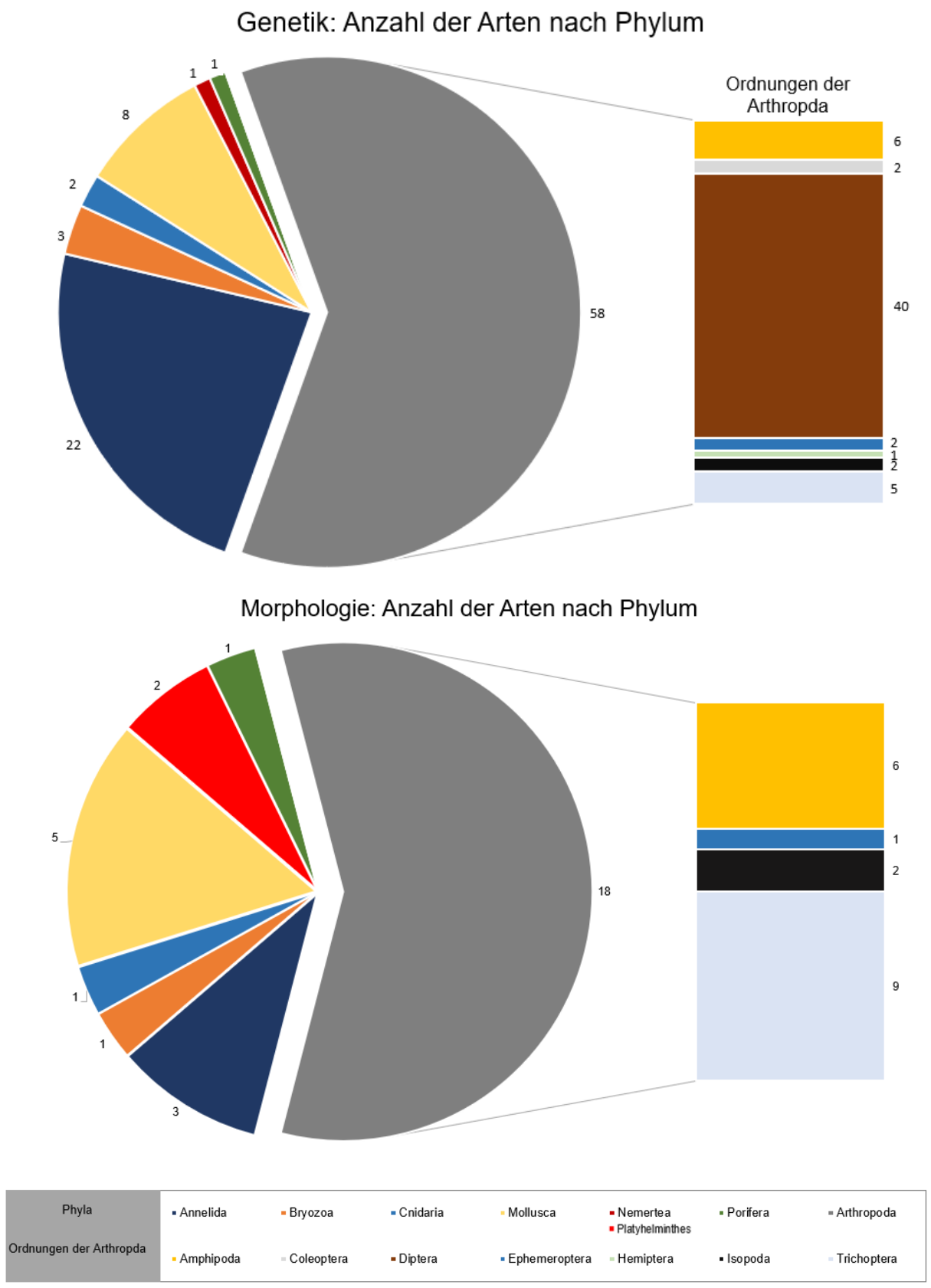


Abbildung 24: Vergleich des Artenspektrums zwischen den morphologischen und den genetischen Daten auf Phylum-Ebene. Detaillierter Blick auf das Artenspektrum der Arthropoda auf Ebene der Ordnungen.

Die größten Differenzen zwischen den beiden Bestimmungsmethoden lassen sich aus den oben beschriebenen Gründen auf die Artengruppen der Gliederfüßer (Arthropoden) und der Ringelwürmer (Anneliden) zurückführen (Abbildung 24). Auffällig ist ebenfalls, dass der Stamm der Plattwürmer (Plathelminthes) nicht über die genetische Arterfassung nachgewiesen werden konnte. Dies ist eine Schwachstelle des ‚Freshwater-Primersets' und zeigt warum die Wahl des Primers an die wissenschaftliche Fragestellung und Zielgruppen angepasst werden sollte.

Ebenfalls zu bemerken ist, dass es zu keiner morphotaxonomischen Bestimmung bis aufs Artniveau in der Ordnung der Zweiflügler (Diptera) gekommen ist, während über die Genetik 40 Arten bestimmt werden konnten. Hierzu zählen die oben erwähnten 36 Chironomidenarten, aber auch die Arten *Palpomyia flavipes, Epidapus detriticola, Simulium equinum* und *Simulum reptans*. Über die morphotaxonomische Bestimmung konnten drei der Arten nur auf ihr Familienniveau bestimmt werden (Ceratopogonidae, Simuliidae). Über beide Bestimmungsmethoden wurden Organismen der Familie Empididae nachgewiesen, die ebenfalls über beide Bestimmungsmethoden nicht auf Artniveau bestimmt werden konnten.

Bei der Ordnung der Trichoptera stimmen vier der Arten zwischen den beiden Bestimmungsmethoden überein (*Hydropsyche bulgaromanorum*, *Hydropsyche contubernalis, Cheumatopsyche lepida* und *Cyrnus trimaculatus*), eine weitere unterscheidet sich auf Artniveau (*Athripsodes* cf. *albifrons* (Morphologie) und *Athripsodes cinereus* (Genetik)). *Ecnomus tenellus* konnte morphologisch bestimmt werden, genetisch war dies nur auf Gattungsniveau möglich. Drei weitere Arten wurden morphologisch bestimmt, konnten genetisch aber nicht nachgewiesen werden (*Hydropsyche incognita, Psychomyia pusilla, Brachycentrus subnubilus*). Für alle drei Arten sind Sequenzen in der Barcode Of Life Database (BOLD) hinterlegt. Da die Organismen für die genetische Analyse gemahlen wurden, können sie leider nicht noch einmal betrachtet werden, was einen Nachteil der genetischen Methodik aufzeigt, der aber gegebenfalls in Zukunft umgangen werden kann. So gibt es bereits erste Studien, die statt des Gewebes der Organismen nur die von den Organismen in den konservierenden Alkohol (96%) abgegebene DNA analysieren (Kjærstad et al. 2022; Zizka et al. 2018).

Die höhere Taxa- und Art-Detektion durch die genetische Bestimmungsmethodik kann über alle Probestellen hinweg beobachtet werden (Abbildung 25). Dabei schwankt die Anzahl der morphologisch nachgewiesenen Taxa zwischen 8 und 36, die der genetisch nachgewiesenen Taxa zwischen 25 und 72. Die Anzahl der nachgewiesenen Arten variiert für die morphologische Bestimmung zwischen 4 am Elbe-km 147.6 und 20 an Elbe-km 198.6, während die Artenzahlen über die genetische Bestimmung zwischen 21 an Elbe-km 147.6 und 61 and Elbe-km 560 liegen.

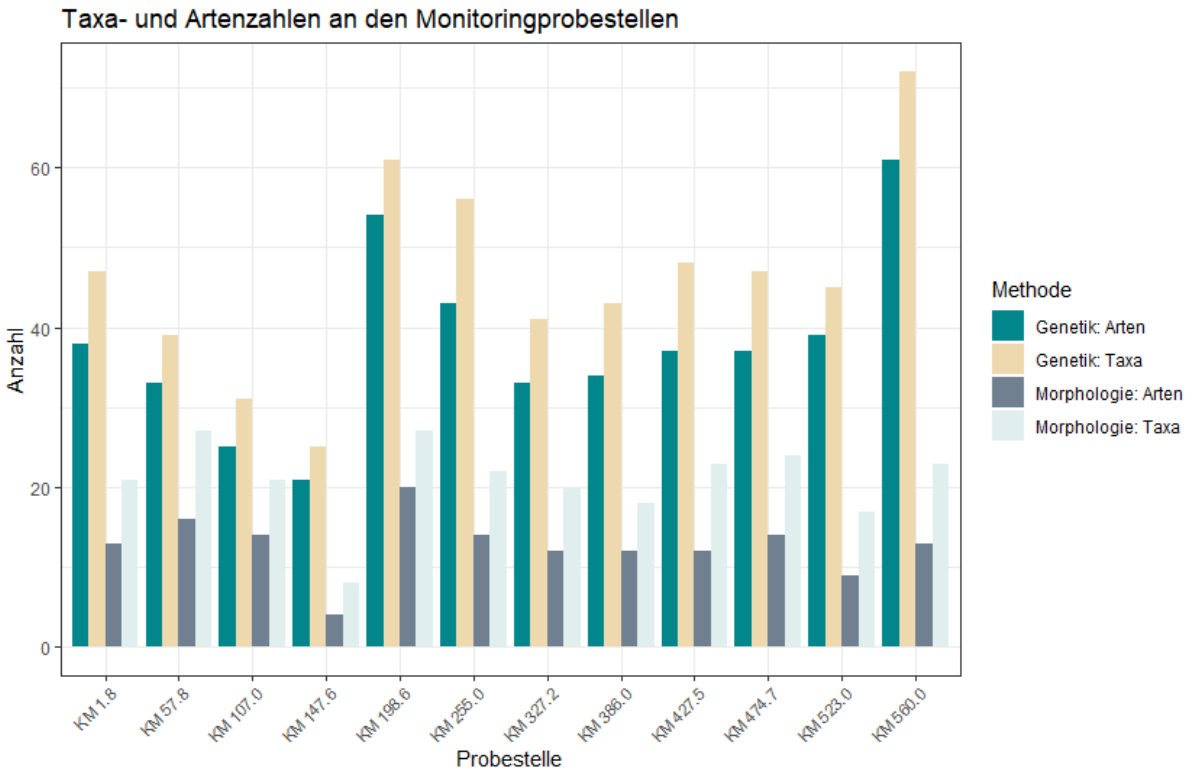


Abbildung 25: Verteilung der Taxa- und Artenzahlen an den Monitoringprobestellen entlang der Elbe. X-Achse: Flusskilometer 1,8 – 560,0. Y-Achse: Taxa- und Artenanzahl an den einzelnen Probestellen.

Ein direkter Abundanz-Vergleich der beiden Methoden ist nicht zielführend, da bei der morphotaxonomischen Bestimmung mit der absoluten Anzahl der gezählten Tiere gearbeitet wird, während bei der genetischen Bestimmung mit Sequenzabundanzen gearbeitet wird.

Die Sequenzabundanzen können sich von den absoluten Abundanzen aufgrund einiger Verzerrungen („bias“) stark unterscheiden. So wird zum Beispiel mehr DNA von größeren als von kleineren Organismen gewonnen und auch der Primer-Bias verzerrt das Gesamtergebnis. Um die gesamte Gruppe der Makrozoobenthos-Lebensgemeinschaft abbilden zu können, werden beim DNA-Metabarcoding degenerierte Primer verwendet, die nicht nur an den Cytochrome-*c*-Oxidase-I-Genabschnitt einer einzigen Art binden können, sondern an den Genabschnitt bei verschiedenen Arten. Dadurch kann es passieren, dass die Primer an die DNA einer Art etwas besser binden als an die DNA anderer Arten, wodurch es zu Verschiebungen zwischen den Abundanz-Verhältnissen der Read-Häufigkeiten kommen kann.

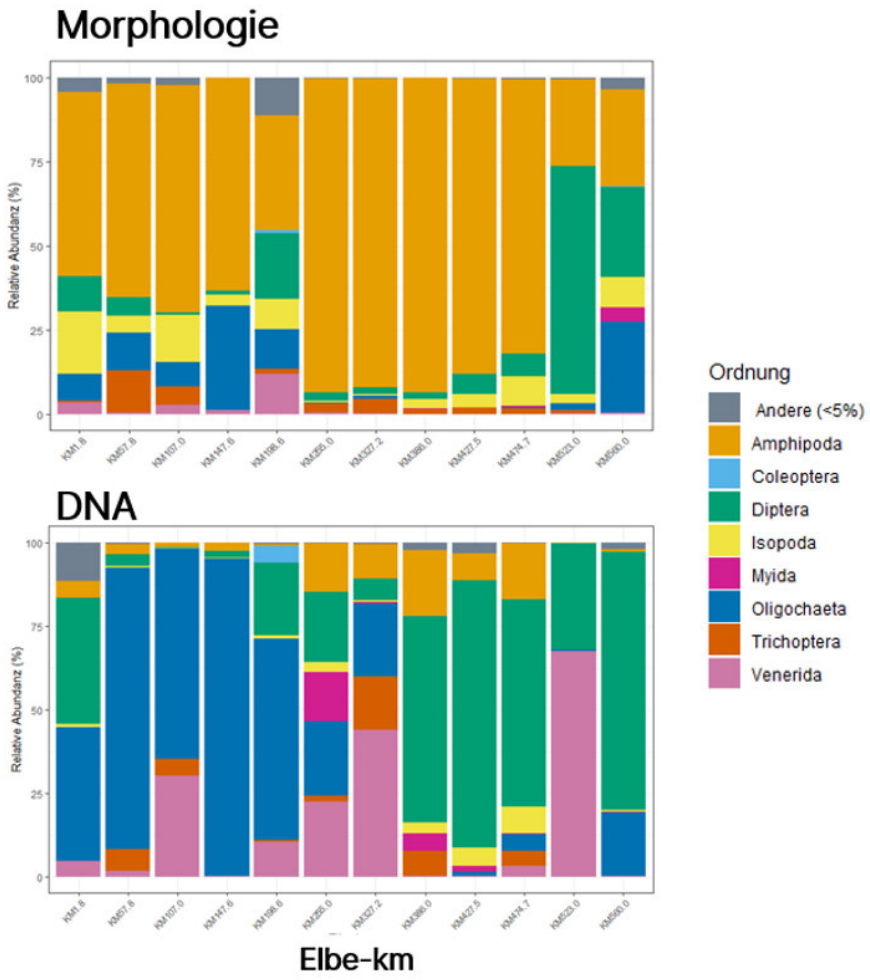


Abbildung 26: Relative Häufigkeiten der Arten in den einzelnen Proben des Elbemonitorings. Oben: Morphologische Bestimmung (Individuenzahl), Unten: genetische Bestimmung (Read-Anzahl).

Der Vergleich der relativen Häufigkeiten der Taxa über die acht häufigsten Gattungen zwischen den beiden Bestimmungsmethoden verdeutlicht diesen Umstand (Abbildung 26). So zeigt sich, dass die relative Abundanz der morphologisch bestimmten Artengemeinschaften bei fast allen Probestellen (Elbe-km 198,6 und km-523,0 ausgenommen) durch die Ordnung der Flohkrebse (Amphipoda) dominiert wird. Die relativen Abundanzen der genetischen Analyse zeigen währenddessen keine Vergleichbarkeit mit den morphologischen Ergebnissen. Von Abundanzvergleichen zwischen den Bestimmungsmethoden sollte daher zum jetzigen Zeitpunkt Abstand genommen werden.

Ein Vergleich innerhalb der einzelnen Methoden dagegen ist sehr sinnvoll, da alle Proben innerhalb derselben Methode den gleichen „Verzerrungen“ unterliegen. So kann beispielsweise eine Verschiebung der Abundanzverhältnisse zwischen den Wenigborstern (Oligochaeta) zu den Zweiflüglern (Diptera) im oberen Elbeverlauf (Elbe-km 1.8 – 198.6) im Verhältnis zum unteren Verlauf (Elbe-km 386.0-560.0) im genetischen Datensatz gut beobachtet werden. Diese Verschiebung ist in den morphologischen Daten ebenfalls angedeutet, aber nicht so deutlich zu sehen, wie in den genetischen Daten aufgrund der hohen Dominanz der Amphipoda.

4.7.3 Die Bewertung des ökologischen Zustandes gemäß Wasserrahmenrichtlinie

Gemäß der Wasserrahmenrichtlinie werden alle Oberflächengewässer in der EU alle 6 Jahre chemisch und ökologisch bewertet. Dabei wird das Ziel verfolgt bis 2027 alle Flüsse, Seen, Grundwasser und Küstengewässer in einen guten ökologischen Zustand zu überführen (vergl. Art 1, EU-WRRL). Anhand der vier biologischen Qualitätskomponenten - Fische, Makrozoobenthos, Makrophyten/Phytobenthos und Phytoplankton - wird der ökologische Zustand, d.h. „die Qualität von Struktur und Funktionsfähigkeit aquatischer, in Verbindung mit Oberflächengewässern stehender Ökosysteme gemäß der Einstufung nach Anhang V“ (vgl. Art. 2 Abs. 21, WRRL) bzw. das ökologische Potential, d.h. „der Zustand eines erheblich veränderten oder künstlichen Wasserkörpers, der nach den einschlägigen Bestimmungen des Anhangs V entsprechend eingestuft wurde“, berechnet (vgl. Art. 2 Abs. 23, WRRL).

Die Elbe zählt dabei als ausgebaute Wasserstraße zu den „erheblich veränderten Wasserkörpern“ (vgl. Art 2, EU-WRRL). Die deutschen Abschnitte innerhalb unserer Längsprobenahme der Elbe werden dabei in zwei Fließgewässertypen eingeteilt: Typ 10 (Kiesgeprägte Ströme) im Oberlauf und Typ 20 (Sandgeprägter Strom) bis nach Hamburg (https://www.gewaesser-bewertung.de/ files/steckbriefe_fliessgewaessertypen_dez2018.pdf).

Das offizielle Tool zur Bewertung der Qualitätskomponente „Makrozoobenthos“ ist das Online-Tool „Perlodes-Online“ (Version 5.0.10). Diese Berechnungen entsprechen den offiziellen, rechtlich geltenden Bewertungsverfahren. Diese Verfahren wurden nach den Vorgaben der Wasserrahmenrichtlinie (Beschluss der EU-Kommission 2018) und denen der Oberflächengewässer-Verordnung von 2016 zwischen den Ländern der EU interkalibriert (https://www.gewaesser-bewertung-berechnung.de/index.php/perlodes-online.html, siehe auch Birk et al. (2018). Für die Bewertung des biologischen Qualitätselements „Makrozoobenthos“ wird für die Fließgewässertypen 10 und 20 dabei der in der BfG entwickelte Potamon-Typie-Index (PTI) verwendet (Schöll et al. 2005). Die Bewertung beruht hierbei auf den gefundenen Taxa, ihrer Abundanz, ihrer Herkunft (einheimisch oder gebietsfremd) und ihrer ökologischen Bedürfnisse. Letztere werden über die operationelle Taxaliste (https://www.gewaesser-bewertung-berechnung.de/files/downloads/perlodes/Operationelle_Taxaliste.xlsx) und den EcoWert zugewiesen.

Die morphologischen Abundanz-Daten sind der Standard der Gewässerbewertung. Zusätzlich zur morphologischen Abundanz, wurde die Bewertung mit morphologischen Präsenz-Absenz-Daten, sowie mit genetischen Sequenzabundanz- und Präsenz-Absenz-Daten durchgeführt (s. Abbildung 27).

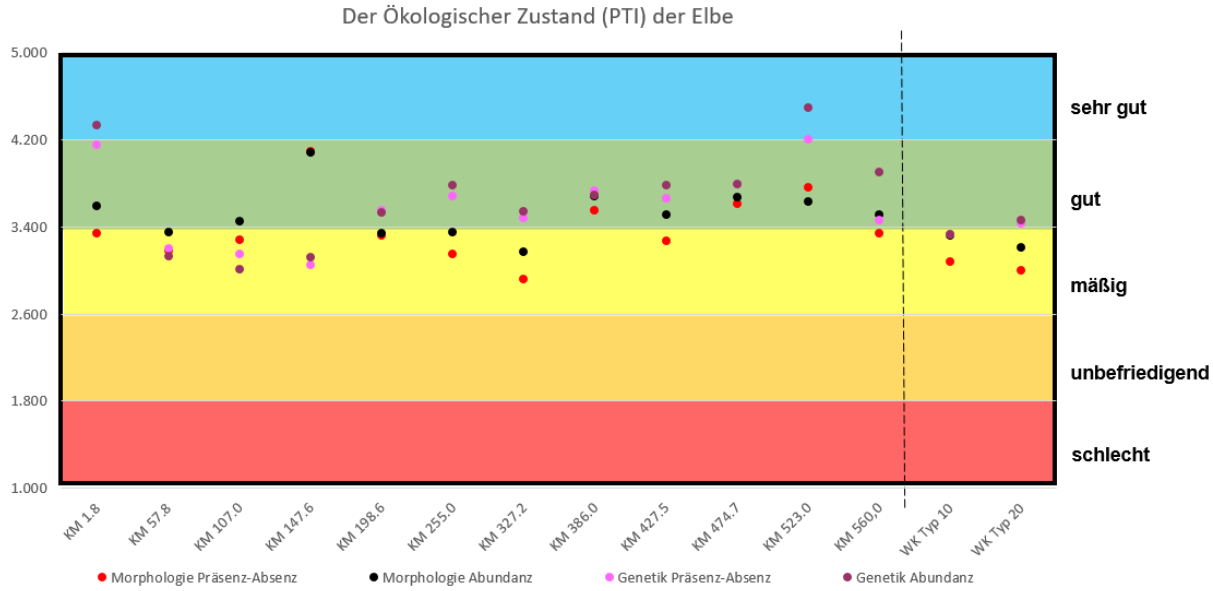


Abbildung 27: Ökologischer Zustand (PTI) der Probestellen in der Mosel, farblich kategorisiert nach der WRRL Anhang V, Abs. 1.4. Für jeden Flusskilometer wurden für die Gewässerbewertung die Beprobungsergebnisse der drei Querprofile zusammengeführt. Für den Wasserkörper Typ10 wurden die Querprofile KM 1,8 und KM 57,8 zusammengefasst, für den Wasserkörper Typ20 KM 107,0 bis KM 560,0.

Für gewöhnlich werden nicht einzelne Probestellen oder Flusskilometer bewertet, daher wurden die Probestellen, die dem Fließgewässertyp 10 zugeordnet werden konnten (Elbe-km 1,8 – 57,8) und die Probestellen, die dem Fließgewässertyp 20 zugeordnet werden konnten (Elbe-km 107,0 – 560,0) nochmal zusammen ausgewertet.

Tabelle 4: Ergebnisse der Gewässerbewertung der Wasserkörper Typ 10 und Typ 20 durch die unterschiedlichen Bewertungsmethoden

Methode		WK Typ 10	WK Typ 20
Morphologie	Präsenz-Absenz	3.080	3.000
	Abundanz	3.319	3.214
Genetik	Präsenz-Absenz	3.333	3.431
	Abundanz	3.33	3.465

Der ermittelte ökologische Zustand liegt überwiegend im „guten“ Bereich. Die Bewertungsergebnisse der genetischen Daten sind zwischen der Analyse über das reine Vorkommen der Taxa (Präsenz-Absenz) und die Sequenz-Abundanzen der Taxa kongruent. Auch die Bewertungen der beiden morphologischen Datensätze zeigen ähnliche Ergebnisse, wobei die Präsenz-Absenz-Werte an den meisten Probestellen eine leicht bessere ökologische Bewertung anzeigen. Ähnliche Ergebnisse sind von Bewertungen an kleineren Fließgewässern aus den Niederlanden und Finnland bereits bekannt (Beentjes et al. 2018; Buchner et al. 2019; Elbrecht et al. 2017) und auch die Bewertung des Rheins mit Proben aus dem Langzeitmonitoring 2020 (Schmidt & Schöll 2021) zeigen ähnliche Ergebnisse. Besonders im Hinblick auf die Gewässerbewertung ganzer Wasserkörper nähern sich die Bewertungsergebnisse sehr an und überlappen zum Teil.

4.7.4 Fazit

Dieses Projekt fokussierte sich auf den Mehrwert der genetischen Artbestimmung und deren Potential zur Integration im behördlichen Monitoring an den Bundeswasserstraßen.

Es konnte gezeigt werden, dass die genetische Artbestimmung ohne großen Mehraufwand zu einer tieferen taxonomischen Auflösung und zu einem vollständigeren Artenspektrum geführt hat. Diese Ergebnisse würden allerdings schwächer ausfallen, wenn auch in der morphotaxonomischen Artbestimmung alle taxonomischen Gruppen genauer analysiert werden würden/könnten.

Die genetische Analyse ermöglicht mit einem einzigen degenerierten Universal-Primerpaar (fwhd) eine sehr hohe Aussagekraft über das Artenspektrum und die Biodiversität in den zu untersuchenden Gewässern. Dies wird sich mit der fortführenden Entwicklung weiterer Universal-Primer und dem Ausbau der Sequenz-Referenzdatenbanken weiter verbessern. Für eine möglichst vollständige Erhebung der im Fließgewässer vorkommenden Makrozoobenthos-Biodiversität über ein einziges Primerpaar sind die hier genutzten fwhd-Primer vollkommen geeignet. Für artspezifische und gruppenspezifischen Fragestellungen können aber auch alternativ andere oder weitere Primer gewählt werden (bspw. artspezifische Primer). Dies ist eine der notwendigen Überlegungen vor Beginn einer Studie.

Es hat sich ebenfalls gezeigt, dass sich die genetische Art-Identifikation prinzipiell für eine standardmäßige Nutzung in der Fließgewässerbewertung eignet, da die genetisch erhobenen Daten im Vergleich zum heutigen Standard der Gewässerbewertung ähnliche Ergebnisse erzielen können.

Die genetische Artbestimmung des Makrozoobenthos ist eine sinnvolle und vielversprechende Ergänzung zur traditionellen morphologischen Taxonomie und sollte daher weiter in der behördlichen Anwendung entwickelt und etabliert werden.

4.8 Untersuchung zur Festlegung der optimalen Porengröße von Filtern für die Anwendung in eDNA Metabarcoding Studien an den Bundeswasserstraßen

4.8.1 Hintergrund & Zweck der Forschung

Das Metabarcoding von Umwelt-DNA (environmental DNA, eDNA) aus Wasserproben stellt eine nicht-invasive Möglichkeit der quantitativen Art-Erfassung dar. Erste Standards hierfür wurden bereits erarbeitet (Bsp. DIN EN 17805:2022-01), wobei u.a. die Begriffe für die Probenahme standardisiert wurden und auf die Gewinnung und Aufbewahrung von eDNA aus Wasserproben eingegangen wird. Einen einheitlichen Standard zur Gestaltung der Probenahme bezüglich Anzahl biologischer Replikate, Lokalisation der Probenahme am Gewässer, Wasservolumen der einzelnen Proben und die Porengröße der Filter für spezifische Zielorganismen und/oder Zielökosysteme gibt es zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht. Dies erschwert die Anwendung für Nicht-Experten, jedoch muss ein allgemeingültiger Leitfaden an die verschiedenen Gewässertypen angepasst sein. Denn eine Bundeswasserstraße hat unterschiedliche Herausforderungen und gewässermorphologische Eigenschaften als beispielsweise ein Gebirgsbach.

Erste Leitfäden für die Probenahme von eDNA an kleinen Gewässern wurden von einzelnen Firmen und Arbeitsgruppen bereits entwickelt (Bsp.: „Leitfaden: eDNA Probenahme“ aus dem Ge-DNA Projekt). Diese lassen sich aber aufgrund der besonderen Herausforderungen der Bundeswasserstraßen nicht direkt übertragen. Im Vergleich zu kleineren Strömen bestehen an den Bundeswasserstraßen besondere Herausforderungen aufgrund der Gewässergröße und hoher Abflussraten sowie einer damit einhergehenden größeren Verdünnung der eDNA Moleküle. Für taxonomische Gruppen, die über die gesamte Wassersäule verteilt vorkommen, wie beispielsweise planktische Diatomeen, stellt dies im Allgemeinen kein Problem dar. Bei mobilen Artengruppen wie Fischen oder Makroinvertebraten treten allerdings Verdünnungseffekte auf, die den eDNA-Nachweis der Zielarten beeinträchtigen können. Ebenso akkumulieren chemische Substanzen und Inhibitoren in größeren Fließgewässern, was den DNA-Extraktionserfolg beeinflussen kann.

Freie und partikelgebundene DNA wird üblicherweise über die Filtration aus Umweltproben isoliert. Die hierfür verwendeten Filtermembranen können aus unterschiedlichen Materialien und Porengrößen bestehen. Häufig werden Nitratcellulose, Glasfaser oder Polyethersulfon (PES) Membranen und je nach Zielartengruppe verschiedene Porengrößen zwischen 0,22 µm bis 5 µm verwendet. Ein einheitlicher Standard für Filtermaterial und Porengröße ist bisher nicht festgelegt. Wissenschaftliche Studien zur Effizienz und DNA-Gewinnung der Filtermembranmaterialien wurden bereits mehrfach durchgeführt (Capo et al. 2020; Deiner et al. 2018). Auch Tests zur Wahl der richtigen Porengröße werden schon länger diskutiert, so gehen Turner et al. (2014) davon aus, dass die abundanteste eDNA Partikelgröße zwischen 1 und 10 µm liegt und daher eine Porengröße von 1 µm ausreicht. Hunter et al. (2019) halten 1,2 µm Porengrößen für ausreichend, da die meiste eDNA im Fließgewässer zellgebunden vorliegt. Li et al. (2018) beobachteten nur eine minimal bessere eDNA Retention der 0,45 µm Filter im Vergleich zu 0,8 µm Filtern, maßen aber gleichzeitig eine signifikant längere Filtrationsdauer. Aus diesem Grund wurde in der Studie eine Porengröße von 0,8 µm für trübe, eutrophe Seen empfohlen.

In Europa werden für die Detektion von Makroinvertebraten-Gemeinschaften bevorzugt Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet, für Fisch-Studien eine Porengröße von 0,8 µm. In den USA werden Porengrößen bis zu 5 µm verwendet. Kleinere Porengrößen verstopfen schneller, während bei größeren Porengrößen befürchtet wird, dass nicht die komplette eDNA aufgefangen wird.

Während der Filtration verschließen sich die Poren zunehmend durch wassergebundene Partikelstücke und eDNA, die im Filter hängen bleiben. Ab einem gewissen Punkt (je nach Trübung und Schwebstoffgehalt im Gewässer) verstopft der Filter komplett und eine Weiterfiltration ist mit dem vorhandenen Filter

nicht mehr möglich. Ist die Zielwassermenge zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht erreicht, muss ein weiterer Filter verwendet werden. Die Filtrationsdauer erhöht sich ebenfalls mit dem Zusetzen des Filters, ein Faktor der für eine Probenahme mit Vor-Ort-Filtration von wesentlicher Bedeutung ist.

In diesem Projekt sollte eruiert werden, ob die Verwendung von 0,45 µm Filtern für die Erhebung der Makrozoobenthos-Lebensgemeinschaften in den Bundeswasserstraßen zielführend ist. Ebenfalls sollten die selbstkonservierenden Filter des Herstellers Smith-Root (www.smith-root.com) im Hinblick auf die eDNA-Konservierung mit Filtern verglichen werden, die wie meist üblich in 96%igem Ethanol fixiert wurden.

4.8.2 Untersuchungsgebiet und Probenahme

Die Probenahmen wurden im Frühjahr und Herbst 2021 an der Mosel an einem öffentlichen Anleger zwischen dem Wassersportverein Koblenz Metternich e.V. und der Kurt-Schumacher-Brücke in Koblenz (Koordinaten: 50.357187, 7.559562) durchgeführt.

Nicht alle DNA ist zu jeder Zeit an jedem Ort vorhanden. Dies kann sich auf die einzelnen Proben auswirken, und es kann zu Unterschieden in der Erfassung der Artengemeinschaften zwischen zwei Proben kommen. Durch die Strömung an den Bundeswasserstraßen und die damit einhergehende dauerhafte Vermischung der Partikel, wird dieses Problem abgeschwächt. Um aber mögliche Effekte auf die DNA-Konzentration und die detektierte Artengemeinschaft auszuschließen, wurde einmalig eine zuvor gereinigte und dekontaminierte (4% Chlorbleiche) Wanne (Fassungsvermögen ~150 Liter) mit Moselwasser mittels Schöpfprobe befüllt. Für jede einzelne Probe wurde vor Beginn der Filtration das Wasser der Wanne vermischt, um ein Absinken der Partikel in der Wanne zu verhindern und eine homogene DNA-Verteilung für die einzelnen Proben zu gewährleisten.

Es wurden Filtermembranen aus Polyethersulfon (PES) mit den Porengrößen 0,45 µm, 0,8 µm, 1,2 µm und 5 µm der Firma Smith-Root verwendet. Einmal in Form der „normalen“ Filter, die noch konserviert werden müssen und einmal in Form der selbstkonservierenden Filter (Amesbury et al. 2017; Thomas et al. 2018).

Ebenso wurden die zu filtrierenden Wasservolumina getestet. Hierfür wurden entweder 1 Liter (übliches Volumen) oder 3 Liter pro Replikat genommen. Laut Herstellerangaben werden 10 L pro Filter als maximale Filtrationsmenge empfohlen, allerdings musste das Volumen aufgrund der hohen Schwebstoffbelastung in der Mosel an den Probetagen auf 3 L angepasst werden. Pro Probenahme, Wassermenge und Filtertyp wurden jeweils zwei Replikate genommen. Das Probenahme-Design ist in Abbildung 28 dargestellt.

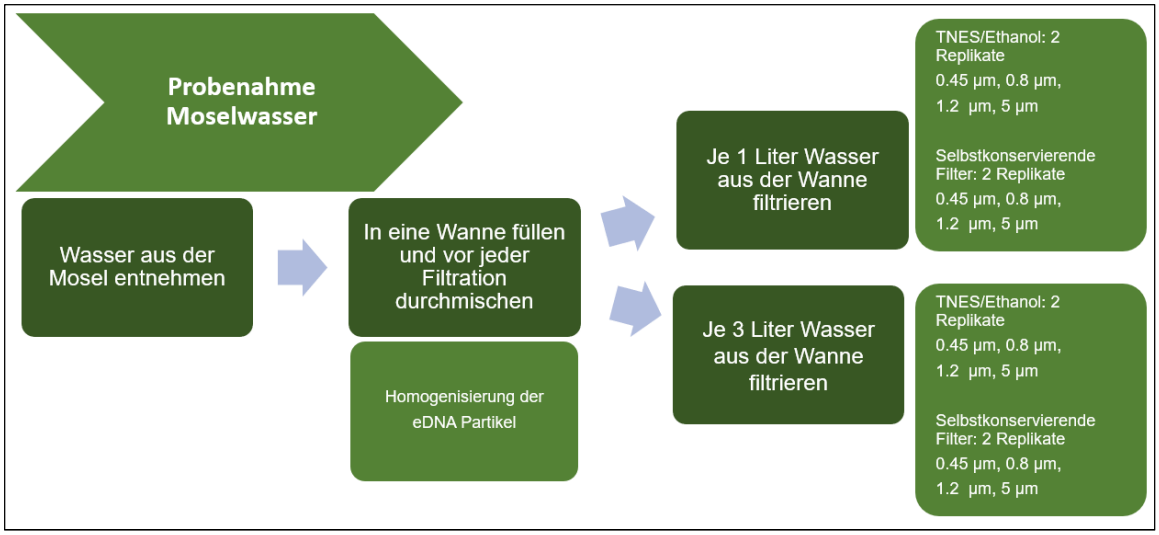


Abbildung 28: Probenahme-Design des Porengrößen- und Wassermengen-Tests.

Die „normalen“ Filter wurden nach Abschluss der Filtration aus ihrem Filtergehäuse (s. Abbildung 29) entnommen und in einem 2 ml Eppendorf Tube in 96% analytischen Alkohol (unvergällt) konserviert. Im Anschluss an die Probenahme wurden sie bei -80°C bis zur DNA Extraktion gelagert. Die selbst-konservierenden Filter sollen es ermöglichen die DNA bei Raumtemperatur zu konservieren. Aufgrund der längeren Lagerzeit wurden sie bis zur Extraktion bei 8 - 10°C in einer dunklen Kühlkammer gelagert.

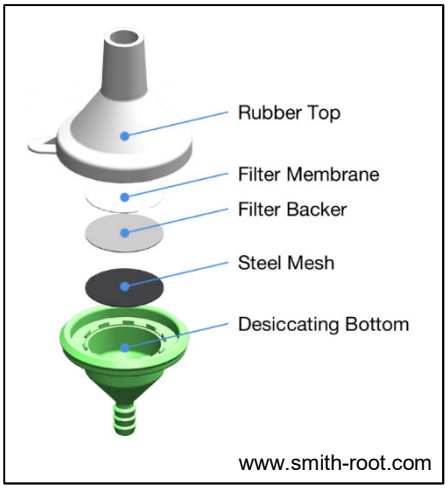


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Filter und Filtergehäuse.

4.8.3 Auswertung und weiterführende Analysen

Es zeichnet sich bei einer ersten Analyse der Filtrationsdauer ab, dass eine Porengröße von 0,45 µm im Vergleich mit den anderen verwenden Porengrößen (0,8 – 5 µm) eine deutlich längere Filtrationsdauer (1 – 5 min) benötigt. Die anderen Porengrößen zeigen hingegen vergleichbare Zeitspannen von 1 – 2 Minuten (s. Abbildung 30).

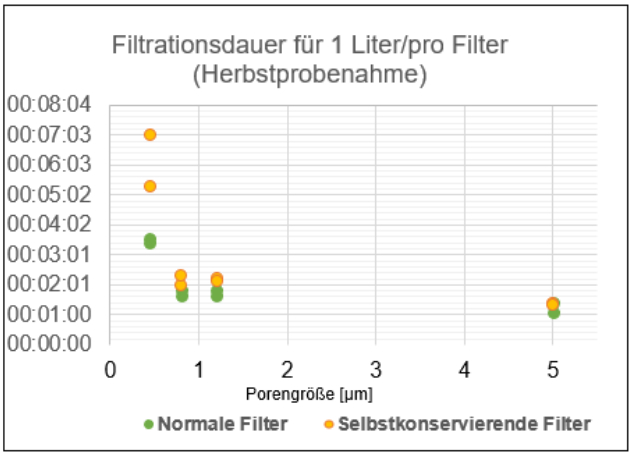


Abbildung 30: Vergleich der Filtrationsdauern für 1 Liter/pro Filter.

Auffällig war, dass die selbstkonservierenden Filter eine leichte chemische Reaktion mit dem Moselwasser einzugehen scheinen, wodurch es bei der Filtration zu Luftbläschen im Schlauch des Pumpsystems gekommen ist. Dies hat das Abmessen des Wasservolumens durch die Pumpe selber negativ beeinflusst. Daher wurde das durch das Pumpsystem gelaufene Wasser ebenfalls über einen Messzylinder aufgefangen und abgemessen.

In den nachfolgenden Schritten wurden alle Proben gleichbehandelt. Die eDNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin eDNA Water Mini Kit isoliert und aufgereinigt. Dies erfolgte im Frühjahr 2022.

Erste Analysen zeigten eine höhere DNA-Gewinnung durch die „normalen“ in Ethanol konservierten Filter (s. Abbildung 31). Die längere Lagerzeit der Filter scheint keinen negativen Einfluss auf die gewonnenen DNA-Konzentrationen aus den Frühjahrsproben zu haben.

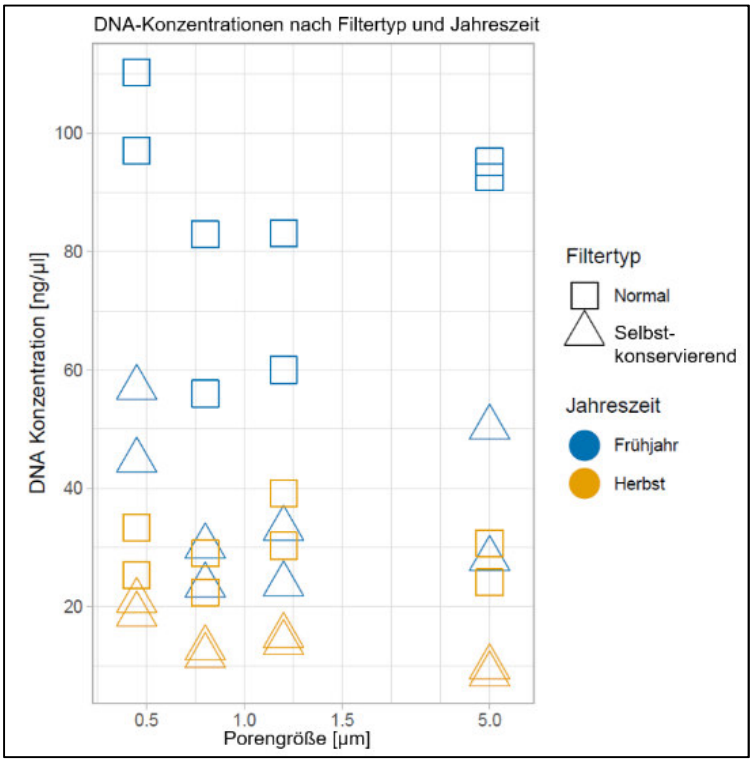


Abbildung 31: DNA-Konzentration [ng/µl] der unterschiedlichen Porengrößen 0,45 µm, 0,8 µm, 1,2 µm und 5 µm nach Filtertyp und Jahreszeit

Weitere Analysen der Artengemeinschaften über das eDNA Metabarcoding erfolgen bis Ende 2024. Dabei steht die Frage im Vordergrund, ob es durch die unterschiedlichen Porengrößen zu Verschiebungen innerhalb der Artengemeinschaften gekommen ist.

4.9 Weitere Forschungsfragen im Themenbereich Makrozoobenthos und Fische

4.9.1 Vergleich eDNA Metabarcoding und morphologisches Monitoring am Mittelrhein 2022

4.9.1.1 Hintergrund & Zweck der Forschung

Seit 1986 führt die BfG am schiffbaren Rhein zwischen Basel und Emmerich ein Langzeitmonitoring des Makrozoobenthos durch. Dies wurde bis 2015 jährlich und seit 2016 alle 2 Jahre durchgeführt. Die Probenahme findet im Frühsommer statt und umfasst ca. 180 Proben pro Jahr. Dabei werden alle 20 Fluss-km 5 Querprofil-Proben (Ufer links, halb links, Strommitte, halb rechts, Ufer rechts) genommen.

In diesem Teilprojekt soll eruiert werden, in welchem Umfang eine Unterstützung des Monitorings mit der Methode des eDNA Metabarcodings in Zukunft möglich und sinnvoll sein wird. Zudem soll analysiert werden, welche Wasservolumina bei einem großen Wasserkörper wie dem Rhein notwendig sind, um das vorhandene Artenspektrum widerzuspiegeln. Hierfür werden pro Probestelle 5 Replikate mit je 1,5 Liter Wasser genommen und mittels Arten-Akkumulationskurven ausgewertet.

4.9.1.2 Untersuchungsgebiet und Probenahme

Die eDNA Probenahme erfolgte in derselben Maiwoche 2022 wie die Probenahme des Langzeitmonitorings des Rheins, um eine maximale Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten. Es wurden an 4 Probestellen am Mittelrhein vom Ufer aus eDNA Proben mittels eDNA Sampler der Firma Smith-Root genommen.

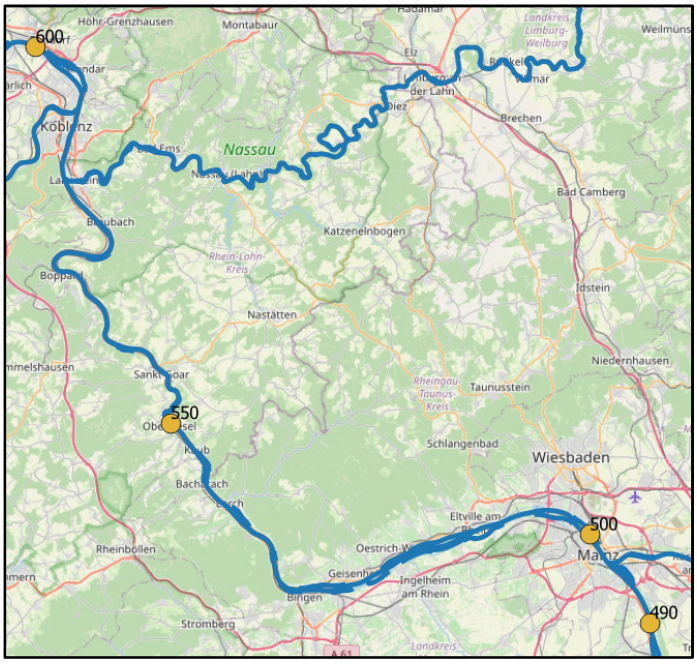


Abbildung 32: Karte der eDNA Probenahmestellen im Rhein (Rhein-km 490 vor dem Zusammenfluss von Rhein und Main, Rhein-km 500 in Mainz, Rhein-km 550 bei Kaub und Rhein-km 600 bei Engers/Kaltenengers).

Pro Probestelle wurden sowohl vom linken als auch vom rechten Ufer Proben genommen. So wurden für jeden der vier Flusskilometer je 5 biologische Replikate á 1,5 Liter vom linken und vom rechten Ufer genommen (40 Proben insgesamt).

Für die Probenahme wurden Filter der Porengröße 0,8 µm verwendet. Die Filtration wurde vom Ufer aus mit der Teleskopstange des eDNA Samplers von Smith Root durchgeführt. Dabei wurde Wasser je nach Uferbeschaffenheit (Schiffsanleger bei Engers, Steinschüttung bei Kaub) in 2 Meter Entfernung zum Ufer filtriert. Die Filter wurden im Anschluss in 2 ml Eppendorf Tubes in 96% analytischem Alkohol (unvergällt) konserviert.

Es wurde eine Feldnegative pro Flusskilometer (4 Feldnegative insgesamt) erhoben. Hierfür wurde für 30 Sekunden Umgebungsluft durch den Filter gezogen. Die Feldnegative wurden ebenfalls in 96% Ethanol konserviert und wurden im weiteren Verlauf der Analysen identisch zu den Proben bearbeitet.

Die eDNA Proben wurden mit dem COI Primer-Set fwhF2/fwhR2n (Vamos et al. 2017) für die Analyse der Makroinvertebraten-Lebensgemeinschaften amplifiziert.

Nach der Sequenzierung und der bioinformatischen Aufbereitung der Proben sollen die Artengemeinschaften der eDNA Proben mit den morphologischen Ergebnissen der parallel stattgefundenen Probenahme des Rhein-Monitorings verglichen werden. Ebenfalls wird analysiert, wie viele Liter, bzw. Replikate notwendig sind, um das Artenspektrum des Rheins widerzuspiegeln. Die Auswertung erfolgt bis Ende 2024.

4.9.2 Neobiota-Verbreitung Lahn & Nahe 2022

4.9.2.1 Hintergrund & Zweck der Forschung

Die pontokaspischen Grundeln Schwarzmundgrundel (*Neogobius melanostomus*), Flussgrundel (*Neogobius fluviatilis*), Marmorierte Grundel (*Proterorhinus marmoratus*) und Kesslergrundel (*Neogobius kessleri*) sind seit der Öffnung des Main-Donau-Kanals (MDK) im Jahr 1992 zunehmend in das Rheinsystem eingewandert (IKSR 2013). Die pontokaspischen Grundeln sind als invasiv eingestuft worden (BfN-Skripten 2015), werden aber auf der Liste der invasiven gebietsfremden Arten von unionsweiter Bedeutung (Unionsliste) nach Verordnung (EU) Nr.1143/2014 über die Prävention und das Management der Einbringung und Ausbreitung invasiver gebietsfremder Arten (BfN-Skripten 2023) nicht geführt, da sie aus dem EU-Inland stammen. In unseren heimischen Ökosystemen konkurrieren sie mit anderen benthischen Fischarten, wie z.B. den Groppen, um Lebensraum und Nahrung. Es gibt momentan keine effektive Möglichkeit der Bekämpfung der gebietsfremden Grundelarten im Binnenbereich.

Heute sind die Grundeln im Rheinsystem bis in die Schweiz bei Basel zu finden und flussabwärts bis in die Niederlande nachgewiesen. Dass sie mittlerweile die Zuflüsse des Rheins besiedeln ist ebenfalls bekannt und nachgewiesen (Daten Rheinland-Pfalz und Hessen). Wie hoch die Grundeln die Zuflüsse aber besiedeln, ist zum Teil noch nicht bekannt. Im Rahmen der Erprobung der genetischen Methode des eDNA Metabarcodings als Frühwarnsystem für invasive Arten, soll diese Frage für das Lahnsystem in Hessen und Rheinlandpfalz sowie das Nahesystem in Rheinlandpfalz beantwortet werden. Die Länder Hessen und Rheinlandpfalz haben Fundstellen der Schwarzmundgrundel in den beiden Flusssystemen zur Verfügung gestellt. Diese Gewässerabschnitte und die dortigen Probestellen können somit als Positivkontrolle verwendet werden.

4.9.2.2 Untersuchungsgebiet und Probenahme

Die Probenahme hat in den Monaten April und Mai 2022 stattgefunden, da diese die Laichmonate der meisten einheimischen Fische und der pontokaspischen Grundeln darstellen. Bei Fisch-Analysen über Umwelt-DNA ist es sinnvoll, solche Aktivitätspeaks der Arten zu nutzen, weil die Konzentration, der in die Umwelt (Wasser) abgegebenen DNA am höchsten ist und dies die Detektionsrate begünstigt. In der Lahn wurde die Ausbreitung der pontokaspischen Grundeln in den letzten Jahren eng verfolgt, dabei haben einige der Schleusen kurzzeitig als Ausbreitungsbarrieren gedient, wurden dann aber doch überwunden. Für das Nahegebiet gibt es Funde bei Gensingen aus dem Jahr 2021.

Die Probestellen liegen sowohl in der Lahn und der Nahe, als auch in den größten Zuflüssen, wie dem Gelbach und der Aar an der Lahn und der Alsenz an der Nahe. Dabei wurden die Probestellen einige Flusskilometer oberhalb des Zusammenflusses gelegt, um eine höhere Aussagekraft über die Besiedlung der Zuflüsse zu erlangen (s. Abbildung 33).

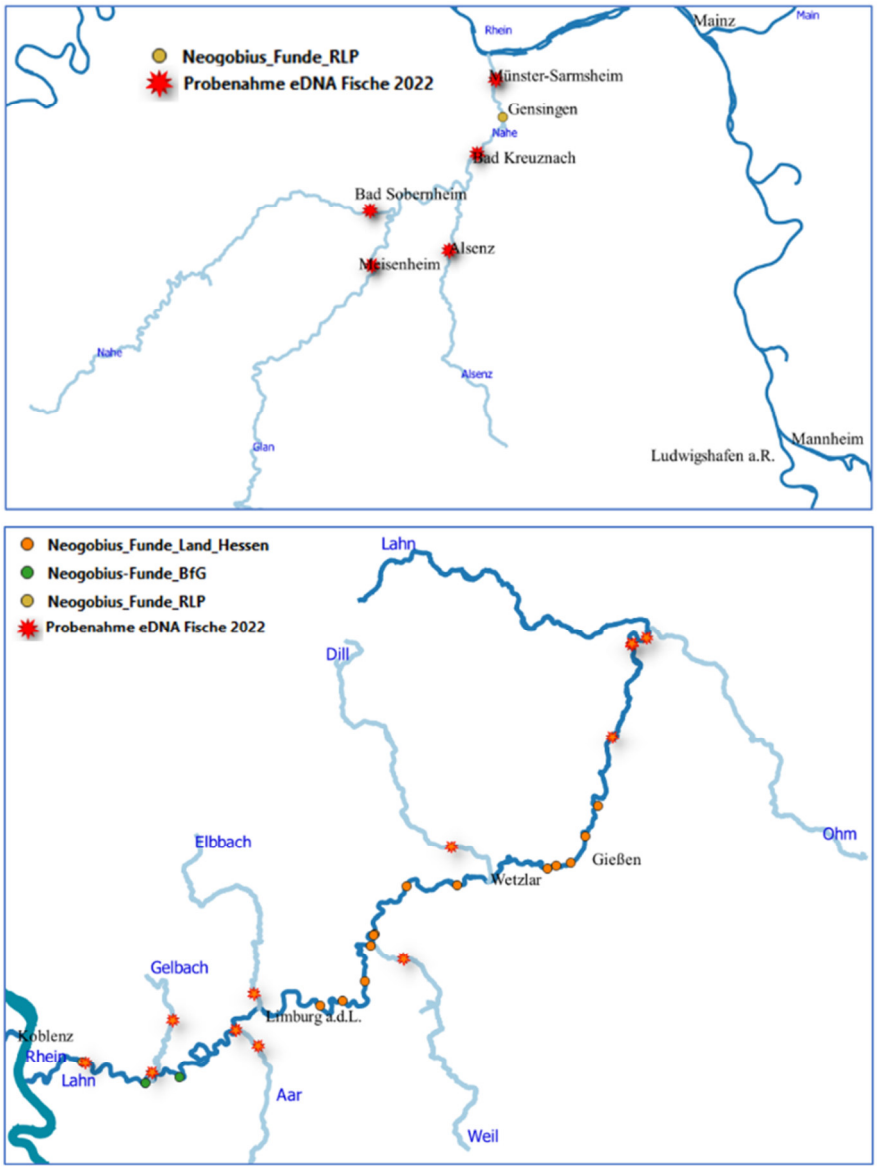


Abbildung 33: Karten der Probenahmestellen im Nahesystem (oben) und im Lahnsystem (unten).

Bei den Probenahmen im April und Mai wurden jeweils pro Probestelle 2 Replikate á 3 Liter Wasser durch Filter mit einer Porengröße von 0,8 µm filtriert. Pro Probenahme-Tag wurde ebenfalls eine negative Feldkontrolle genommen. Aufgrund eines Materialdefekts einer Filter-Charge mussten die Mai-Proben an der Nahe zunächst mit einem gesäuberten und dekontaminierten 5L-Kanister (4% Chlorbleiche) genommen und weggefroren werden. Nach Erhalt der Ersatzfilter wurden diese über Nacht aufgetaut und im Labor der BfG filtriert.

Die Fischarten-Gemeinschaft wird mit dem Primerset Tele02 (Taberlet et al. 2018) ausgewertet. Die Auswertung der Proben ist bis Ende 2024 in Planung und soll im Zuge des Expertennetzwerkes des BMDV veröffentlicht werden.

4.9.3 Genetische Untersuchungen am Hafen Duisburg und Hafen Frankfurt am Main: Häfen als Eintragspforte von Neobiota und Nutzung genetischer Untersuchungen zur Früherkennung 2021 & 2023

4.9.3.1 Hintergrund & Zweck der Forschung

Neobiota sind Tier- (Neozoen) und Pflanzenarten (Neophyten), die natürlicherweise nicht in einem Gebiet vorkommen, sondern sich dort nach 1492 (Entdeckung Amerikas und „Beginn“ des globalen Handels) durch den Einfluss des Menschen etabliert haben (BfN-Skripten 2005). Haben diese Neobiota negative Auswirkungen auf die heimische Biodiversität, die menschliche Gesundheit oder die Wirtschaft, werden sie als invasive gebietsfremde Arten (invasive alien species = IAS) bezeichnet (siehe https://neobiota.bfn.de).

Einige Faktoren, die zur Ausbreitung in aquatischen Systemen führen, sind aber noch nicht abschließend verstanden. Dies betrifft unter anderem die Verbreitungswege über die Binnenwasserstraßen, Schifffahrtskanäle und die Rahmenbedingungen für den Ansiedlungserfolg in Häfen.

Zwei Ausbreitungswege stehen in aquatischen Ökosystemen derzeit im Fokus, der Biofouling-Bewuchs und die Verschleppung über Ballastwasser.

Während für die Hochseeschifffahrt diese Gefährdungspotentiale erkannt und Präventionsmaßnahmen rechtlich verankert wurden (IMO Ballastwasserübereinkommen), gibt es in der Binnenschifffahrt zum jetzigen Zeitpunkt noch keine derartigen Untersuchungen und rechtlichen Regelungen. Spätestens mit dem Bau von Wasserscheidenkanälen, wie dem Mittellandkanal (1915/1938) oder dem Main-Donau-Kanal (1992), die zwei zuvor getrennte Flusssysteme miteinander verbinden, muss allerdings davon ausgegangen werden, dass es durch Biofouling und Ballastwasser von Schiffen zur Verschleppung und Etablierung gebietsfremder Arten kommen kann (Brinklow et al. 2022; Hewitt & Campbell 2010; Ulman et al. 2019).

In diesem Teilprojekt soll die Evaluierung der potentiellen Verbreitung von Neobiota und invasiven Arten über die kommerzielle Binnenschifffahrt sowohl morphologisch, als auch genetisch (durch (e)DNA Metabarcoding) in deutschen Binnenhäfen untersucht werden. Hierzu werden verschiedene taxonomische Gruppen sowohl morphologisch als auch genetisch ((e)DNA Metabarcoding) in deutschen Binnenhäfen untersucht. Ebenfalls soll festgestellt werden, ob ein praktikables Untersuchungskonzept basierend auf den „Joint HELCOM/OSPAR GUIDELINES“ von Hochseehäfen für die Binnenschifffahrt erarbeitet werden kann und in welchem Umfang molekularbiologische (genetische) Methoden für die Detektion und das Monitoring von gebietsfremden Arten geeignet sind.

4.9.3.2 Untersuchungsgebiet und Probenahme

Hafen Duisburg 2021

Die Probenahme erfolgte im Juli 2021 mit der Unterstützung des WSA Rhein. Es wurden der Rhein vor der Hafeneinfahrt, im Hafenkanal, bis zur Schleuse der Ruhr, und den Becken A bis C (Abbildung 34) beprobt. Hier wurden in Anlehnung an das HELCOM-Protokoll zur Beprobung von Hochseehäfen (Joint Harmonised Procedure for the Contracting Parties of HELCOM and OSPAR on the granting of exemptions under International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments, Regulation A-4) Proben von den taxonomischen Gruppen Phytobenthos, Zooplankton, benthischen Makroinvertebraten und Umwelt-DNA (Phytoplankton, benthische Makro-invertebraten und Fische) genommen.

Es wurden 25 Makrozoobenthos-Proben erhoben nach den Protokollen der BfG (Tittizer & Schleuter 1986). Für die eDNA Proben zur Analyse des Makrozoobenthos und der Fische wurden 17 eDNA Proben genommen, verteilt auf 7 Probestellen und ein Transekt. Für die eDNA Probenahme des Phytoplanktons wurden 12 Proben an 6 Probestellen filtriert. Für die 6 Zooplankton-Proben wurden je 50 Liter des Hafenwassers durch ein Zooplanktonnetz gegeben und die resultierende Schöpfprobe wurde konserviert.

Der Bericht zum Duisburger Hafen soll im Laufe des Jahres 2024 veröffentlicht werden. Die genauen Probenahme- und Laborprotokolle werden dort hinterlegt.

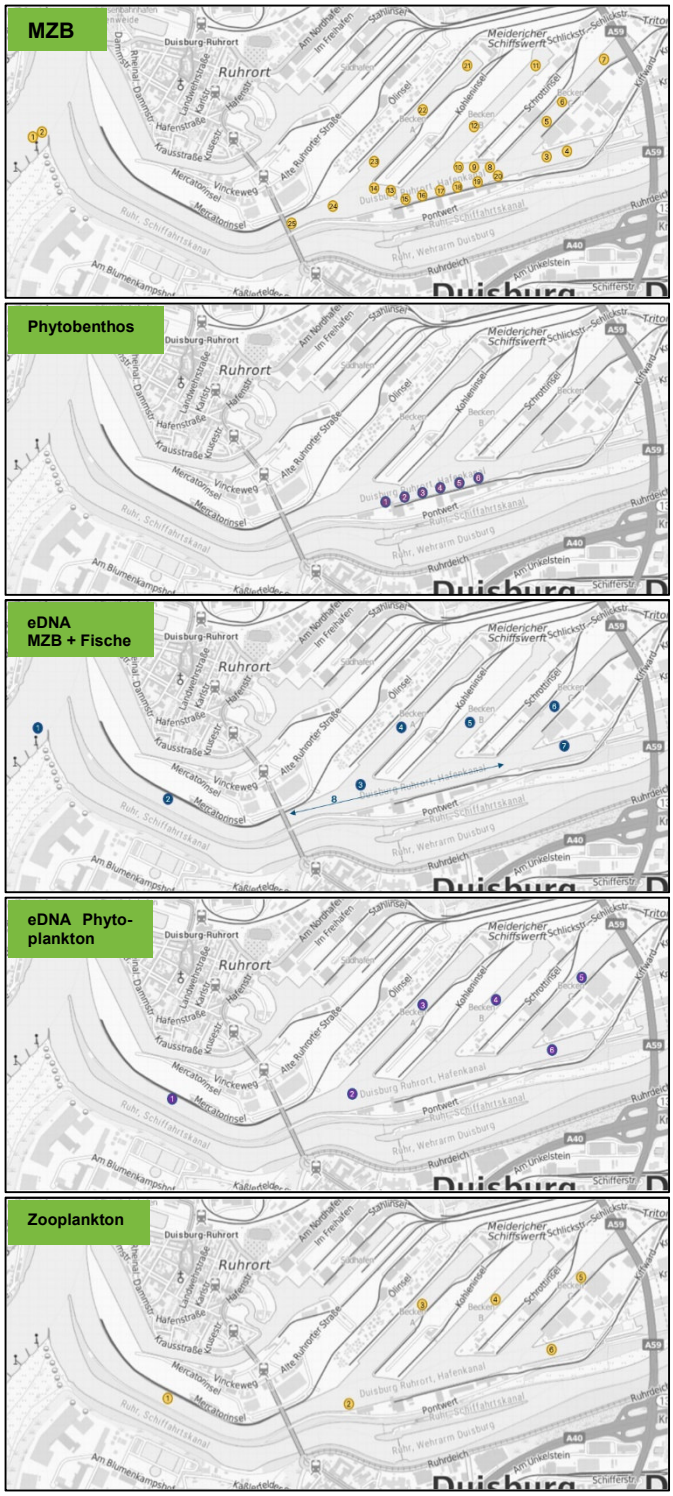


Abbildung 34: Probenahmestellen für verschiedene BQEs im Duisburger Hafen.

Hafen Frankfurt am Main 2023

Die Beprobung des Frankfurter Osthafen erfolgte am 11. und 12. Juli 2023 von Bord eines Arbeitsschiffes des Wasserstraßen- und Schifffahrtsamtes Main, Außenbezirk Frankfurt in Absprache mit der WSA Offenbach. Hier wurden sowohl im Main vor und hinter der Schleuse Offenbach, sowie in den Hafenbecken des Osthafen I und des Osthafen II Proben genommen.

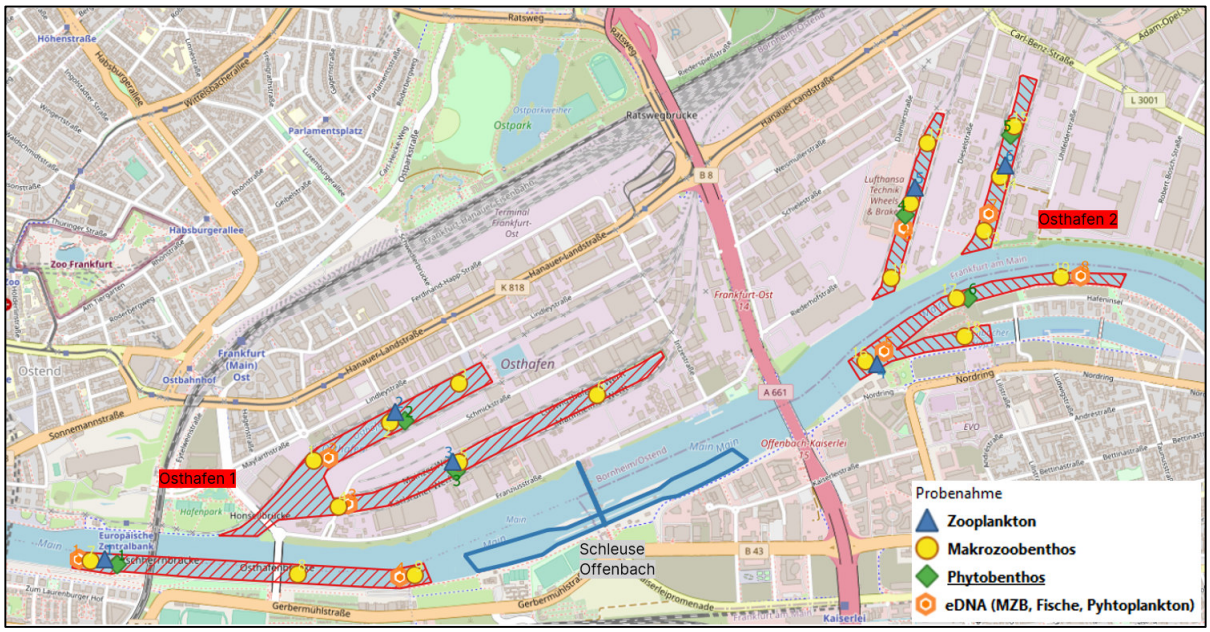


Abbildung 35: Probenahme-Design Hafen Frankfurt 2023

Im Fokus der Untersuchungen stehen auch hier die Organismengruppen Phytoplankton, Phytobenthos, Zooplankton, Makroinvertebraten und Fische, für die in Anlehnung an die Probenahme des Hafen Duisburg organismische Proben (Mischproben für das Makrozoobenthos, Kratzproben für das Phytobenthos und Schöpfproben fürs Zooplankton), sowie Umwelt-DNA (eDNA für die Makroinvertebraten, die Fische und das Phytoplankton) genommen wurden. Die Probenmenge betrug insgesamt 59 Proben (8 Phytoplankton, 6 Phytobenthos, 6 Zooplankton, 19 Makrozoobenthos und 20 eDNA).

Das Zooplankton wurde mittels Schöpfproben (je 100 L) und einem Zooplanktonnetz mit 55 µm Maschengröße genommen. Das Phytobenthos wurde durch Kratzproben von Schüttsteinen auf einer Fläche von je circa 13,2 cm² beprobt und die Proben des Phytoplanktons und die der Umwelt-DNA wurden mittels des Smith-Root eDNA-Sampler (Abbildung 29) genommen.

Die Probenahme des Makrozoobenthos wurde über einen Hydraulikbagger mit Zweischalengreifer von Bord des Arbeitsschiffes durchgeführt. Sohlenbereiche unterschiedlicher Substratbeschaffenheit wurden an Deck gehoben und dort auf ihre Besiedlung des Makrozoobenthos untersucht (Turner et al. 2014).

Die Proben des Makrozoobenthos wurden direkt nach der Entnahme des Sohlsubstrates aufgearbeitet und die festsitzenden Organismen wie bspw. Dreikantmuscheln und Schwämme direkt vom Substrat gelöst und in das Probengefäß überführt. Die Häufigkeit bzw. der Deckungsgrad wurden protokolliert. Anschließend wurden größere Steine in einem wassergefüllten Behälter mit einer weichen Bürste abgebürstet und das so gewonnene suspendierte Material wurde anschließend zusammen mit dem feinkörnigen Sediment in Sieben mit 500 µm Maschenweite durch mehrmaliges Waschen von Trübstoffen befreit.

Die Proben des Phytobenthos sowie eDNA-Proben wurden direkt nach der Probenahme in 50 ml Falcontubes (Phytobenthos), bzw. in 5 ml Eppendorfgefäßen (eDNA-Filter) eingefroren. Alle anderen Proben wurden in 96 % vergällten Ethanol in PVC Weithalsbehältern oder in 50 ml Falcontubes konserviert. Phytoplankton, Zooplankton, Phytobenthos und eDNA-Proben wurden direkt zur genetischen Analyse in das DNA-Labor der Bundesanstalt für Gewässerkunde transferiert.

Die Ergebnisse des Teilprojektes „Hafen Frankfurt“ werden im Produkt P202.2.13 "Rolle von Häfen für Eintrag und Verbreitung im Binnenbereich - Erkenntnisse ExpNw Phase 2.1 und 2.2" abschließend bis Ende 2024 verschriftlicht.

5 Schlussfolgerungen

5.1 Deutsch

Das Projekt BIO-eDNA hat verdeutlicht, wie der Kompetenz- und Infrastrukturaufbau für ein neues und innovatives Themengebiet an der BfG erfolgreich gelingen kann.

Zu Beginn des Projektes wurde der Aufbau des molekularbiologischen Labors in U2 abgeschlossen, wodurch eine umfangreiche Bearbeitung aller technischen und ökologischen Fragestellungen des Projektes ermöglicht wurde. Im Verlaufe des Projektzeitraums kam es zwar zu teils größeren Verzögerungen sowohl bei der Vergabe von Sequenzierdienstleistungen als auch der Lieferung von Sequenzierdaten, und auch die beiden Projektmitarbeitenden haben das Projekt frühzeitig verlassen. Dennoch konnten durch das Projekt zahlreiche Forschungsfragen bearbeitet, Themen initiiert, Protokolle etabliert und Kooperationen aufgebaut werden, die den Grundstein für zukünftige Forschungsprojekte und Anwendungsfälle der Methodik in der BfG gelegt haben.

Die BfG kann nun eigenständig und auf dem neuesten Stand der Wissenschaft verschiedenste ökologische Fragestellungen mit molekularbiologischen Methoden bearbeiten und damit sowohl ihr Methoden-Portfolio in der Forschung, als auch ihre Beratungsleistung erweitern und verbessern. Die BfG wird nun als Akteur in der molekularbiologischen Gewässerbewertung wahrgenommen. Die Vernetzung mit der Universität Duisburg Essen war überaus erfolgreich und hat zu Nachfolgeprojekten geführt, die bereits in Planung sind. Anderen Bundes- und Landesbehörden stehen wir als Ansprechpartner für bestimmte Fragestellungen zur Verfügung (Bsp. *Prymnesium*-Blüte). Über den DIN AK "Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung" ist die BfG an der Fortführung von Handlungsanweisungen auf nationaler und europäischer Ebene beteiligt. Im Rahmen des Projektes wurden zudem BfG-interne Protokolle und Routinen entwickelt, die es dem Labor- und Projektpersonal ermöglichen, die Arbeiten fortzusetzen (bspw. im Rahmen der *Prymnesium*-Monitoringkampagne LAWA, der Unterstützung des IKSR-Monitorings sowie des TG02-Projekts DigiTax und des BMDV-Expertennetzwerks). Die gewonnenen Kompetenzen werden folglich auf verschiedenen Ebenen weitergenutzt.

Neben den zuvor genannten Erfolgen wurde im Projekt aber auch deutlich, dass bis zu einer Bewertung der Bundeswasserstraßen gemäß den Vorgaben der EU-Wasserrahmenrichtlinie anhand von genetischen Daten, insbesondere im Hinblick auf Phytoplankton, Phytobenthos und Fische, noch einige wichtige Schritte erforderlich sind. Das Projekt hat Defizite aufgezeigt, die Gegenstand zukünftiger Forschungsaktivitäten sein sollten. So wird empfohlen, für alle BQEs kurierte Datenbanken anzulegen. Für Fische und Makrozoobenthos sind derartige Datenbanken derzeit in Bearbeitung (Projekt „dbDNA“, UBA / Universität Duisburg Essen). Für das deutlich artenreichere Phytoplankton und Phytobenthos bleibt dies jedoch eine Herausforderung. Dennoch sollten auch für diese BQEs nicht nur harmonisierte Taxalisten für einen besseren Vergleich von morphologischen und DNA-basierten Artenlisten erstellt werden, sondern ebenfalls auf Basis der Bundestaxaliste möglichst umfängliche Referenzdatenbanken aufgebaut werden, in denen qualitätsgesicherte genetische Sequenzen der einschlägigen Genregionen hinterlegt sind.

Das Projekt und der generelle Kompetenzaufbau in der BfG profitierte auch von der Einstellung von festen wissenschaftlichen Stellen außerhalb des Projektes, die einschlägige Erfahrungen auf diesem Gebiet mitbrachten und zum Erhalt jener im Projekt erarbeiteten Kompetenzen über das Ende des Projektzeitraums hinaus beitrugen. Auf lange Sicht wird eine dauerhafte Stelle für molekularbiologische Arbeiten im Referat U4 für die BQEs Makrozoobenthos und Fische, sowie eine Verstetigung des

technisches Personal im molekularbiologischen Labor zum Erhalt der Kompetenz und zur Weiterführung molekularbiologischer Arbeiten als notwendig erachtet.

5.2 Englisch

The BIO-eDNA project has demonstrated the successful development of expertise and infrastructure for a novel and innovative subject area at the BfG.

The establishment of the molecular biology laboratory in the department U2 was completed during the start of the project, thus enabling the project team to address all technical and ecological objectives in a comprehensive manner. During the course of the project, there were some significant delays in the contracting of sequencing services and the delivery of sequencing data. Additionally, the two project staff members left the project early. Nevertheless, the project was able to address a multitude of research questions, initiated new topics, established protocols and built up collaborations that have laid the foundation for future research projects and applications of the methodology at the BfG.

The BfG can now operate independently by utilising the latest state-of-the-art science to address a wide range of ecological questions using molecular biological methods, thereby expanding and improving both its portfolio of research methods as well as its consulting services. The BfG is now acknowledged as a significant player in the field of molecular biological water assessment. The collaboration with the University of Duisburg-Essen has been highly fruitful, resulting in the initiation of follow-up projects. We are available to other federal and state authorities as a contact partner for specific issues, such as those pertaining to *Prymnesium* blooms. The BfG is further engaged in the development of standardised guidelines at the national and European levels via the DIN working group "Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung". In addition, internal BfG protocols and routines were developed to enable laboratory and project staff to continue their work (e.g. as part of the LAWA *Prymnesium* monitoring campaign, support for ICPR WFD monitoring, the TG02 project DigiTax and the BMDV Network of Experts). The expertise gained is therefore utilised at various levels.

In addition to the aforementioned successes, the project has demonstrated that a number of crucial steps are still required before the federal waterways can be assessed in accordance with the requirements of the EU Water Framework Directive using genetic data, particularly with regard to phytoplankton, phytobenthos and fish. The project has identified areas that require further investigation. It is recommended that curated high-quality databases need to be created for all BQEs. Such databases are currently being developed for fish and benthic macroinvertebrates (‘dbDNA’ project, UBA / University of Duisburg Essen). However, this remains a challenge for the significantly more species-rich phytoplankton and phytobenthos. Nevertheless, it is recommended that harmonised taxa lists need to be compiled for these BQEs in order to facilitate a more accurate comparison of morphological and DNA-based species lists. In addition, comprehensive reference databases should be established on the basis of the federal taxa list, in which quality-assured genetic sequences of the relevant gene regions are stored.

The project and the general development of expertise at the BfG also benefited from the appointment of permanent scientific positions outside the project, who brought with them relevant experience in this field and contribute to maintaining the competences developed in the project following the conclusion of the project's duration. However, in the long term, a permanent position for molecular biology work in department U4 for the BQEs fish and benthic invertebrates, as well as permanent molecular laboratory staff is considered necessary to maintain expertise and continue molecular biology work in the department.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Relative Abundanz der Diatomeen-Gattungen an der Mosel und Lahn basierend auf morphologischer Auswertung. 26

Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen der am häufigsten vertretenen Arten an beiden Flüssen; *Nitzschia dissipata* (A), *Staurosira construens* (B), *Melosira varians* (C), und *Amphora pediculus* (D), Bilder: Lydia King. 27

Abbildung 3: Relative Abundanz der identifizierten Arten benthischer Diatomeen basierend auf morphotaxonomischer Auswertung. Der Pfeil markiert den Anteil (%) an nicht-identifizierbaren Schalen auf Artebene. 28

Abbildung 4: Relative Abundanz der benthischen Diatomeen-Gattungen an der Mosel und Lahn basierend auf genetischer Bestimmung (rbcL Gen)..... 29

Abbildung 5: Relative Abundanz der identifizierten Arten benthischer Diatomeen basierend auf genetischer Auswertung (rbcL Gen). Der Pfeil kennzeichnet den Anteil (%) der auf Artniveau nicht-identifizierbaren Read-Sequenzen. 30

Abbildung 6: Lichtmikroskopische Aufnahme der in Nordamerika heimischen Kieselalgenart *Cymbella mexicana*. Messtelle MOLB-05A, Saar bei Konz. 31

Abbildung 7: Maximum-Likelihood-Phylogenie ausgewählter Stämme innerhalb der Cymbellales, mit der Gattung Planothidium als Außengruppe, basierend auf einem 263-Positionen-Alignment des plastidären rbcL Gens. Der Pfeil markiert die ESV aus dieser Studie, die zu *Cymbella mexicana* zugeordnet wurde. Angegeben sind Bootstrap-Werte ≥60. Skala = Anzahl der Substitutionen pro Base.... 31

Abbildung 8: Vergleich morphologischer und genetischer Erfassung benthischer Diatomeen auf Gattungs- (links) und Art-Ebene (rechts). 32

Abbildung 9: Die 20 häufigsten identifizierten Phytoplankton-Arten im morphotaxonomischen Datensatz der Lahn auf Grundlage des Biovolumens. Taxa die nicht auf Artniveau bestimmt wurden sind in grau dargestellt. 33

Abbildung 10: Die 20 häufigsten identifizierten Phytoplankton-Arten im morphotaxonomischen Datensatz der Mosel auf Grundlage des Biovolumens. Taxa die nicht auf Artniveau bestimmt wurden sind in grau dargestellt. 34

Abbildung 11: Relative Abundanz der Phytoplanktonklassen (Zuordnung basierend auf der PR2 Datenbank) an der Lahn basierend auf genetischer Bestimmung (18S rRNA Gen). Anmerkung: In der Gruppe Bacillariophyta sind Taxa enthalten, die in der verwendeten PR2 Referenzdatenbank auf Klassenebene keine Zuordnung zu einer spezifischen Klasse aufweisen und daher diesem übergeordneten Rang zugeordnet sind. Dies ist für folgende Abbildungen im Kapitel zu beachten. 35

Abbildung 12: Relative Read-Abundanz der Phytoplanktonklassen (Zuordnung basierend auf der PR2 Datenbank) im Längsprofil der Mosel. Die roten Rahmen markieren die Einteilung der Proben in Obermosel, Saar, Mittel- und Untermosel (von li. nach re.). 36

Abbildung 13: Relatives Biovolumen (links) und relative Read Abundanz (rechts) der 10 häufigsten Gattungen im Mosellängsprofil. 37

Abbildung 14: Relatives Biovolumen (links) und relative Read Abundanz (rechts) der 10 häufigsten Gattungen im Lahnlängsprofil. 38

Abbildung 15: Lageplan des Modellprojekts Monsterloch (aus BMVI/BMU Broschüre „Bundesprogramm „Blaues Band Deutschland“ Modellprojekte als ökologische Trittsteine an den Bundeswasserstraßen“, November 2020, 2. Auflage). 41

Abbildung 16: Absolute und relative Biovolumina der Phytoplanktongruppen (Phylum) im morphotaxonomischen Gesamtdatensatz. 44

Abbildung 17: Relative Biovolumina der 20 häufigsten Arten, basierend auf ihren absoluten Biovolumenanteilen im morphotaxonomischen Gesamtdatensatz. Die Farbe der Arten entspricht ihrer Zuordnung zu den Phyla Chlorophyta = grün, Cryptista = braun, Cyanobakterien = blaugrün, Dinoflagellata = rosa, Haptophyta = violett, Heterokontophyta = orange-braun. Taxa, die nicht auf Artniveau bestimmt wurden, sind in grau dargestellt. 45

Abbildung 18: Heatmap zur Darstellung der Read-Anteile im Gesamtdatensatz der DNA-basierten Analyse, wobei die Farbskala den relativen Anteil des jeweiligen Taxons (Phylum) in einer Probe angibt. Graue Zellen bedeuten, dass in der jeweiligen Probe für dieses Taxon keine DNA detektiert wurde. 46

Abbildung 19: KRONA Diagramm zur Darstellung der taxonomischen Vielfalt der DNA-basierten Analyse. Die verschiedenen Farben repräsentieren die taxonomischen Gruppen auf unterschiedlichen phylogenetischen Ebenen. Die Größe der Abschnitte spiegelt die relative Häufigkeit der jeweiligen Gruppen auf der Basis der relativen Read-Abundanzen wider, hier am Beispiel *Cryptomonas* verdeutlicht. 47

Abbildung 20: Vergleich der relativen Biovolumina des morphotaxonomischen Datensatzes mit den relativen Read-Abundanzen des DNA-basierten Datensatzes für die häufigsten 10 Gattungen je Datensatz. Für den Vergleich wurden beide Datensätze auf Taxa der Biokomponente Phytoplankton ohne Cyanobacteria reduziert. Die häufigsten 10 Gattungen wurden basierend auf ihren relativen Gesamtanteilen im jeweiligen Datensatz definiert. 48

Abbildung 21: Venn-Diagramm zur Gegenüberstellung von morphotaxonomischen und DNA-basierten Daten auf verschiedenen phylogenetischen Ebenen (Klasse, Familie, Gattung und Art). Die Überlappungsbereiche (●) zeigen konsistente Taxa zwischen den beiden Methoden (● Morphologie, ● DNA), während die einzigartigen Bereiche spezifisch für jede Methode sind. 50

Abbildung 22: Probenahmestellen an der Elbe. 53

Abbildung 23: Venn-Diagramm zur Gegenüberstellung von morphotaxonomischen und DNA-basierten Daten gesamt und auf Artniveau. 55

Abbildung 24: Vergleich des Artenspektrums zwischen den morphologischen und den genetischen Daten auf Phylum-Ebene. Detaillierter Blick auf das Artenspektrum der Arthropoda auf Ebene der Ordnungen. 57

Abbildung 25: Verteilung der Taxa- und Artenzahlen an den Monitoringprobestellen entlang der Elbe. X-Achse: Flusskilometer 1,8 – 560,0. Y-Achse: Taxa- und Artenanzahl an den einzelnen Probestellen. 59

Abbildung 26: Relative Häufigkeiten der Arten in den einzelnen Proben des Elbemonitorings. Oben: Morphologische Bestimmung (Individuenzahl), Unten: genetische Bestimmung (Read-Anzahl). 60

Abbildung 27: Ökologischer Zustand (PTI) der Probestellen in der Mosel, farblich kategorisiert nach der WRRL Anhang V, Abs. 1.4. Für jeden Flusskilometer wurden für die Gewässerbewertung die Beprobungsergebnisse der drei Querprofile zusammengeführt. Für den Wasserkörper Typ10 wurden die Querprofile KM 1,8 und KM 57,8 zusammengefasst, für den Wasserkörper Typ20 KM 107,0 bis KM 560,0..... 62

Abbildung 28: Probenahme-Design des Porengrößen- und Wassermengen-Tests. 66

Abbildung 29: Schematische Darstellung der Filter und Filtergehäuse. 66

Abbildung 30: Vergleich der Filtrationsdauern für 1 Liter/pro Filter. 66

Abbildung 31: DNA-Konzentration [ng/µl] der unterschiedlichen Porengrößen 0,45 µm, 0,8 µm, 1,2 µm und 5 µm nach Filtertyp und Jahreszeit 67

Abbildung 32: Karte der eDNA Probenahmestellen im Rhein (Rhein-km 490 vor dem Zusammenfluss von Rhein und Main, Rhein-km 500 in Mainz, Rhein-km 550 bei Kaub und Rhein-km 600 bei Engers/Kaltenengers). 68

Abbildung 33: Karten der Probenahmestellen im Nahesystem (oben) und im Lahnsystem (unten). ... 71

Abbildung 34: Probenahmestellen für verschiedene BQEs im Duisburger Hafen. 73

Abbildung 35: Probenahme-Design Hafen Frankfurt 2023 74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probenahmestationen an der Mosel und an der Lahn mit Ort, Datum, Gewässer und GPS Koordinaten. Die Buchstaben B und P in der Probenbezeichnung verweisen entweder auf Benthos- oder Planktonproben und werden in nachfolgenden Abbildungen und Kapiteln entsprechend verwendet 22

Tabelle 2: Verwendete Primer, Sequenzen und Literaturangaben 24

Tabelle 3: Übersicht über die sequenzierten Genabschnitte, die Sequenzierdienstleister und die Mindestanzahl generierter Reads in den verschiedenen Proben (LP = Längsprofil Probe, WP = wöchentliche Probe) 25

Tabelle 4: Ergebnisse der Gewässerbewertung der Wasserkörper Typ 10 und Typ 20 durch die unterschiedlichen Bewertungsmethoden 62

Literaturverzeichnis

ADRIAN-KALCHHAUSER, I., BURKHARDT-HOLM, P. (2016). *An eDNA Assay to Monitor a Globally Invasive Fish Species from Flowing Freshwater*. PLOS ONE, 11(1), e0147558, DOI:10.1371/journal.pone.0147558.

ALTHER, R., FIŠER, C., ALTERMATT, F. (2017). *Description of a widely distributed but overlooked amphipod species in the European Alps*. Zoological Journal of the Linnean Society, 179(4), 751-766, DOI:10.1111/zoj.12477.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., et al. (1990). *Basic local alignment search tool*. Journal of Molecular Biology, 215, DOI:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

AMESBURY, M. J., ROLAND, T. P., ROYLES, J., HODGSON, D. A., et al. (2017). *Widespread Biological Response to Rapid Warming on the Antarctic Peninsula*. Current Biology, 27(11), 1616--1622.e1612, DOI:10.1016/J.CUB.2017.04.034.

BEENTJES, K. K., SPEKSNIJDER, A. G. C. L., SCHILTHUIZEN, M., SCHAUB, B. E. M., et al. (2018). *The influence of macroinvertebrate abundance on the assessment of freshwater quality in The Netherlands.* Metabarcoding and Metagenomics, 2, DOI:10.3897/mbmg.2.26744.

BFN-SKRIPTEN (2005). *Gebietsfremde Arten: Positionspapier des Bundesamtes für Naturschutz*. editiert von F. KLINGENSTEIN, P.M. KORNACKER, H. MARTENS, U. SCHIPPMANN. Bundesamt für Naturschutz.

BFN-SKRIPTEN (2015). *Naturschutzfachliche Invasivitätsbewertungen für in Deutschland lebende gebietsfremde Wirbeltiere*. editiert von S. NEHRING, W. RABITSCH, F. ESSL, I. KOWARIK. Bundesamt für Naturschutz. ISBN: 978-3-89624-144-3.

BFN-SKRIPTEN (2023). *Die invasiven gebietsfremden Arten der Unionsliste der Verordnung (EU) Nr. 1143/2014 - Dritte Fortschreibung 2022*. editiert von S. NEHRING, S. SKOWRONEK. Bundesamt für Naturschutz. ISBN: 978-3-89324-415-4.

BIRK, S., BÖHMER, J., SCHÖLL, F., POIKANE, S. (2018). *Intercalibrating the national classifications of ecological status for very large rivers in Europe: Biological Quality Element: Benthic invertebrates*. Luxembourg: Publications Office of the European Union. ISBN: 978-92-79-92992-2.

BLANCHER, P., LEFRANÇOIS, E., RIMET, F., VASSELON, V., et al. (2022). *A strategy for successful integration of DNA-based methods in aquatic monitoring*. Metabarcoding and Metagenomics, 6, DOI:10.3897/mbmg.6.85652.

BLANCO, S., ECTOR, L. (2009). *Distribution, ecology and nuisance effects of the freshwater invasive diatom Didymosphenia geminata (Lyngbye) M. Schmidt: a literature review*. Nova Hedwigia, 88(3-4), 347-422, DOI:10.1127/0029-5035/2009/0088-0347.

BOLYEN, E., RIDEOUT, J. R., DILLON, M. R., BOKULICH, N. A., et al. (2019). *Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2*. Nat Biotechnol, 37(8), 852-857, DOI:10.1038/s41587-019-0209-9.

BOTHWELL, M. L., TAYLOR, B. W., KILROY, C. (2014). *The Didymo story: the role of low dissolved phosphorus in the formation of Didymosphenia geminata blooms*. Diatom Research, 29(3), 229-236, DOI:10.1080/0269249X.2014.889041.

BRINKLOW, T., CHAN, F., ETEMAD, M., DEB, J., et al. (2022). *Vessel Biofouling as a Vector for Non-Indigenious Species Introduction in Canada*. ISBN: 978-0-660-45709-3.

BUCHNER, D., BEERMANN, A. J., LAINI, A., ROLAUFFS, P., et al. (2019). *Analysis of 13312 benthic invertebrate samples from German streams reveals minor deviations in ecological status class between abundance and presence/absence data.* PLOS ONE, 14(12), DOI:10.1371/journal.pone.0226547.

BUCHNER, D., LEESE, F. (2020). *BOLDigger–a Python package to identify and organise sequences with the Barcode of Life Data systems*. Metabarcoding and Metagenomics, 4, e53535, DOI:10.3897/mbmg.4.53535.

BUCHNER, D., MACHER, T. H., LEESE, F. (2022). *APSCALE: advanced pipeline for simple yet comprehensive analyses of DNA metabarcoding data*. Bioinformatics, 38(20), 4817-4819, DOI:10.1093/bioinformatics/btac588.

BUNDESTAG, D. (2017). *Beschlussempfehlung und Bericht des Ausschusses für Bildung, Forschung und Technikfolgenabschätzung zu dem Antrag der Fraktionen der CDU/CSU und SPD: Biodiversität schützen – Taxonomische Forschung ausbauen.* In DRUCKSACHE *18/11700.*

CALLAHAN, B. J., MCMURDIE, P. J., ROSEN, M. J., HAN, A. W., et al. (2016). *DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data*. Nat Methods, 13(7), 581-583, DOI:10.1038/nmeth.3869.

CAMPBELL, N. R., HARMON, S. A., NARUM, S. R. (2015). *Genotyping-in-Thousands by sequencing (GT-seq): A cost effective SNP genotyping method based on custom amplicon sequencing*. Molecular Ecology Resources, 15(4), 855-867, DOI:10.1111/1755-0998.12357.

CAPO, E., SPONG, G., KÖNIGSSON, H., BYSTRÖM, P. (2020). *Effects of filtration methods and water volume on the quantification of brown trout (Salmo trutta) and Arctic char (Salvelinus alpinus) eDNA concentrations via droplet digital PCR*. Environmental DNA, 2(2), 152-160, DOI:10.1002/edn3.52.

CHOI, J., PARK, J. S. (2020). *Comparative analyses of the V4 and V9 regions of 18S rDNA for the extant eukaryotic community using the Illumina platform*. Sci Rep, 10(1), 6519, DOI:10.1038/s41598-020-63561-z.

CRAINE, J. M., CANNON, M. V., ELMORE, A., J., GUINN; STEVEN, M., et al. (2017). *DNA metabarcoding potentially reveals multi-assemblage eutrophication responses in an eastern North American river*. bioRxiv, 186452, DOI:10.1101/186452.

DEINER, K., LOPEZ, J., BOURNE, S., HOLMAN, L., et al. (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, DOI:10.3897/mbmg.2.28963.

DOI, H., INUI, R., AKAMATSU, Y., KANNO, K., et al. (2017). *Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish*. Freshwater Biology, 62(1), 30-39, DOI:10.1111/fwb.12846.

DRÖSCHER, I., RENNEBARTH, T., WAHL, B., LÜDDEKE, F., et al. (2022). *DNA-Metabarcoding des Zooplanktons - Einsatz moderner molekularbiologischer Monitoringmethoden im Bodensee*. *AQUA & GAS*. 2022, vol. 7+8, pp. 7, erhältlich unter https://seewandel.org/wp-content/uploads/2022/08/AQUAGAS_07-2022_DroescherEtAl_2022_Zooplankton.pdf.

ELBRECHT, V., VAMOS, E. E., MEISSNER, K., AROVIITA, J., et al. (2017). *Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring.* Methods in Ecology and Evolution, 8, 1265-1275, DOI:10.1111/2041-210X.12789.

ESENKULOVA, S., SUTHERLAND, B. J. G., TABATA, A., HAIGH, N., et al. (2020). *Comparing metabarcoding and morphological approaches to identify phytoplankton taxa associated with harmful algal blooms*. FACETS, 5(1), 784-811, DOI:10.1139/facets-2020-0025.

FEIST, S. M., LANCE, R. F. (2021). *Genetic detection of freshwater harmful algal blooms: A review focused on the use of environmental DNA (eDNA) in Microcystis aeruginosa and Prymnesium parvum*. Harmful Algae, 110, 102124, DOI:10.1016/j.hal.2021.102124.

GAONKAR, C. C., CAMPBELL, L. (2023). *Metabarcoding reveals high genetic diversity of harmful algae in the coastal waters of Texas, Gulf of Mexico*. Harmful Algae, 121, 102368, DOI:10.1016/j.hal.2022.102368.

GREYER, M., ROTHER, A., KLUNG, R., FRIEß, R., et al. (2018). *Integrative Taxonomie mit DNA-Barcoding - Einsatzmöglichkeiten molekularbiologischer Verfahren zur Ermittlung des ökologischen Zustandes nach EG-Wasserrahmenrichtlinie: Erste Erfahrungen aus der Praxis*. 2018, erhältlich unter https://publikationen.sachsen.de/bdb/artikel/31657. ISSN 1867-2868.

GUILLOU, L., BACHAR, D., AUDIC, S., BASS, D., et al. (2013). *The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy*. Nucleic acids research, 41, D597-604, DOI:10.1093/nar/gks1160.

HERLEMANN, D. P., LABRENZ, M., JÜRGENS, K., BERTILSSON, S., et al. (2011). *Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea*. Isme j, 5(10), 1571-1579, DOI:10.1038/ismej.2011.41.

HEWITT, C., CAMPBELL, M. (2010). *The relative contribution of vectors to the introduction and translocation of invasive marine species*. The National Centre for Marine Conservation and Resource Sustainability within the Australian Maritime College. ISBN: 978-1-921575-14-3.

HOBBS, J., GOLDBERG, C., HELBING, C., VELDHOEN, N. (2017). *Environmental DNA protocol for freshwater aquatic ecosystems, Version 2.2*., In *Report for the BC Ministry of Environment.*

HUNTER, M. E., FERRANTE, J. A., MEIGS-FRIEND, G., ULMER, A. (2019). *Improving eDNA yield and inhibitor reduction through increased water volumes and multi-filter isolation techniques*. Sci Rep, 9(1), 5259, DOI:10.1038/s41598-019-40977-w.

IKSR (2013). *Immigrated goby species in the Rhine system*. In International Commission for the Protection of the Rhine (ICPR), Report No. 208.

KASTEN, J., KUSBER, W.-H., RIEDMÜLLER, U., TWORECK, A., et al. (2018). *Steckbriefe der Phytoplankton-Indikatortaxa in den WRRL-Bewertungsverfahren PhytoSee und PhytoFluss mit Begleittext – 1. Lieferung: 50 Steckbriefe ausgewählter Indikatortaxa.* [online]. [Berlin]: BGBM Press, Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin, erhältlich unter https://doi.org/10.3372/spi.01.

KATO-UNOKI, Y., KURIHARA, A., KUGE, T., SHIMASAKI, Y., et al. (2021). *Genetic evidence for the invasion of Cymbella janischii (A. Schmidt) De Toni in Japan*. Research Square, DOI:10.21203/rs.3.rs-767796/v1.

KEZLYA, E., TSEPLIK, N., KULIKOVSKIY, M. (2023). *Genetic Markers for Metabarcoding of Freshwater Microalgae: Review*. *Biology*. 2023, vol. 12, no. 7. ISSN 2079-7737.

KIM, T., KI, J.-S. (2022). *Autumn blooms and seasonality of the dinoflagellate Unruhdinium penardii in the Han River (Korea) as tracked by morphological and molecular techniques*. Journal of Plankton Research, 44(2), 194-207, DOI:10.1093/plankt/fbac009.

KJÆRSTAD, G., MAJANEVA, M., FALAHATI-ANBARAN, M., TOPSTAD, L., et al. (2022). *DNA Metabarcoding of Preservative Ethanol Reveals Changes in Invertebrate Community Composition Following Rotenone Treatment.* Frontiers in Environmental Science, 10, DOI:10.3389/fenvs.2022.872739.

KLINDWORTH, A., PRUESSE, E., SCHWEER, T., PEPLIES, J., et al. (2013). *Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies.* Nucleic acids research, 41(1), e1, DOI:10.1093/nar/gks808.

KRAINER, K.-H., MÜLLER, H. (1995). *Morphology, infraciliature and ecology of a new planktonic ciliate, Histiobalantium bodamicum n. sp. (Scuticocliatida: Histiobalantiidae)*. Eur J Protistol, 31(4), 389-395, DOI:10.1016/S0932-4739(11)80451-7.

KULIKOVSKIY, M., GENKAL, S., MALTSEV, Y., GLUSHCHENKO, A., et al. (2022). *Resurrection of the diatom genus Stephanocyclus (Coscinodiscophyceae: Stephanodiscaceae) on the basis of an integrated molecular and morphological approach*. Fottea, 22(2), 181-191, DOI:10.5507/fot.2021.025.

LANGE-BERTALOT, H., HOFMANN, G., WERUM, M., CANTONATI, M. (2017). *Freshwater Benthic Diatoms of Central Europe: Over 800 Common Species Used in Ecological Assessment. English edition with updated taxonomy and added species.* Koeltz Botanical Books, Schmitten-Oberreifenberg. ISBN: 978-3-946583-06-6.

LEESE, F., WOPPOWA, L., BÁLINT, M., HÖSS, S., et al. (2023). *DNA-basierte Biodiversitätsanalysen im Natur- und Umweltschutz: Welche Optionen haben wir für eine Standardisierung? - Eine Handlungsempfehlung aus Forschung und Praxis*. Bonn: Bundesamt für Naturschutz. 53 S. ISBN: 978-3-89624-427-7.

LI, J., LAWSON HANDLEY, L. J., READ, D. S., HÄNFLING, B. (2018). *The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding*. Molecular Ecology Resources, DOI:10.1111/1755-0998.12899.

MACHER, J.-N., VIVANCOS, A., PIGGOTT, J. J., CENTENO, F. C., et al. (2018). *Comparison of environmental DNA and bulk-sample metabarcoding using highly degenerate cytochrome c oxidase I primers*. Molecular Ecology Resources, 18(6), 1456--1468, DOI:10.1111/1755-0998.12940.

MACHER, T.-H., BEERMANN, A. J., LEESE, F. (2021). *TaxonTableTools: A comprehensive, platform-independent graphical user interface software to explore and visualise DNA metabarcoding data*. Molecular Ecology Resources, 21(5), 1705-1714, DOI:10.1111/1755-0998.13358.

MISCHKE, U., BEHRENDT, H. (2007). *Handbuch zum Bewertungsverfahren von Fliessgewässern mittels Phytoplankton zur Umsetzung der EU-WRRL in Deutschland*. Schweizerbart. 88 S. ISBN: 978-3-510-65328-7.

MISCHKE, U., KURMAYER, R., SALMASO, N., ELERSEK, T., et al. (2022). *Metabarcoding für Phytoplankton- und benthische Diatomeenarten durch das Projekt Eco-AlpsWater – Erfahrungen für bayerische Gewässer*. In *Ergebnisse der Jahrestagung 2021 der Deutschen Gesellschaft für Limnologie (DGL) und der deutschen und österreichischen Sektion der Societas Internationalis Limnologiae (SIL),* 2022, Deutsche Gesellschaft für Limnologie e.V.

MISCHKE, U., VENOHR, M., BEHRENDT, H. (2011). *Using Phytoplankton to Assess the Trophic Status of German Rivers*. International Review of Hydrobiology, 96(5), 578--598, DOI:10.1002/iroh.201111304.

MORA, D., KLEINTEICH, J., ZIMMERMANN, J., FISCHER, H., et al. (2022). *Influence of preservation methods for phytobenthos samples on the detection of microbial communi-ties through eDNA metabarcoding – first results*. In *Ergebnisse der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie (DGL), 2021*, Leipzig 2022, 29-36.

MÜLLER, H., WEISSE, T. (1994). *Laboratory and field observations on the scuticociliate Histiobalantium from the pelagic zone of Lake Constance, FRG*. Journal of Plankton Research, 16(4), 391-401, DOI:10.1093/plankt/16.4.391.

NICHOLLS, K. H. (2003). *Chapter 13 - HAPTOPHYTE ALGAE*. In J.D. WEHR, R.G. SHEATH eds. *Freshwater Algae of North America.* Burlington: Academic Press, S. 511-521.

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*. Bern, Switzerland: Bundesamt für Umwelt.

PAWLOWSKI, J., KELLY-QUINN, M., ALTERMATT, F., APOTHÉLOZ-PERRET-GENTIL, L., et al. (2018). *The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of*

aquatic ecosystems. Science of The Total Environment, 637-638, 1295-1310, DOI:10.1016/j.scitotenv.2018.05.002.

PAWLOWSKI, J., LEJZEROWICZ, F., APOTHELOZ-PERRET-GENTIL, L., VISCO, J., et al. (2016). *Protist metabarcoding and environmental biomonitoring: Time for change*. Eur J Protistol, 55(Pt A), 12-25, DOI:10.1016/j.ejop.2016.02.003.

PEARSON, L. A., D'AGOSTINO, P. M., NEILAN, B. A. (2021). *Recent developments in quantitative PCR for monitoring harmful marine microalgae*. Harmful Algae, 108, 102096, DOI:10.1016/j.hal.2021.102096.

PIREDDA, R., TOMASINO, M. P., D'ERCHIA, A. M., MANZARI, C., et al. (2017). *Diversity and temporal patterns of planktonic protist assemblages at a Mediterranean Long Term Ecological Research site*. FEMS Microbiol Ecol, 93(1), DOI:10.1093/femsec/fiw200.

R_CORE_TEAM (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2022.

RIMET, F., GUSEV, E., KAHLERT, M., KELLY, M. G., et al. (2019). *Diat.barcode, an open-access curated barcode library for diatoms*. Sci Rep, 9(1), 15116, DOI:10.1038/s41598-019-51500-6.

ROGNES, T., FLOURI, T., NICHOLS, B., QUINCE, C., et al. (2016). *VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics*. PeerJ, 4, e2584, DOI:10.7717/peerj.2584.

RSTUDIO_TEAM (2020). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, PBC, Boston, MA, 2020.

SALMASO, N., VASSELON, V., RIMET, F., VAUTIER, M., et al. (2022). *DNA sequence and taxonomic gap analyses to quantify the coverage of aquatic cyanobacteria and eukaryotic microalgae in reference databases: Results of a survey in the Alpine region*. Science of The Total Environment, 834, 155175, DOI:10.1016/j.scitotenv.2022.155175.

SAYERS, E. W., CAVANAUGH, M., CLARK, K., PRUITT, K. D., et al. (2022). *GenBank*. Nucleic acids research, 50(D1), D161-D164, DOI:10.1093/nar/gkab1135.

SCHMIDT, S., SCHÖLL, F. (2021) *Methodenvergleich morphologischer und genetischer Artbestimmung von Makrozoobenthosproben des Rheins zwischen Basel und Brohl, Juli/August 2020,* Bericht BfG-2069.

SCHÖLL, F., HAYBACH, A., KÖNIG, B. (2005). *Das erweiterte Potamontypieverfahren zur ökologischen Bewertung von Bundeswasserstraßen (Fließgewässertypen 10 und 20: kies- und sandgeprägte Ströme, Qualitätskomponente Makrozoobenthos) nach Maßgabe der EU-Wasserrahmenrichtlinie.* Hydrologie und Wasserwirtschaft, 49(5), 234 - 247,

SCHULTE, N. O., CRAINE, J. M., LEOPOLD, D. R., DEVITT, J. K., et al. (2024). *Diversity of freshwater algal assemblages across the United States as revealed by DNA metabarcoding*. Environmental DNA, 6(1), e477, DOI:10.1002/edn3.477.

STOECK, T., BASS, D., NEBEL, M., CHRISTEN, R., et al. (2010). *Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water*. Mol Ecol, 19 Suppl 1, 21-31, DOI:10.1111/j.1365-294X.2009.04480.x.

STOECKLE, M. Y., SOBOLEVA, L., CHARLOP-POWERS, Z. (2017). *Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary*. PLOS ONE, 12(4), e0175186, DOI:10.1371/journal.pone.0175186.

TABERLET, P., BONIN, A., ZINGER, L., COISSAC, E. (2018). *Environmental DNA - For Biodiversity Research and Monitoring*. Oxford: Oxford University Press. ISBN: 978-0-19-876722-0.

THOMAS, A. C., HOWARD, J., NGUYEN, P. L., SEIMON, T. A., et al. (2018). *eDNA Sampler: A fully integrated environmental DNA sampling system*. Methods in Ecology and Evolution, 9(6), 1379-1385, DOI:10.1111/2041-210X.12994.

TITTIZER, T., SCHLEUTER, A. (1986). *Eine neue Technik zur Entnahme quantitativer Makrozoobenthosproben aus Sedimenten größerer Flüsse und Ströme.* Deutsche Gewässerkundliche Mitteilungen, 30, 147-149,

TURNER, C. R., BARNES, M. A., XU, C. C. Y., JONES, S. E., et al. (2014). *Particle size distribution and optimal capture of aqueous macrobial eDNA*. Methods in Ecology and Evolution, 5(7), 676-684, DOI:10.1111/2041-210X.12206.

ULMAN, A., FERRARIO, J., FORCADA, A., SEEBENS, H., et al. (2019). *Alien species spreading via biofouling on recreational vessels in the Mediterranean Sea*. Journal of Applied Ecology, 56(12), 2620-2629, DOI:10.1111/1365-2664.13502.

VAMOS, E., ELBRECHT, V., LEESE, F. (2017). *Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding.* Metabarcoding and Metagenomics, DOI:10.7287/peerj.preprints.3037v2.

VASSELON, V., RIMET, F., TAPOLCZAI, K., BOUCHEZ, A. (2017). *Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: Scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte island, France)*. Ecological Indicators, 82, 1-12, DOI:10.1016/J.ECOLIND.2017.06.024.

VENTURA, L. D., 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*. Management of Biological Invasions, 8, 101-112, DOI:10.3391/mbi.2017.8.1.10.

VISCO, J. A., APOTHLOZ-PERRET-GENTIL, L., CORDONIER, A., ESLING, P., et al. (2015). *Environmental Monitoring: Inferring the Diatom Index from Next-Generation Sequencing Data*. Environmental Science and Technology, 49(13), 7597-7605, DOI:10.1021/es506158m.

WALTERS, W., HYDE, E. R., BERG-LYONS, D., ACKERMANN, G., et al. (2016). *Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys*. mSystems, 1(1), DOI:10.1128/mSystems.00009-15.

WEIGAND, H., BEERMANN, A. J., ČIAMPOR, F., COSTA, F. O., et al. (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, DOI:10.1016/j.scitotenv.2019.04.247.

YU, Y., LEE, C., KIM, J., HWANG, S. (2005). *Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction*. Biotechnology and Bioengineering, 89(6), 670-679, DOI:10.1002/bit.20347.

ZIMMERMANN, J., GLCKNER, G., JAHN, R., ENKE, N., et al. (2015). *Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies*. Molecular Ecology Resources, 15(3), 526--542, DOI:10.1111/1755-0998.12336.

ZIZKA, V., LEESE, F., PEINERT, B., GEIGER, M. (2018). *DNA metabarcoding from sample fixative as a quick and voucher preserving biodiversity assessment method*. Genome, 62(3), DOI:10.1139/gen-2018-0048.

Bundesanstalt für Gewässerkunde

Am Mainzer Tor
56068 Koblenz

Telefon: +49 261 1306-0
Telefax: +49 261 1306-5302
E-Mail: posteingang@bafg.de

www.bafg.de