



Interreg



Alpine Space

Eco-AlpsWater

European Regional Development Fund

Technische Leitfäden für das eDNA-Monitoring in alpinen Gewässern

2021

FÜR INTERESSENSGRUPPEN UND ENDANWENDER



Eco-AlpsWater

Innovative ökologische Bewertungs- und Wasserbewirtschaftungsstrategien für den Schutz von Ökosystemleistungen in alpinen Seen und Flüssen

EDITOR Tina Elersek

AUTOREN

TEXT von Isabelle Domaizon, Giulia Riccioni, Massimo Pindo, Valentin Vasselon, Rainer Kurmayer, Adriano Boscaini, Camilla Capelli, Agnes Bouchez, Frederic Rimet, Marine Vautier, C. Chardon, Maxime Logez, Jean Marc Baudoin, Josef Wanzenböck, Hans Rund, Stefanie Dobrovolny, Peter Hufnagl, A. Gandolfi, Jonas Bylemans, Ute Mischke, Tina Elersek, Nico Salmaso

BEGUTACHTUNG von Hans Rund

PHOTOS von National Institute of Biology (Maša Zupančič, Tina Eleršek), ARPAV (Giorgio Franzini). LFUI (Hans Rund) and FEM (Nico Salmaso)

SCHEMATISCHE ABBILDUNGEN von Nico Salmaso, Marine Vautier

DESIGN von Tina Elersek

VERÖFFENTLICHT vom Nationalen Institut für Biologie (SI)

Copyright © Nationales Institut für Biologie 2021

Digitale Edition

Ljubljana, 2021

INFO tina.elersek@nib.si

Protokolle für alle eDNA-Monitoring-Schritte! Die vorliegenden Protokolle entsprechen dem heutigen Stand der Technik, werden aber aufgrund kontinuierlicher Überarbeitungen und technischer Verbesserungen in naher Zukunft optimiert.

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

[COBISS.SI-ID 93174019](https://nib.si/COBISS.SI-ID/93174019)

ISBN 978-961-7144-13-0 (PDF)

Interreg
Alpine Space
Eco-AlpsWater



European Regional Development Fund



Inhalte

I. Stand der Technik bei den Methoden zur Analyse der Umwelt-DNA in Seen und Flüssen	4
II. Probenahme Protokolle (Abb. 1, Schritt 1)	7
Plankton-Probenahme in Seen	7
Biofilm-Probenahme in Flüssen & Seen	8
Fisch eDNA Probenahmen in Flüssen & Seen	9
III. Protokolle für eDNA Extraktionen P (Fig. 1, Schritt 2)	10
Plankton-DNA Extraktion	10
Biofilm-DNA Extraktion	11
Fisch DNA Extraktion (3 Methoden)	12
IV. Protokolle zur Vorbereitung der DNA-Bibliotheken (Abb. 1, Schritt 3-4)	14
DNA-Bibliotheken Protokoll für Diatomeen	14
DNA-Bibliotheken Protokoll für Bakterien	15
DNA-Bibliotheken Protokoll für Protisten	16
DNA-Bibliotheken Protokoll für Fische	17
V. Protokolle für die bioinformatische Analyse von DNA Sequenzen (Abb. 1, Schritt 5-6)	18
Bioinformatische Pipeline für Diatomeen	18
Bioinformatische Pipeline für Bakterien (16S rRNA-Gen)	19
Bioinformatische Pipeline für Protisten (18S rRNA-Gen)	20
VI. Harmonisierung der Ansätze in der Europäischen Gemeinschaft und der Schweiz	21
Anforderungen der EU-WFD und CH-WPO	21
Monitoring-Ansätze der nächsten Generation	24
VII. FAQ - allgemeine Perspektive	25



I. Stand der Technik bei den Methoden zur Analyse der Umwelt-DNA in Seen und Flüssen

Süßwasser in Seen und Flüssen liefert Güter und Dienstleistungen, die für die menschliche Gesellschaft überall von entscheidender Bedeutung sind; der Schutz und die Erhaltung dieser aquatischen Ökosysteme ist daher von großer Bedeutung. Aquatisches Biomonitoring unterstützt heute einen Großteil der Bewirtschaftung und Erhaltung von Binnengewässern und ist in Europa zu einer wesentlichen Aufgabe geworden, da die Gesundheit von Seen und Flüssen durch starke anthropogene Einflüsse beeinträchtigt wird. Eine wirksame Bewertung der Qualität bzw. des Zustands aquatischer Ökosysteme erfordert umfassende Daten über verschiedene Süßwasserorganismen (von Mikroalgen bis zu Fischen), die als Indikatoren für den Zustand des Ökosystems dienen. Die erforderlichen Biodiversitäts-Metriken werden durch die Sammlung von Bioindikatororganismen gewonnen, die auf Artniveau identifiziert werden, um taxonomische Listen und anschließende Qualitätsindizes zu erstellen. Diese Ansätze erfordern ein hohes Maß an taxonomischem Fachwissen und sind in der Regel invasiv (z.B. Elektrofischen), zeitaufwändig, technisch komplex und daher teuer, wenn sie in großem zeitlichen und räumlichen Maßstab eingesetzt werden. Genetische Screening-Methoden mit hohem Durchsatz, wie z.B. das Metabarcoding von Umwelt-DNA (eDNA), wurden kürzlich als Lösung für diese Unzulänglichkeiten vorgeschlagen. Ein solches Biomonitoring der neuen Generation hat gegenüber den herkömmlichen Ansätzen viele Vorteile in Bezug auf Schnelligkeit, Vergleichbarkeit und Kosten. Weiters bieten sie Möglichkeiten, die aquatische Artenvielfalt mit einem nicht-invasiven und relativ einfach zu standardisierenden Ansatz zu monitorieren. eDNA ist die aus Umweltproben (hier Wasser oder Biofilme) gewonnene DNA, die sowohl DNA in lebenden Zellen (z.B. Bakterien, Mikroalgen) als auch DNA umfasst, die von verschiedensten Organismen (z.B. Fischen) in die Umwelt abgegeben wird (z.B. über Ausscheidungen). Aus eDNA-Proben können kurze DNA-Regionen, sogenannte "Barcodes", amplifiziert, mit Hilfe von Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologien (HTS) sequenziert und mit einer Referenzbibliothek abgeglichen werden, was die Identifizierung von Taxa ermöglicht, die ursprünglich in den beprobten Gewässern/Biofilmen vorhanden waren. Obwohl das eDNA-Metabarcoding als sehr vielversprechend für das Biomonitoring der nächsten Generation angesehen wird, sind die damit verbundenen Methoden bisher nicht standardisiert und jeder Schritt des eDNA-Arbeitsablaufs muss auf europäischer Ebene normalisiert und validiert werden, bevor er für das routinemäßige Monitoring von Seen und Flüssen eingesetzt werden kann. Eines der Hauptziele des Eco-AlpsWater Projekts ist die Formalisierung von standardisierten eDNA-Protokollen für Bakterien, Mikroalgen und Fische und die Umsetzung dieser Protokolle auf alpiner Ebene in ausgewählten Pilotseen und -flüssen. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, enthalten die hier genannten Protokolle Informationen für alle Schritte des eDNA-Arbeitsablaufs, d.h. Probenahme, DNA-Extraktion und Laborvorbereitung (einschließlich Auswahl der Barcodes und PCR-Amplifikation) sowie Sequenzierung und bioinformatische Bearbeitung, die die Erstellung taxonomischer Listen ermöglicht. Obwohl die Protokolle eine gemeinsame Anzahl von Schritten umfassen, müssen sie an die verschiedenen Arten von biologischen Elementen angepasst werden. Ein anschauliches Beispiel mit den wichtigsten Schritten und Methoden, die bei Fischen



angewandt werden, ist in Abb. 2 dargestellt. Auf der Grundlage der in diesem technischen Dokument enthaltenen Synthese hat das Eco-AlpsWater-Konsortium einige methodische Entscheidungen getroffen, die zur Formalisierung geeigneter eDNA-Strategien beitragen, die auf das routinemäßige Monitoring von Süßwasser-Ökosystemen übertragbar sind. Die wichtigsten Fragen, die in dieser bibliographischen Synthese behandelt werden, sind: (i) wann, wie und wo eDNA-Proben entnommen werden sollen, (ii) wie eDNA konzentriert und konserviert werden soll, (iii) welche DNA-Extraktionsmethode am besten geeignet ist, (iv) welche Barcodes, je nach Zielsetzung des Biomonitorings, verwendet werden sollen und (v) welche Sequenzierungstechnologien und bioinformatischen Analysen ausgewählt werden sollen, um robuste taxonomische Bestandsaufnahmen für die untersuchten biologischen Gruppen zu erhalten. Alle hier beschriebenen, vom Eco-AlpsWater Konsortium vorgeschlagen, Protokolle haben zum Ziel, die Umsetzung der eDNA-Analysen in Kombination mit HTS-Methoden beim Biomonitoring und der ökologischen Bewertung von Seen und Flüssen zu fördern.

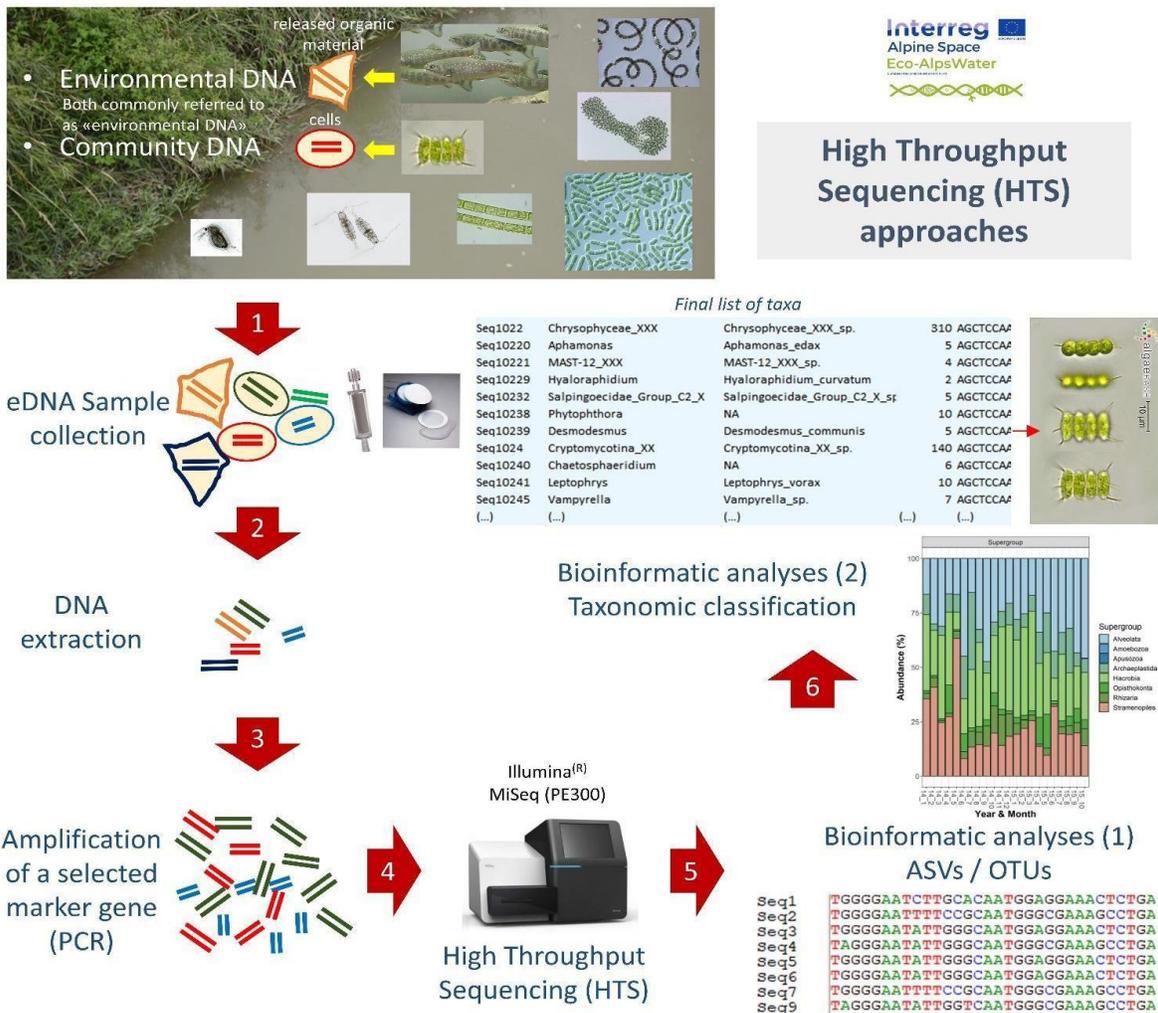


Abbildung 1. Synthetische Darstellung der wichtigsten Schritte bei der Analyse von eDNA in Süßwasser-Ökosystemen (Seen und Flüsse). Die Abbildung enthält ein Beispiel für die Amplifikation, Sequenzierung und Klassifizierung von Protisten (rote, blaue und dunkelgrüne DNA-Sequenzen), die Schritte für andere aquatische Organismen sind aber die gleichen. Allerdings erfordert jedes biologische Element spezifische Anpassungen der Verfahren in allen sechs Schritten des HTS (siehe z.B. Abb. 2).

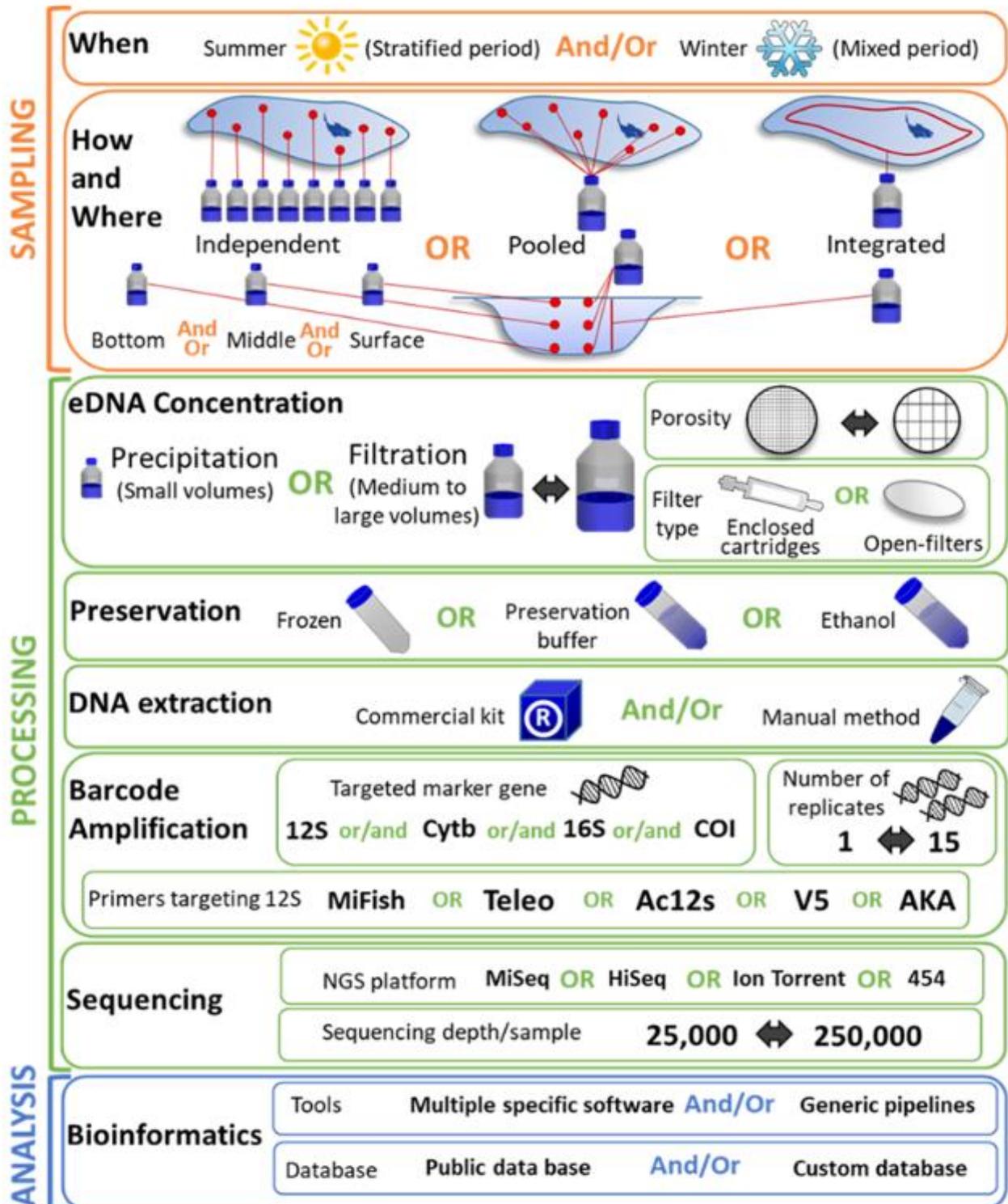


Abbildung 2. Synthetische Darstellung der wichtigsten Schritte und Methoden, die in der Literatur für das eDNA-Metabarcoding von Fischen in Süßwasser-Ökosystemen (Seen und Flüsse) angewandt werden.



II. Probenahme Protokolle (Abb. 1, Schritt 1)

Plankton-Probenahme in Seen

Entnahme von Planktonproben aus Seen für nachfolgende molekulare Analysen

Ziel dieses Protokolls ist es, eine zuverlässige und reproduzierbare Methode für die Probenahme von Mikroplankton in Seen bereitzustellen, die für die anschließende DNA-Analyse verwendet werden kann. Die hier, im Rahmen von Eco-AlpsWater, vorgeschlagene Anwendung zielt darauf ab, DNA-Inventare mit traditionellen (taxonomischen) Phytoplankton-Inventaren zu vergleichen und die mikro-planktonische Vielfalt durch eDNA-Analyse (einschließlich Bakterien) umfassender zu charakterisieren. Die Probenahmestrategie ist ähnlich wie bei der klassischen Phytoplankton-Untersuchung mit Schwerpunkt auf der euphotischen Zone (Abb. 3), jedoch wird das Verfahren zur Filtration und Konservierung für DNA-Proben angepasst.

Protokoll:

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.xn6fmhe

Kurzer Film über die Plankton-Probenahme für eDNA-Analysen

<https://www.youtube.com/watch?v=du5dfjNQr1E>

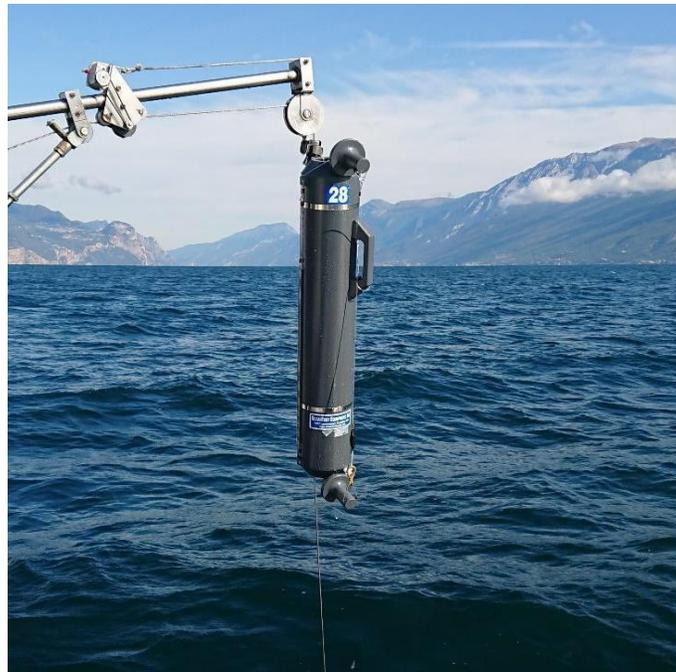


Abbildung. 3. Niskin-Flasche zur Entnahme von Wasserproben in bestimmten Tiefen des Gardasees.



Biofilm-Probenahme in Flüssen & Seen

Biofilm-Probenahme für die nachfolgende DNA-Analyse sowie für mikroskopische Zählungen

Ziel dieses Protokolls ist es, ein zuverlässiges und reproduzierbares Verfahren für die Beprobung des Mikrophytobenthos von Flüssen und der damit verbundenen Mikroben in Biofilmen bereitzustellen. Das Protokoll kann sowohl für die nachgeschaltete DNA-Analyse als auch für die mikroskopische Zählung von Algen verwendet werden. Es ist für die routinemäßige Probenahme optimiert und steht im Einklang mit der CEN-Leitlinie (NF EN 13946) und dem technischen Bericht des CEN (FprCEN/TR 17245) für die Analyse benthischer Diatomeen aus Flüssen (z.B. Abb. 4) und Seen. Die hier im Rahmen von Eco-AlpsWater vorgeschlagene Anwendung zielt darauf ab, DNA-Inventare mit traditionellen Inventaren (Mikroskopie) zu vergleichen.

Protokoll für die Biofilm-Probenahme in Seen:

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.br2xm8fn

Protokoll für die Biofilm-Probenahme in Flüssen:

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ben6jdhe

Kurzer Film über die Biofilm-Probenahme für eDNA-Analysen:

<https://www.youtube.com/watch?v=6Q48nSMjNA>



Abbildung 4. Fluss Bistrica, Biofilmprobenahme mit sterilisierter Bürste und Handschuhen.



Fisch eDNA Probenahmen in Flüssen & Seen

Entnahme von eDNA-Proben von Fischen aus Seen und Flüssen für die nachfolgende molekulare Analyse

Das Ziel dieses Protokolls ist es, eine zuverlässige und reproduzierbare Methode für die Probenahme von Fischen aus Seen und Flüssen (z.B. Abb. 5) bereitzustellen, die für die anschließende DNA-Analyse verwendet werden kann. Die hier vorgeschlagene Anwendung im Rahmen von Eco-AlpsWater zielt darauf ab, DNA-Bestandsaufnahmen mit traditionellen Fischbestandsaufnahmen zu vergleichen. Drei verschiedene Ansätze zur Probenahme, die sich in den verwendeten Filtertypen, der Anzahl der Proben und dem gefilterten Volumen pro Probe unterscheiden, werden beschrieben (vgl. Abb. 2). Jede dieser Probenahme-Methoden und die dazugehörigen DNA-Extraktionsverfahren (beschrieben in Abschnitt III) haben ihre Vor- und Nachteile, und es hängt von der jeweiligen Forschungsfrage ab, welcher Ansatz am besten geeignet ist. Obwohl die vorgeschlagenen Methoden und Protokolle noch in der Entwicklung sind und ständig verbessert werden, werden nicht alle im Protokoll beschriebenen Methoden für künftige Fisch eDNA-Untersuchungen empfohlen (z.B. wird die Verwendung der VigiDNA Methode aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit und Datenqualität vom EAW Konsortium nicht länger empfohlen, Details dazu finden Sie im Protokoll).

Protokoll:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/final-results-and-deliverables/d.t1.1.2---4-lake-river-fish-edna-sampling.pdf>



Abbildung 5. Flussbarsch (*Perca fluviatilis*).



III. Protokolle für eDNA Extraktionen P (Fig. 1, Schritt 2)

Plankton-DNA Extraktion

Eco-AlpsWater Protokoll für die Extraktion von Sterivex Filtern unter Verwendung des DNeasy® PowerWater Sterivex Kits (QIAGEN)

Dieses Protokoll ist Teil des DNA-Workflows, der im Rahmen des Eco-AlpsWater Projekts angewendet wird, um die Vielfalt des Planktons in Seen zu charakterisieren. Traditionell erfolgte die Analyse des Phytoplanktons durch mikroskopische Beobachtungen. Neue Hochdurchsatz- Sequenzierungs-Technologien (HTS) bieten das Potenzial für eine schnelle Untersuchung von Umweltproben mit der Möglichkeit, eine große Vielfalt von Taxa zu erfassen, die mit traditionellen Methoden bisher nicht erfasst wurden. Der hier beschriebene methodische Schritt ist die Extraktion der DNA. Dies ist ein entscheidender Schritt, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Um die DNA aus den Zellen zu gewinnen, müssen die angewandten Methoden zur Zellyse und DNA-Isolierung effizient sein, um eine unverfälschte Nukleinsäuregewinnung, selbst von Arten mit zähen Zellwänden, zu ermöglichen. Wie im nachfolgenden Protokoll beschrieben, wurden im Rahmen des Eco-AlpsWater Projekts, in Seen entnommenes Wasser über Sterivex®-Kartuschen (Sterivex® GP 0,22 µm) gefiltert und bei -20 °C gelagert. Die für die DNA-Extraktion gewählte Methode ist daher an die Art des für die Planktonsammlung verwendeten Materials/Filters (d.h. Sterivex®-Kartusche) angepasst. Das im Folgenden vorgestellte Protokoll verwendet das DNeasy® PowerWater Sterivex® Kit (QIAGEN) mit spezifischen, an die Plankton-DNA-Extraktion angepassten Änderungen.

Protokoll:

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bvgzn3x6

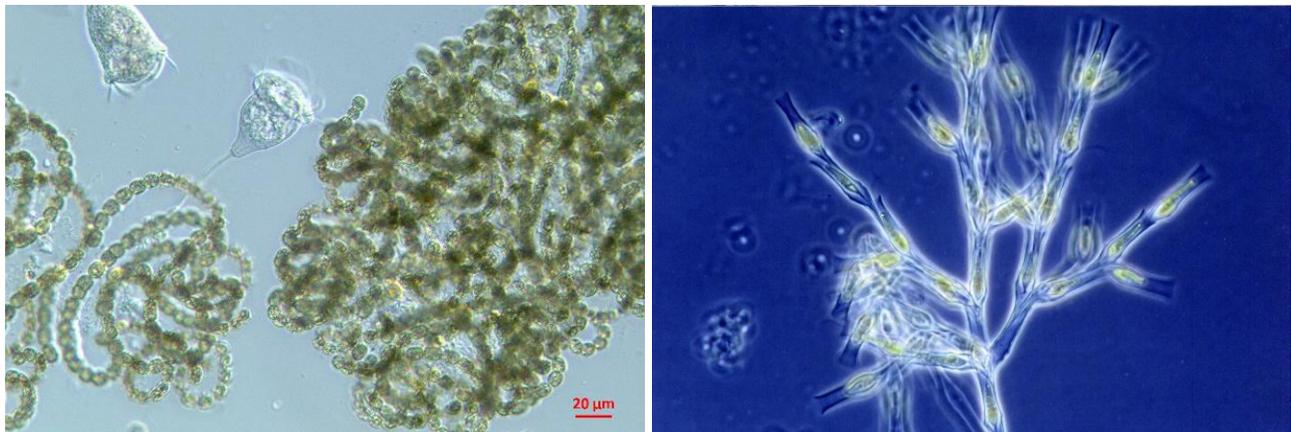


Abbildung 6. Phytoplankton aus dem Gardasee. Links, Fäden des Cyanobakteriums *Dolichospermum lemmermannii* mit angehängten Vorticelliden. Rechts, der Chrysophyt *Dinobryon divergens*. Die DNA-Extraktion liefert genomische DNA von allen in einer Probe vorhandenen Organismen.



Biofilm-DNA Extraktion

Eco-AlpsWater Protokoll für die Extraktion von Biofilm-Proben unter Verwendung des NucleoSpin® Soil Kits (MACHEREY-NAGEL)

Der hier beschriebene methodische Schritt ist die DNA-Extraktion, ein kritischer Schritt, um relevante Ergebnisse zu erhalten, da die molekularen Bestände durch die verwendete DNA-Extraktionsmethode beeinflusst werden können. Die Methodik für die DNA-Extraktion aus Biofilmen wurde durch das Testen von fünf verschiedenen Methoden ermittelt, die auf unterschiedlichen Arten der Zellyse und der DNA-Aufreinigung, getestet an reinen Kieselalgenkulturen und Proben aus Seen und Flüssen, basieren. Im Rahmen des Eco-AlpsWater Projekts wurden Biofilm-Proben aus verschiedenen Seen und Flüssen entnommen, in 50-mL-Falcontube in Ethanol (4 °C) gelagert und vor der DNA-Extraktion maximal drei Monate aufbewahrt (die Extraktion sollte vorzugsweise in dem auf die Probenahme folgenden Monat erfolgen). Das im Folgenden vorgestellte DNA-Extraktionsprotokoll wurde in mehreren neueren Studien verwendet, die sich auf die Anwendung von Diatomeen-Metabarcoding konzentrierten. Die Extraktion basiert auf dem Protokoll des Herstellerst (NucleoSpin® Soil-Kit - MACHEREY-NAGEL), wurde jedoch mit spezifischen Änderungen für die Biofilm-DNA-Extraktion angepasst.

Protokoll:

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bd52i88e

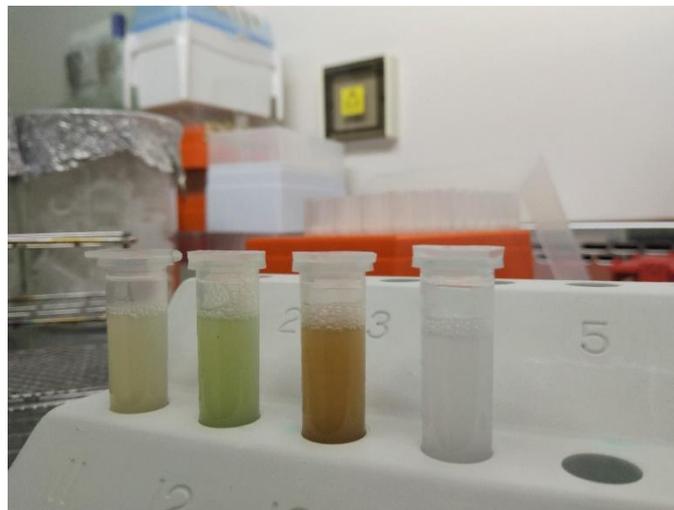


Abbildung. 7. DNA Extraktion von Biofilmen aus verschiedenen Gewässern.



Fisch DNA Extraktion (3 Methoden)

(1) Eco-AlpsWater Protokoll für die Extraktion von Fisch DNA aus VigiDNA®-Filterkartuschen, unter Verwendung einer Modifikation des NucleoSpin® Soil-Kits (MACHEREY-NAGEL)

Die Wahl der Methodik für die Fisch-DNA-Extraktion basiert auf früheren Studien, mit einigen Anpassungen für das Eco-AlpsWater Projekt. Für die integrierte eDNA-Probenahme von Fischen im Rahmen des Eco-AlpsWater Projekts wurden Wasserproben mit einer VigiDNA® (0,45-µm) Filterkartusche gesammelt, die für die Filtration großer Wassermengen (30 Liter) geeignet ist. Nach der Filtration wurde der Kartusche ein Konservierungspuffer zugesetzt, der bei Raumtemperatur bis zur Extraktion, die innerhalb eines Monats nach der Probenahme erfolgen sollte, gelagert wurde. Das für diesen Ansatz verwendete DNA-Extraktionsprotokoll wurde mit spezifischen Änderungen an das NucleoSpin® Soil Kit (MACHEREY-NAGEL) angepasst. Nach abgeschlossenem Vergleich aller im Eco-AlpsWater getesteten Fisch e-DNA Methoden, wird die VigiDNA Methodik aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit und schlechter Datenqualität vom EAW Konsortium nicht länger empfohlen (Details dazu finden Sie im Fisch e-DNA Probenahme Protokoll).

Protokoll:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/dt1.1.2.--8.2-fish dna extraction vigidna.pdf>

(2) Eco-AlpsWater Protokoll für die Extraktion von Fisch DNA aus mit Konservierungspuffer konservierten Sterivex®-Kartuschen unter Verwendung des NucleoSpin® Soil-Kits (MACHEREY-NAGEL)

Die Wahl der Methodik für die Extraktion der Fisch eDNA, basiert auf früheren Studien und wurde an Sterivex®-Filterkartuschen angepasst. Für den Fisch eDNA Punktproben Ansatz (Sterivex® - 0,45-µm) im Rahmen des Eco-AlpsWaterProjekts wurden Wasserproben (2 Liter) mit Sterivex®-Filterkartuschen (0,45-µm) entnommen. Nach der Filtration wurden die Kartuschen mit Konservierungspuffer gefüllt und bis zur DNA-Extraktion bei Raumtemperatur gelagert. Die Extraktion sollte innerhalb eines Monats nach der Probenahme durchgeführt werden. Das im Folgenden vorgestellte DNA-Extraktionsprotokoll basiert auf einem Protokoll, das vom NucleoSpin® Soil-Kit (MACHEREY-NAGEL) mit spezifischen Modifikationen übernommen wurde.

Protokoll:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/dt1.1.2.--8.1-fish dna extraction sterivex.pdf>



(3) Fisch DNA Extraktion von Glasfaserfiltern (GFC) unter Verwendung des DNeasy PowerWater® Kits

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wird eine zusätzliche Methode zur Gewinnung von Fisch DNA verwendet, die sich in früheren Tests im Rahmen des Eco-AlpsWater Projekts als wirksam erwiesen hat. Für die punktuelle Entnahme von Fisch-eDNA wurden Wasserproben (je 5 Liter) in verschiedenen alpinen Gewässern gesammelt (z.B. Abb. 8) und durch GFC-Filter (1,2 µm) gefiltert. Nach der Filtration wurden die Proben bis zur DNA-Extraktion bei -20 °C gelagert. Die DNA-Extraktion erfolgt nach dem vom Hersteller (Qiagen) beschriebenen Protokoll für die Analyse von Filtermembranen (einschließlich GFC) mit dem DNeasy PowerWater® Kit.



Abbildung 8. Juvenile Bachforellen (*Salmo trutta*) in einem Alpenfluss.



IV. Protokolle zur Vorbereitung der DNA-Bibliotheken (Abb. 1, Schritt 3-4)

DNA-Bibliotheken Protokoll für Diatomeen

PCR-Amplifikation des rbcL-Gens für nachgeschaltete bioinformatische Analysen und die taxonomische Klassifizierung von Kieselalgen (Bacillariophyta, Abb. 9)

Verschiedene Studien haben bereits das Potenzial von Diatomeen-Metabarcoding Anwendungen für die Bewertung der Süßwasserqualität aufgezeigt. Die Wahl des Markergens und der Barcoderegion ist entscheidend für die Erstellung relevanter Bestandsaufnahmen der Diversität und die genaue taxonomische Zuordnung. Für benthische Diatomeen hat sich das rbcL-Gen als geeigneter taxonomischer Marker für das Biomonitoring erwiesen und eine gut kuratierte Barcode-Referenzbibliothek ist bereits verfügbar, um rbcL-Sequenzen Artnamen zuzuordnen (R-Syst::diatom). Im Rahmen des Eco-AlpsWater Projekts wurden Biofilmprouben in Flüssen und an Seeufern gesammelt und die DNA wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben extrahiert. Im Folgenden werden die verschiedenen Schritte des DNA-basierten Arbeitsablaufs vorgestellt (d.h. PCR-Amplifikation ausgewählter Barcodes und Nasslaborverfahren zur Vorbereitung der DNA-Bibliothek für die anschließende MiSeq-Sequenzierung). Dieses Protokoll wurde in kürzlich publizierten Studien verwendet, in denen die Metabarcodierung von Diatomeen zur ökologischen Bewertung von Flüssen eingesetzt wurde.

Protokoll:

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bd94i98w](https://doi.org/10.17504/protocols.io.bd94i98w)



Abbildung 9. Kieselalgenarten unter dem Lichtmikroskop (*Diatoma*, *Achnanthidium*, *Navicula*).



DNA-Bibliotheken Protokoll für Bakterien

PCR-Amplifikation von 16S rRNA-Genen für nachgeschaltete bioinformatische Analysen und der taxonomische Klassifizierung von Bakterien und Cyanobakterien

Dieses Protokoll enthält die grundlegenden Elemente, die für die Identifizierung von Bakterien im Rahmen des Projekts Eco-AlpsWater verwendet wurden. Die Analysen wurden an DNA durchgeführt, die aus Proben aus der Wassersäule von Seen und aus Biofilmen in Flüssen und an Seeufern entnommen wurde (z.B. Abb. 10). Der für die Identifizierung von Bakterien verwendete Marker ist das 16S rRNA-Gen, das bei der taxonomischen Bestimmung und phylogenetischen Analyse von Bakteriengemeinschaften noch immer weit verbreitet ist. Insbesondere wurde die PCR-Amplifikation dieses Markers in der genomischen DNA aus Umweltproben durchgeführt, indem ein Fragment von ca. 460 bp (Basenpaaren) in den variablen Regionen V3-V4 ausgewählt wurde. Neben dem gesamten Spektrum an Bakterienklassen enthalten die auf diese Weise vorbereiteten Bibliotheken auch DNA-Sequenzen von Cyanobakterien, die eines der wichtigsten biologischen Elemente im Umwelt-Biomonitoring und dem Monitoring von Gewässern für den Trink- und Freizeitgebrauch sind. Das bakterielle Primer-Set umfasst: 341F (5' CCTACGGGNGGCWGCAG 3') und 805Rmod (5' GACTACNVGGGTWTCTAATCC 3') mit überhängenden Illumina-Adaptoren. Dieses Primer-Paar wird weltweit bei der Bewertung der bakteriellen Artenvielfalt in aquatischen Ökosystemen eingesetzt. Die Vorbereitung der Bibliothek erfolgte nach einem Standardverfahren, das im untenstehenden Protokoll beschrieben ist.

Protokoll:

https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/d.t1.3.1-10-validated_library_prep_16s.pdf



Abbildung 10. Cyanobakterienblüte von *Planktothrix rubescens* im Ledrosee (Italienische Alpen).



DNA-Bibliotheken Protokoll für Protisten

PCR-Amplifikation von 18S rRNA-Genen für nachgeschaltete bioinformatische Analysen und der taxonomische Klassifizierung von Protisten (einschließlich Mikroalgen)

Protisten sind eine polyphyletische Gruppe eukaryotischer Organismen, die Gruppen umfasst, die enger mit Pflanzen, Pilzen oder Tieren verwandt sind als mit anderen Protisten (z.B. Abb. 11). Neben heterotrophen Protisten und mikroskopisch kleinen Pilzen sind photosynthetische und mixotrophe Protisten oder "Algen" in vielen Supergruppen verstreut, zusammen mit vielen anderen Protozoen, mit Ausnahme der Archaeplastida, die eine eigene Gruppe bilden. Dieses Protokoll enthält die grundlegenden Elemente, die für die Identifizierung von Protisten im Rahmen des Projekts Eco-AlpsWater verwendet wurden. Die Analysen wurden mit DNA durchgeführt, die aus Proben aus der Wassersäule von Seen und Biofilmen aus Flüssen und Seeufern gewonnen wurde (siehe vorherige Abschnitte). Der für die Identifizierung von Protisten verwendete Marker ist das 18S rRNA-Gen. Die PCR-Amplifikation des 18S rRNA-Gens erfolgt durch Auswahl eines ~380 bp-Fragments der variablen Region V4 des 18S rRNA-Gens unter Verwendung des spezifischen Primer-Sets: TAREuk454FWD1 (5' CCAGCASCYGC GGTAATTCC 3') und TAREukREV3_modified (5' ACTTTCGTTCTTGATYRATGA 3'). Dieses Primer-Paar wird häufig zur Bewertung der mikro-eukaryotischen Biodiversität in Gewässern verwendet. Die Vorbereitung der 18S rRNA-Genbibliothek erfolgte nach einem Standardverfahren, das in dem unten angegebenen Protokoll beschrieben ist.

Protokoll:

https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/d.t1.3.1-11-validated_library_prep_18s.pdf

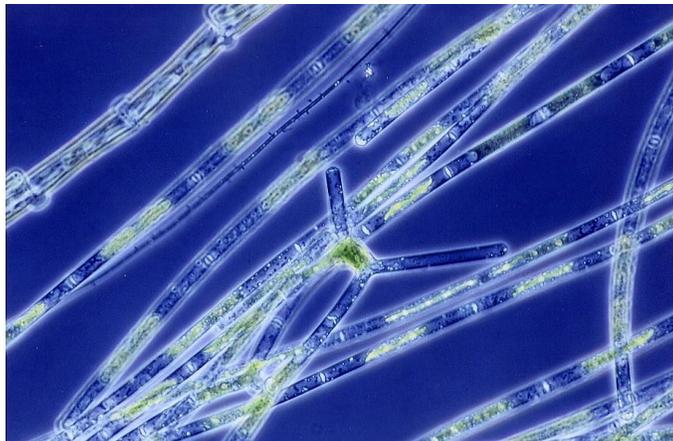


Abbildung 11. Die grüne Mikroalge *Mougeotia sp.* aus dem Gardasee, Italien; die Fäden sind etwa 7 µm breit.



DNA-Bibliotheken Protokoll für Fische

PCR-Amplifikation von 12S rRNA-Genen für nachgeschaltete bioinformatische Analysen und der taxonomische Klassifizierung von Fischen

Das Ziel dieses Dokuments ist es, eine detaillierte Beschreibung des Illumina-Protokolls für eDNA-Metabarcoding-Analysen von Süßwasserfischgemeinschaften (z.B. Abb. 12) zu liefern, die zuvor durch einen Interkalibrierungstest bewertet und verifiziert wurden. Dieses Protokoll wurde an der Sequenzier- und Genotypisierungsplattform der FEM (Fondazione Edmund Mach) für die Analyse der im Jahr 2019, im Rahmen des Eco-AlpsWater Projekts gesammelten Proben, verwendet. Das Protokoll in seiner jetzigen Form ist jedoch noch verbesserungsfähig, und die Bewertung der Replizierbarkeit und Robustheit von Ansätzen, die auf verschiedenen Protokollen basieren, wird noch getestet.

Protokoll:

https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/d.t1.1.2.-12library_preparation_12s.pdf



Abbildung 12. Europäischer Aal (*Anguilla anguilla*), eine schlangenartige, wandernde Fischart.



V. Protokolle für die bioinformatische Analyse von DNA Sequenzen (Abb. 1, Schritt 5-6)

Bioinformatische Pipeline für Diatomeen

Diatomeen Metabarcoding Pipeline "Mothur"-Software, Miseq, rbcL 312 bp

Dieses Protokoll beschreibt im Detail die wichtigsten Schritte der bioinformatischen Prozesse, die zur Analyse von Hochdurchsatz-Sequenzierungsdaten (HTS), insbesondere für das Metabarcoding von Diatomeen, angewendet werden. Diatomeen sind eines der wichtigsten biologischen Elemente in Seen und Flüssen (z.B. Abb. 13).

Protokoll:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/deliverables-final/dt1.1.3.--1-bioinformatic-diatoms.pdf>

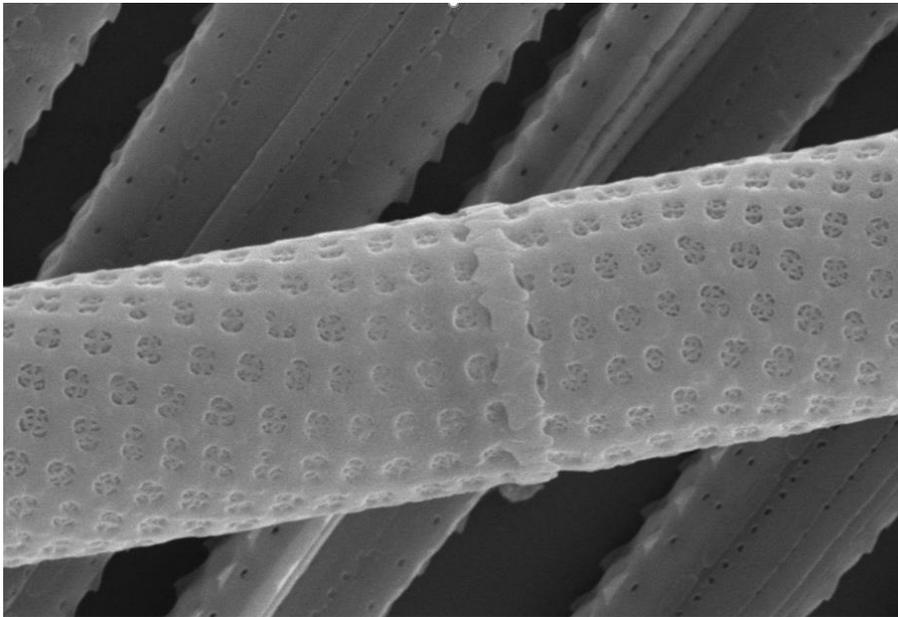


Abbildung 13. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Aulacoseira granulata* und (Hintergrund) *Fragilaria crotonensis* aus dem Gardasee.



Bioinformatische Pipeline für Bakterien (16S rRNA-Gen)

Bioinformatische-Analyse von Bakterien (einschließlich Cyanobakterien) unter Verwendung des 16S rRNA-Gens und einer DADA2-Pipeline

In diesem Protokoll werden die wichtigsten Schritte der Bioinformatik-Pipeline beschrieben, die zur Analyse der 16S rRNA-Gen-Daten aus der Hochdurchsatzsequenzierung (HTS) speziell für die Bestimmung von Bakterien und Cyanobakterien verwendet wird (Abb. 14). Die Pipeline basiert auf der Identifizierung von exakten Sequenzen (Amplicon Sequence Variants, ASVs) unter Verwendung des DADA2-Ansatzes. Das Protokoll und die Test-Dateien können von Zenodo heruntergeladen werden.

Protokoll:

<https://doi.org/10.5281/zenodo.5232772>

Test-Dateien:

<https://doi.org/10.5281/zenodo.5215815>

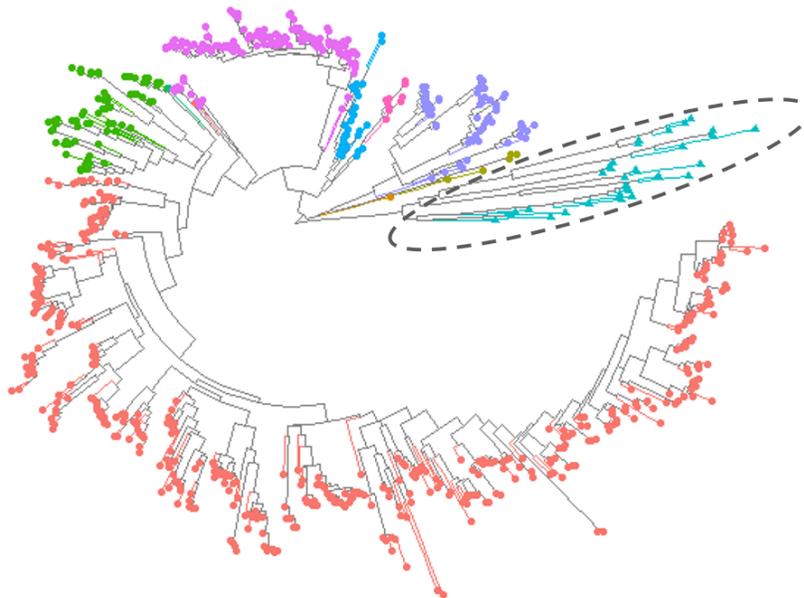


Abbildung 14. Phylogenetischer Baum auf der Grundlage des Alignments des 16S rRNA-Gens (ca. 400 bp), das mit HTS-Techniken in der Alpenraumregion gewonnen wurde. Nur die häufigsten Sequenzen (ASVs) wurden in die Analyse einbezogen. Im Vergleich zu herkömmlichen Techniken ermöglichen Umwelt-Metagenomik-Ansätze die Erforschung bisher nicht nachweisbarer Gruppen, wie z.B. die nicht-photosynthetischen Bakterien (graue gestrichelte Linie). Andere zahlreichere Gruppen sind die *Cyanobacteriales* (orange), *Limnotrichales* (grün) und *Synechococcales* (violett).



Bioinformatische Pipeline für Protisten (18S rRNA-Gen)

Bioinformatische Analyse von Protisten (einschließlich Mikroalgen) unter Verwendung des 18S rRNA-Gens und einer DADA2-Pipeline

In diesem Protokoll werden die wichtigsten Schritte der Bioinformatischen-Pipeline beschrieben, die zur Analyse der 18S rRNA-Gen-Daten aus der Hochdurchsatzsequenzierung (HTS) speziell für das Metabarcoding von Protisten und Mikroalgen eingesetzt wird (Abb. 15). Die Pipeline basiert auf der Identifizierung von exakten Sequenzen (Amplicon Sequence Variants, ASVs) unter Verwendung des DADA2-Ansatzes. Das Protokoll und die Test-Dateien können von Zenodo heruntergeladen werden.

Protokoll:

<https://doi.org/10.5281/zenodo.5233527>

Test-Dateien:

<https://doi.org/10.5281/zenodo.5215919>

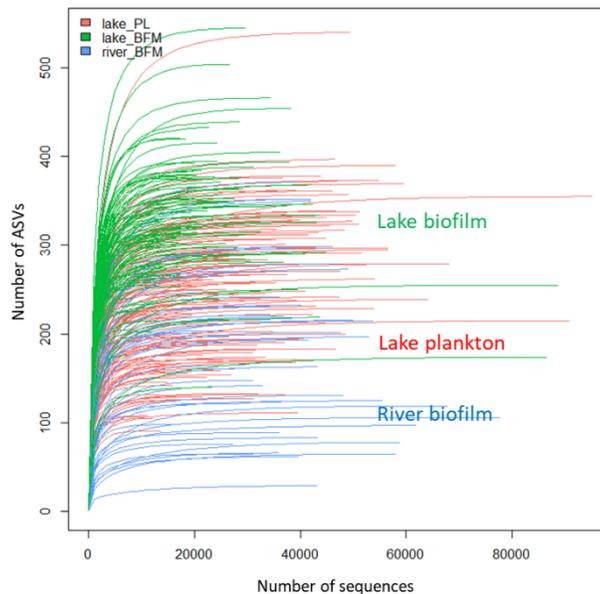


Abbildung 15. Rarefaction-Kurven von Protisten und Pilzen, die die Zunahme der Anzahl der ASVs mit der Zunahme der Anzahl der Sequenzen zeigen. Rarefaction wird verwendet, um den Reichtum an ASVs für eine gegebene Anzahl von Sequenzen zu schätzen, was eine Normalisierung der Häufigkeiten über Proben hinweg ermöglicht. In der Abbildung bezieht sich jede Kurve auf eine einzelne Probe. Im Durchschnitt werden die meisten ASVs im Biofilm von Seen gefunden.



VI. Harmonisierung der Ansätze in der Europäischen Gemeinschaft und der Schweiz

Die Etablierung gemeinsamer transnationaler Ansätze und Protokolle für das Monitoring der Wasserqualität im Alpenraum ist eines der Hauptziele des Eco-AlpsWater Projekts. In diesem Bereich wenden die meisten Länder nationale/regionale Methoden an, die mit der Wasserrahmenrichtlinie übereinstimmen. Es wurden jedoch einige Unterschiede zwischen den Ländern festgestellt. Außerdem wendet die Schweiz als Nicht-EU-Land Methoden an, die auf der Schweizer Gewässerschutzverordnung (GSchV) basieren. Daher wird die Harmonisierung der Ansätze zur Bewertung der Wasserqualität im gesamten Alpenraum empfohlen. Im Rahmen des EAW-Projekts wurde untersucht, wie und wo innovative Ansätze auf der Grundlage von eDNA- und HTS-Technologien die Lücken und Schwächen traditioneller Methoden überbrücken könnten, um einen länderübergreifenden Monitoringansatz der nächsten Generation für den Alpenraum zu entwickeln.

Die sechs wichtigsten Seen (Bleder See, See von Le Bourget, Gardasee, Luganersee, Mondsee und Starnberger See) und die fünf wichtigsten Flüsse (Etsch, Drome, Soča, Steyr und Wertach), die im Rahmen des Eco-AlpsWater Projekts als Pilotstandorte ausgewählt wurden, wurden für einen Vergleich der Methoden, zur Bestimmung des ökologischen Zustands auf der Grundlage von biologischen Qualitätskomponenten (Phytoplankton, Phytobenthos und Fische), verwendet. Diese breit angelegte Untersuchung im Alpenraum zeigte die Schwächen und die potenzielle Umsetzung von Ansätzen innerhalb und zwischen den Ländern im Zusammenhang mit früheren Interkalibrierungsprozessen auf.

Anforderungen der EU-WFD und CH-WPO

Die Länder des Alpenraums, die der EU angehören, wenden regionale/nationale Methoden auf der Grundlage der WRRL an. In den letzten Jahren wurden Interkalibrierungsprozesse (IC) durchgeführt, die eine Harmonisierung der Ansätze zwischen den Ländern ermöglichten (z.B. Phytoplankton). Obwohl in jedem Land unterschiedliche Indizes verwendet werden, wird die Bewertung des ökologischen Zustands überall in fünf Qualitätsklassen (hoch, gut, mäßig, schlecht, schlecht) angegeben, um einen möglichst korrekten Vergleich der Wasserkörper zu gewährleisten (<https://ec.europa.eu/environment/pubs/pdf/factsheets/water-framework-directive.pdf>).

In der Schweiz wurde das schweizerische modulare Stufenverfahren entwickelt, das Zustandsklassen beinhaltet, die mit dem in der WRRL definierten System der ökologischen Klassen vergleichbar sind. Basierend auf der WRRL wurden vom Bundesamt für Umwelt (BAFU) Methoden für die Bestimmung des ökologischen Zustands anhand der biologischen Qualitätskomponenten entwickelt. Diese Protokolle stellen jedoch nur Richtlinien für die Kantone dar, die in ihrer Gesetzgebungskompetenz über die Bedingungen ihrer Anwendung auf ihrem eigenen Gebiet entscheiden. Zurzeit sind nur Methoden für Kieselalgen und Fische in Flüssen veröffentlicht worden. Im Laufe der Jahre hat aber auch jeder Kanton seine eigenen Protokolle angewandt (z.B. Phytoplankton), eine Vereinheitlichung auf Bundesebene ist aber bereits in der Entwicklung. Darüber hinaus stehen die grenzüberschreitenden Gewässer (Schweiz-EU) unter der Kontrolle von internationalen Kommissionen (z.B. CIPAI, CIPEL, IGKB), die spezifische Ziele verfolgen und verschiedene Arten von



Qualitätsindikatoren verwenden, die manchmal im Widerspruch zu den Gesetzen der WRRL und der WPO stehen. Im Luganersee an der Grenze zwischen der Schweiz und Italien beispielsweise variieren die Referenzbedingungen zwischen den beteiligten Verordnungen: In der WRRL sollte ein guter ökologischer Zustand erreicht oder erhalten werden; in der WPO sollte ein naturnaher ökologischer Zustand erreicht werden, mit einer Vielfalt und Abundanz von Arten, die für unbelastete oder gering verschmutzte Gewässer spezifisch sind; in CIP AIS wird der Referenz- zustand durch mesotrophe Bedingungen dargestellt. Die unterschiedlichen Ansätze zur Bewertung der Wasserqualität in der Schweiz sind daher ein deutliches Beispiel für die Notwendigkeit einer Homogenisierung.

Neben der den Unterschieden zur Schweiz, hat die Erhebung, die zunächst in den wichtigsten Seen und Flüssen durchgeführt und dann auf den gesamten Alpenraum ausgedehnt wurde, auch die Unterschiede bezüglich der Anwendung der WRRL zwischen den EU-Ländern aufgezeigt. In einigen Ländern ist die Standardisierung der Methoden für einige BQE noch in der Entwicklung oder hat noch nicht begonnen. Ein Überblick über die Anwendung von BQE-Methoden zur Bewertung der Wasserqualität im Alpenraum (Tab. 1). Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Alpenraum (Tab. 2).

Tabelle 1. Eine Zusammenfassung der Anwendung von BQE-Methoden zur Bewertung der Wasserqualität im Alpenraum (Phytoplankton, benthische Kieselalgen und Mikroalgen sowie Fische).

Alpenraum BQE Methoden		Phytoplankton	Benthische Diatomeen	Benthische Mikroalgen (ohne Diatomeen)	Fische
Österreich	Seen	ja	nein	ja	ja
	Flüsse		ja	ja	ja
Frankreich	Seen	ja	nein *	nein	ja
	Flüsse		ja	nein	ja
Italien	Seen	ja	ja	nein	ja
	Flüsse		ja	ja †	ja
Deutschland	Seen	ja	ja	nein	ja
	Flüsse		ja	ja †††	ja
Slowenien	Seen	ja	ja	ja ††	ja
	Flüsse		ja	ja ††	ja
Schweiz	Seen	ja	nein	nein	nein
	Flüsse		ja	nein	ja

* Methode in Entwicklung ° Methode auf Kantonebene verfügbar

† Benthische Mikroalgen werden beim Monitoring von Flussmakrophyten berücksichtigt, wenn sie makroskopische Aggregate bilden. †† Nur auf bestimmte Algengruppen beschränkt

††† Im DE Verfahren PHYLIB mit vielen Indikatorarten berücksichtigt (im Projekt Analyse nicht durchgeführt)



Der Vergleich der Merkmale der BQE-Methoden, zeigte grundsätzlich eine gute Übereinstimmung, was die Durchführbarkeit der Homogenisierung unterstützt. Wie aus der obigen Tabelle hervorgeht, sind die Methoden zum Monitoring des Phytoplanktons in Seen in den einzelnen Ländern fast identisch, mit Ausnahme der Häufigkeit der Probenahme. Wie bereits erwähnt, wird das Monitoring des Phytobenthos derzeit weiterentwickelt bzw. ausgeweitet, da einige Länder diese BQE-Untersuchungen bisher ausschließlich in Flüsse angewendet haben. Außerdem werden in einigen Ländern auch fadenförmige Grünalgen erfasst (z.B. Slowenien), während in den meisten Ländern nur Kieselalgen berücksichtigt werden. Zwei weitere wichtige Aspekte variieren beim Monitoring des Phytobenthos: Die Anzahl der Probenahme-Stationen sowie die Häufigkeit der Probenahmen. Diese Aspekte variieren auch beim Monitoring von Fischen. Diese Unterschiede zeigen das Potential einer Verbesserung der traditionellen Methoden durch eine Harmonisierung der unterschiedlichen Ansätze.

Tabelle 2. Ähnlichkeiten und Unterschiede beim Monitoring von Seen und Flüssen im Alpenraum für Phytoplankton, Phytobenthos und Fische.

Biologisches Qualitäts Element (BQE)		Ähnlichkeiten	Unterschiede
Phytoplankton	Seen	Probenahmestelle (max. Tiefe) Probenammetiefe (Epilimnion/euphotische Tiefe) Biovolumen (Utermöhl) und Chlorophyll-a (ISO) Identifizierung auf Artniveau	Häufigkeit der Probenahme
Phytobenthos	Seen	Probenahmezeitraum Substrat-Typ Habitat Identifizierung von Arten/Gattungen	Biologische Gemeinschaft (Phytobenthos ohne Kieselalgen) Anzahl der Probenahmestellen Häufigkeit der Probenahme
	Flüsse	Probenahmezeitraum Merkmale der Probenahmestellen Substrat Typ Habitat Identifizierung von Arten/Gattungen	Biologische Gemeinschaft (Phytobenthos ohne Kieselalgen) Anzahl der Probenahmestellen Häufigkeit der Probenahme
Fische	Seen	Zeitraum der Probenahme Beprobungsstrategien Identifizierung auf Artniveau	Anzahl der Probenahmestationen (Oberfläche/Tiefe)
	Flüsse	Zeitraum der Probenahme Beprobungs-Strategien Habitat Identifizierung auf Artniveau	Anzahl der Probenahmestationen Häufigkeit der Probenahme



Die aufgezeigten Unterschiede sprechen für den Einsatz von HTS zur Verbesserung und Homogenisierung der Ansätze im gesamten Alpenraum. Neben dem Potenzial von HTS bei der Untersuchung der biologischen Vielfalt könnte Metagenomik zum Beispiel dabei helfen, die räumlich-zeitliche und taxonomische Abdeckung beim Monitoring zu erhöhen und den Zeit- und Kostenaufwand für die Analysen zu verringern. Die innovativen, innerhalb des Eco-AlpsWater Projekts entwickelten Protokolle, wurden an das traditionelle Monitoring der WRRL/WPO angepasst, um die biologische Vielfalt der aquatischen Ökosysteme zu erforschen und ein vollständigeres Taxa-Verzeichnis zu erstellen. Dieser Prozess war dank der Zusammenarbeit mit Beobachtern und Interessensvertretern möglich, die ihr Feedback für die Abstimmung der Ansätze zur Verfügung stellten.

Monitoring-Ansätze der nächsten Generation

Die Integration innovativer Methoden auf der Grundlage von eDNA-Analysen und HTS-Technologien in die nächsten Monitoring-Ansätze zur Bewertung der biologischen Vielfalt und des ökologischen Zustands von Gewässern, wurde von den Interessensvertretern und politischen Entscheidungsträgern positiv aufgenommen. Sie identifizierten potenzielle Vorteile und Möglichkeiten:

- Mehr Informationen durch eine einzige Probenahme
- Erhöhung der räumlich-zeitlichen Abdeckung beim Monitoring
- Möglichkeit der Beprobung schwer zugänglicher Orte und der Untersuchung komplexer Umgebungen
- Untersuchung eines größeren Teils der biologischen Vielfalt, einschließlich biologischer Gruppen, deren Taxonomie komplex und zeitaufwendig ist
- Zusatzinformationen durch Taxa, die durch traditionelle Methoden nicht berücksichtigt werden um ein taxonomisch vollständigeres Inventar zu erhalten und zusätzliche ökologische Fragen zu beantworten
- Nachweis von nicht einheimischen und einheimischen (z.B. seltenen) Arten
- Erkennung von Krankheitserregern und Vektoren
- Geringere Invasivität (z.B. bei Fisch-Probenahmen und in empfindlichen Ökosystemen)
- Schneller, kostengünstiger (mögliche Analyse zahlreicher Proben)

All diese positiven Aspekte sprechen für den Einsatz des eDNA-Ansatzes als ergänzendes Instrument zu den bestehenden Methoden für die Bewertung des ökologischen Zustands, die Wasserbewirtschaftung sowie als Möglichkeit, die Harmonisierung der EU- und CH-Ansätze zu erleichtern. Um dieses Ziel zu erreichen, sind nationale Strategien erforderlich, einschließlich einer Standardisierung der eDNA-Ansätze, der Einrichtung umfassender Referenzdatenbanken und des Erwerbs neuer Kompetenzen durch die für das Monitoring der Wasserqualität zuständigen Umweltbehörden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der transnationale innovative Ansatz ein strategisches Element zur Verbesserung des Schutzes, der Erhaltung und der ökologischen Vernetzung der Ökosysteme des Alpenraums darstellt und das Potenzial hat, auch auf breiterer europäischer Ebene angewendet zu werden.



VII.FAQ - allgemeine Perspektive

Bei unseren Treffen mit Interessensgruppen haben wir Fragen (FAQ) zum Metabarcoding-Ansatz gesammelt. Hier finden Sie eher allgemeine Antworten, aber auch Antworten aus wissenschaftlicher Sicht auf unserer Webseite ([FAQ Catalogue](#)).

Warum werden beim Eco-AlpsWater Metabarcoding-Ansatz mehrere Primer verwendet?

Wir benötigen mehrere Primer, da verschiedene Ziel-DNA-Regionen zur Unterscheidung von Organismen verwendet werden und die phylogenetischen Beziehungen der biologischen Zielorganismen wie Bakterien, Mikroalgen und Fische nicht eng sind.

Woran liegt es, dass mit dem Eco-AlpsWater Metabarcoding-Ansatz für Mikroalgen keine feine taxonomische Auflösung (auf Artniveau) erreicht werden kann?

Mikroalgen gehören zu sehr unterschiedlichen Phyla des Evolutionsbaums. Daher haben wir generalistische Marker verwendet, um die globalen mikrobiellen Zusammensetzungen zu erkennen. Mit diesen Markern wurden viele verborgene Arten gefunden, aber umgekehrt konnten sie manche Gruppen traditioneller Indikatorarten nicht erkennen. Darüber hinaus sind mehrere Arten, die in der Literatur beschrieben wurden, in den molekularen Referenzdatenbanken noch nicht vertreten.

Wie lassen sich Taxa-Inventare mit einer Mischung aus Arten, Gattungen und Ordnungen vergleichen?

Sowohl die HTS- als auch die Lichtmikroskopie-Methoden können dieselbe Gattung, aber verschiedene Arten nachweisen oder nur die Gattung. Das Eco-AlpsWater Taxa-Analyse-Tool liefert Übereinstimmungstabellen für Gattungen oder Arten getrennt für Cyanobakterien und Eukaryoten.

Wie ist der Name einer Art zu interpretieren, die unter mehreren DNA-Sequenzen in den Metabarcoding-Ergebnissen aufgeführt ist?

Die Anzahl der DNA-Sequenzen (Amplikonsequenzvarianten, ASVs oder Oligotypen), die zu einer einzigen Art (Taxon) gehören, ist ein Indikator für die intraspezifische (Intra-Taxon) genetische Vielfalt. Das Eco-AlpsWater Taxa-Analyse-Tool führt alle Sequenzen zusammen, die zum selben Taxon gehören, und fasst das Ergebnis in einem "vorliegenden" Datensatz zusammen.

Wie wähle ich meine Ziel-Taxa aus? Ich sehe Metabarcoding-Ergebnislisten mit vielen Taxon-Namen, die ich noch nie gehört habe.

Die Taxon-Namen in den Metabarcoding-Listen sind aktuell, so dass viele biologische Namen für den Benutzer neu sein können. Die Nutzer sind nur mit den Namen aus dem traditionellen Monitoring vertraut, wobei die Taxa-Namen häufig synonym mit den aktualisierten Taxa-Namen sind und in einer



altmodischen Systematik gruppiert sind. Gemeinsame Codes und Taxa-Namen für Phytoplankton und benthische Diatomeen werden im Eco-AlpsWater Taxa-Analyse-Tool zum Vergleich der Listen verwendet.

Wie lange bleibt die eDNA im Wasser? Sind die eDNA verschiedener Organismen unterschiedlich resistent? Wie lange können tote Organismen eDNA ausscheiden?

Unter dem Begriff "Umwelt-DNA" (eDNA) verstehen wir das gesamte Erbgut aller Organismen, die in der Umwelt vorkommen (oder vorkamen). Dieses genetische Material kann direkt aus den Zellen von Mikroorganismen stammen, die zusammen mit Wasser beprobt werden (z.B. mikroskopisch kleine Algen oder Bakterien). Bei größeren Organismen (z.B. Fischen oder Menschen) wird es durch Körpersekrete, abgestorbene Haut und Haare in die Umwelt eingetragen und kann in Form von DNA-Molekülen in der aquatischen Umwelt mehrere Tage oder sogar Wochen lang gespeichert werden. Die Stabilität der DNA in der aquatischen Umwelt hängt von den Umweltbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff, Licht und andere Stoffe im Wasser) ab. Wenn die DNA in den Sedimenten am Grund von Gewässern eingeschlossen ist, kann sie dort Jahre oder Jahrzehnte, in manchen Fällen sogar Jahrtausende, verbleiben, was die Tür für paläoökologische Forschungen öffnet.

Warum haben Sie Makrophyten und benthische Invertebraten als Biologische Qualitätselemente nicht untersucht?

Aufgrund der finanziellen Beschränkungen des Projekts wurden diese beiden, ansonsten äußerst wichtigen biologischen Elemente nicht berücksichtigt.

Kann das 18S rRNA-Gen Euglena und andere Eugleniden nachweisen?

Im Allgemeinen kann kein Primer-Paar alle Protisten gleichermaßen gut erfassen. Das spezifische Primer-Paar, das für die Amplifikation des 18S rRNA-Gens ausgewählt wurde, war nicht in der Lage, Eugleniden in Wasserproben nachzuweisen. Stattdessen nutzen wir Informationen aus dem Chloroplasten-16S-rRNA-Gen, um diese Gruppe nachzuweisen.

Welche taxonomische Ebene kann mit welchem Marker erreicht werden?

Dies hängt von den ausgewählten Organismengruppen und Genregionen sowie von der Vollständigkeit der Referenzdatenbanken ab. Während die genetischen Marker für Diatomeen hochkuratiert und spezialisiert sind, sind die Marker für Bakterien und Phytoplankton allgemeiner. Daher kann mit dem ersten Marker (rbcL) eine detailliertere Klassifizierung vorgenommen werden, während mit der zweiten Gruppe von Markern (16S und 18S rRNA) hauptsächlich Gattungen oder höhere taxonomische Ränge nachgewiesen werden. Um Organismen auf Artniveau zu identifizieren, sollten sehr spezifische Primer in Verbindung mit spezifischen taxonomischen Referenzdatenbanken verwendet werden. Um die in den Sequenzen enthaltenen Informationen voll auszuschöpfen, sollten auch weitere



phylogenetische Analysen durchgeführt werden, um die aus bioinformatischen Pipelines oder BLAST-Analysen gewonnenen Klassifizierungen zu unterstützen und zu ergänzen.

Welche Taxa wurden mit jedem Marker im Eco-AlpsWater Datensatz nachgewiesen?

Die vollständige Liste der Taxa und Genotypen, die mittels HTS im Eco-AlpsWater Datensatz nachgewiesen wurden, ist in der HTS-Taxonomie-Liste der einzelnen Marker angeführt. Wenn wir uns auf Arten oder Gattungen der Biokomponenten konzentrieren (die mit gemeinsamen Eco-AlpsWater Codes verbunden sind), haben wir 88 Cyanobakterien-, 582 Phytoplankton- (ohne Cyanobakterien), 226 Kieselalgen- und 54 Fisch-Taxa nachgewiesen, viele von ihnen mit mehreren Genotypen. Die Listen sind in das Eco-AlpsWater-Taxa-Analysetool aufgenommen worden.

Welche besonderen logistischen Anforderungen sind bei der Entnahme von eDNA aus Planktonproben erforderlich?

Im Rahmen des Eco-AlpsWater Projekts werden sterile, gekapselte Filter (Sterivex), DNA-freie Behältnisse und Handschuhe empfohlen, um die Kontamination zu verringern. Alle Einzelheiten finden Sie in unserem YouTube-Videos und den Probenahme-Protokollen. Die tiefgekühlte Lagerung der Filter bis zur DNA-Extraktion für bis zu 9 Monate war in unserem Test erfolgreich.

Wer hilft mir bei der Interpretation der HTS-Ergebnisse, wenn unbekannte Taxa mit HTS erfasst wurden?

Zusätzliche Analysen, wie z.B. BLAST-Abfragen, können ein tieferes Verständnis eng verwandter taxonomischer Arten und Gruppen ermöglichen. Verbesserte genetische Referenzdatenbanken, die für eine bestimmte taxonomische Gruppe und/oder Ökoregion kuratiert sind, können die Genauigkeit der Artenklassifizierung erhöhen.

Was ist eine BLAST-Analyse, die für Cyanobakterien durchgeführt wird?

Für Cyanobakterien und andere biologische taxonomische Gruppen wurde die automatische Taxa-Zuordnung durch die Verwendung von Referenzsequenzen aus der einschlägigen taxonomischen Literatur verbessert, d.h. durch Verwendung von (morphologisch beschriebenen) Isolaten (Stämmen) und manuellem Abgleich mit den erhaltenen Cyanobakterien-ASVs. BLASTn-induzierte Änderungen des Taxonnams für ausgewählte ASVs in 16S wurden im Eco-AlpsWater-Taxa-Analysetool markiert.

Wie funktioniert die VigiDNA®-Methode für eDNA-Proben von Fischen?

VigiDNA® ist der Produktname der Filterkartuschen, die im Rahmen des Projekts Eco-AlpsWater zur Analyse der Fischbiodiversität in alpinen Gewässern eingesetzt werden. Diese geschlossenen, gekapselten Filterkartuschen (VigiDNA®, Spygen®) werden verwendet, um große Wassermengen (bis zu 30 Liter oder mehr) zu filtern, die an Seeufern oder in der Mitte von Flüssen gesammelt werden.



Nach der Filtration wird die Filterpatrone mit einem Konservierungspuffer gefüllt und bis zur DNA-Extraktion bei Raumtemperatur gelagert. Diese Methode wird vom EAW Konsortium, aufgrund zahlreicher Komplikationen (Details finden Sie im Fisch-Probenahme Protokoll), nicht mehr empfohlen.

Welche Flusstypen eignen sich für die Analyse mit dem VigiDNA®-System?

Grundsätzlich ist dieses System für jede Art von Fluss geeignet und ermöglicht die Filterung von bis zu 30 Litern Wasser mit einer einzigen Kartusche. Allerdings kann es in Flüssen mit erhöhter Partikelbelastung im Wasser eine Herausforderung darstellen, da feine Sedimente den Filter verstopfen können, bevor die gewünschten 30 Liter gefiltert wurden. Daher ist es ratsam, die Probenahme entsprechend anzupassen, z.B. sollten die Proben nicht während oder kurz nach Hochwasserereignissen entnommen werden. Diese Methode wird vom EAW Konsortium, aufgrund zahlreicher Komplikationen (z.B. schlechte Reproduzierbarkeit und mangelnde Datenqualität - Details dazu, finden Sie im Fisch-Probenahme Protokoll), nicht mehr empfohlen.

Welches Primer-Paar wird für die eDNA-Analyse von Fischen verwendet?

Für die Sequenzierung von Fisch-eDNA-Proben wurden die MiFish-U-Primer verwendet. Dieses Primer-Paar wird regelmäßig für Metabarcoding-Studien an Fischen verwendet.

Können eDNA-Nachweise einem bestimmten Flussabschnitt zugeordnet werden?

Dies hängt von der Art der Probenahme ab. Da die eDNA ständig stromabwärts transportiert wird, können in der Folgeanalyse nur Fischarten nachgewiesen werden, die stromaufwärts der Probenahmestelle vorkommen.

Kann aus der Häufigkeit der entdeckten Sequenzen pro Art auf die Anzahl der Individuen geschlossen werden?

Nein, bisher ist es nicht möglich, anhand der Anzahl der erkannten Reads genaue Aussagen über die absolute Häufigkeit verschiedener Fischarten zu machen.

Welche verschiedenen Ansätze zur Bewertung der eDNA von Fischen wurden im Rahmen des Eco-AlpsWater Projekts verwendet?

Insgesamt wurden 3 verschiedene Ansätze verwendet. Der VigiDNA-Ansatz, bei dem 30 Liter Wasser durch eine gekapselte Filterpatrone gefiltert werden. Der Sterivex®-Ansatz (0,45 µm Porosität), bei dem 2 Liter Wasser am Anfang, in der Mitte und am Ende jedes VigiDNA-Transektivs am Seeufer gesammelt wurden. Und ein GFC-Ansatz (Glasfaserfilter, 1,2 µm nominale Porosität), bei dem 5 Liter Wasser an den traditionellen Probenahmestellen gesammelt wurden. Der GFC Ansatz sowie der Sterivex Ansatz lieferten die besten Ergebnisse.



Treten Sie unserem Eco-AlpsWater Netzwerk bei:

<https://www.alpine-space.org/projects/eco-alpswater/en/project-results/Eco-AlpsWater-alpine-network>

und verfolgen Sie unsere Eco-AlpsWater Aktivitäten weiter!



Diese Broschüre wurde im Rahmen des Projekts Eco-AlpsWater erstellt, das teilweise von der Europäischen Union aus dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung finanziert wird (Unterstützung durch die EU: 1.447.666,54 €). Das Projekt wurde im Rahmen des INTERREG-Programms für transnationale Zusammenarbeit im Alpenraum für den Zeitraum 2014-2020 durchgeführt.

