



# PILOTSTUDIE ZUR ERFASSUNG AQUATISCHER LEBENSFORMEN MITTELS EDNA & METABARCODING



Bericht zum „Glücksspirale-Projekt“ 2016  
der BGS Oberfranken

Gefördert durch den Bayerischen Naturschutzfonds  
aus Mitteln der Glücksspirale

## INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG .....	4
SUMMARY .....	4
EINLEITUNG .....	5
<i>Die Methode „environmental DNA“ (eDNA)</i> .....	6
<i>DNA Barcoding &amp; Referenzdatenbanken</i> .....	8
<i>Pilotstudien</i> .....	9
MATERIAL & METHODEN .....	10
<i>Projektgebiet</i> .....	10
<i>Untersuchte Gewässer</i> .....	12
Craimoosweiher .....	12
Eremitage   Untere Grotte .....	13
LBV Lindenhof.....	14
Ottenhof.....	15
Höhle bei Plech.....	16
Regenrückhaltebecken Nördlich Plech .....	17
Aichaer Teich.....	18
Callenberger Forst.....	19
Froschgrundsee .....	20
Goldbergsee .....	21
Muggenbacher Tongruben.....	22
Theisau 1 [bei Horb].....	23
Theisau 2 [bei Burgkunstadt] .....	24
<i>Beprobung</i> .....	25
<i>Primerdesign</i> .....	26
<i>DNA Extraktion &amp; Quantifizierung</i> .....	35
ERGEBNISSE .....	38
<i>Untersuchte Gewässer (inkl. Teildiskussion)</i> .....	39
Craimoosweiher .....	39
Eremitage   Untere Grotte .....	39
LBV Lindenhof.....	40
Ottenhof.....	40
Höhle bei Plech.....	40
Regenrückhaltebecken Nördlich Plech .....	40
Aichaer Teich.....	40

Callenberger Forst.....	41
Froschgrundsee .....	41
Goldbergsee .....	41
Muggendorfer Tongruben.....	41
Theisau 1 [bei Horb].....	41
Theisau 2 [bei Burgkunstadt] .....	41
<i>Zielarten</i> .....	41
DISKUSSION .....	49
DANKSAGUNG .....	50
LITERATUR .....	50
IMPRESSUM .....	53

## ZUSAMMENFASSUNG

Wer bisher die Artenvielfalt, zum Beispiel in einem Gewässer, bestimmen wollte, der musste die darin lebenden Organismen kartieren oder einsammeln und Art für Art bestimmen. Die Analyse von Umwelt-DNA (eDNA), die Organismen an ihre Umwelt abgeben, könnte sich als zeit- und geldsparende Alternative erweisen. Der Nachweis über eDNA ist eine noch relativ neue Methode die immer stärker eingesetzt wird, um die Präsenz von Arten nachzuweisen. Bisher beschränkte sich die Methode vor allem auf Boden- und Wasserproben, aber sie ist auch mit Laubstreu, Kot oder Insektenfallen möglich. Dabei reichen oft kleine Proben vollkommen aus. Zum Beispiel konnte das Vorkommen des Kammmolches *Triturus cristatus* mit Wasserproben von nur 15ml nachgewiesen werden. Gerade in diesem Fall zeigte sich auch, dass über eDNA eine höhere Nachweiswahrscheinlichkeit besteht als mit den traditionellen Methoden. Rechnet man alle Kosten der verschiedenen Methoden mit ein, dann stellt sich eDNA meist auch als die billigere Variante heraus.

In dieser Pilotstudie wurden 13 Gewässer in den oberfränkischen Landkreisen Bayreuth, Coburg und Lichtenfels mittels eDNA und Metabarcoding untersucht. Zielarten für die Auswahl der Gewässer waren die Knoblauchkröte *Pelobates fuscus*, der Kammmolch *Triturus cristatus* und der Schlammpeitzger *Misgurnus fossilis*. An verschiedenen Gewässern fanden zudem Begleituntersuchungen mit traditionellen Methoden statt. Insgesamt wurde aber ein gesamtheitlicher Ansatz verfolgt und das gesamte Artinventar der entsprechenden Proben erfasst. Die Gewässer wurden dabei auch so gewählt, dass möglichst viele verschiedene Gewässertypen untersucht werden konnten.

Entgegen den Erwartungen konnten mit den DNA-Extrakten der Teichproben keine raschen Erfolge erzielt werden. Mit verschiedensten PCR-Ansätzen und Verdünnungen der Extrakte zur Reduzierung von PCR-Inhibitoren konnten keine aussichtsreich-sequenzierbaren Produkte erstellt werden. Die Proben zeigen ein sehr ähnliches PCR-Gelbild, was auf das gemeinsame Vorkommen von Mikroorganismen deutet, deren DNA sich leider besser mit den PCR-Primern amplifizieren lässt, als die DNA der Ziel-Wirbeltiere. Da die DNA-Messungen zeigten, dass prinzipiell DNA in den Proben aus gefiltertem Wasser vorliegt, und wir sicher sind, mit geeigneten Primern auch Amphibien und Fische nachweisen zu können, laufen derzeit neue Tests mit der an anderer Stelle erfolgreich eingesetzten Primerkombination.

## SUMMARY

Using environmental DNA (eDNA) to detect the presence of species from an environmental samples is a novel technique introduced only few years ago. One of the first studies used the Crested Newt *Triturus cristatus* as model species, and proofed that it was possible to detect the species in 100% of the studied ponds by a water sampling of just 15ml per pond. Compared with traditional methods the new method was more successful (higher detection probabilities) and also cheaper. In this pilot study we analyzed water samples from 13 ponds in northeastern Bavaria, selected by the presence or possible presence of the target species *Pelobates fuscus*, *Triturus cristatus* and *Misgurnus fossilis*. Some of the ponds were additionally studied by using traditional methods. Moreover, we analyzed the entire eDNA of the water samples to get an overview aof the aquatic and semi-aquatic species diversity of the studied water bodies.

## EINLEITUNG

Das Wissen darüber, wo welche Arten vorkommen ist von zentraler Bedeutung im Natur- und Artenschutz, vor allem in der Faunistik und in Bezug auf Managementpläne oder zum Beispiel Eingriffsverfahren. Kartierungen, selbst bei häufigen Arten, sind zeitaufwendig und nur mit hohem Personalaufwand zu bewerkstelligen. Daher wurden im Laufe der Zeit viele Methoden entwickelt um bestimmte Arten mit weniger Aufwand nachzuweisen (vgl. DODD 2010). Trotz einer kontinuierlichen Verbesserung der Methoden gibt es immer noch Arten, die nur sehr schwer oder mit hohem Aufwand nachzuweisen sind. Unter den Amphibien zählen dazu zum Beispiel der Kammmolch *Triturus cristatus* (LAURENTI, 1768) oder die Knoblauchkröte *Pelobates fuscus* (LAURENTI, 1768), bei den Fischen ist es allen voran der Europäische Schlammpeitzger *Misgurnus fossilis* (LINNAEUS, 1758). In neuerer Zeit wird diese Problematik noch durch eingeschleppte Arten (Neozoen) verstärkt, deren Vorkommen möglichst noch bei geringen Populationsdichten erkannt werden sollte.

Die Molekularbiologie hat in den letzten Jahren zwar rasante Fortschritte erbracht, stand aber nie in dem Verdacht als Methode für die Faunistik nutzbar zu sein. Dies hat sich nun geändert, denn es ist neuerdings möglich aus „Umweltproben“ (z.B. Bodenproben, Wasserproben, Laubstreu, Kot) DNA Bruchstücke zu extrahieren, die es möglich machen Arten spezifisch nach zu weisen (BOHMANN et al. 2014, REES et al. 2014, KELLY et al. 2014). Im deutschen Sprachraum hat die Methode oft als „Umwelt-DNA“ Eingang in die Literatur gefunden, viel gebräuchlicher ist aber die aus der englischen Literatur stammende „environmental DNA“ kurz eDNA. Die Methode gibt es erst seit einigen Jahren und sie wurde zuerst von Mikrobiologen angewandt, um Wasser auf Pathogene zu untersuchen (BRINKMANN et al. 2003). Eingang in die Feldherpetologie fand die Methode durch die Studien von FICETOLA et al. (2008) die nicht nur den Nordamerikanischen Ochsenfrosch *Lithobates catesbeianus* SHAW, 1802 darüber in einem Gewässer nachweisen konnten, sondern später auch zeigten, dass der Artnachweis mittels eDNA für diese Art effizienter ist als der Nachweis mit den traditionellen Methoden (DEJEAN et al. 2012).

Das enorme Potential der eDNA Methode wurde durch THOMSEN et al. (2012) aufgezeigt. In ihrer Studie untersuchten die Autoren elf Stillgewässer mit bekannten Vorkommen des Kammmolches und neun von denen die Knoblauchkröte bekannt war. Pro Gewässer wurden nur drei Wasserproben von je 15ml entnommen. Mittels eDNA konnte in 100% der genannten Gewässer der Kammmolch und in 91% die Knoblauchkröte nachgewiesen werden. Darüber hinaus glückten Artnachweise der Großen Moosjungfer, vom Fischotter, des Schlammpeitzger, und des Schuppenschwanz. Hier zeigt sich ein zweiter entscheidender Vorteil der Methode: sie ist störungsarm, denn das Gewässer muss nur einmal für die Entnahme der Proben aufgesucht werden. Dies wird besonders drastisch in der Studie von JERDE et al (2011) gezeigt. Hier wurden invasive Fischarten, unter anderem der Silberkarpfen *Hypophthalmichthys molitrix* (CUVIER & VALENCIENNES, 1844) in Gewässern um Chicago untersucht, um zu verhindern, dass die invasive Arte in die Großen Seen einwandert. Mittels eDNA konnte die Fischart in einem Flussabschnitt über eine einzelne Wasserprobe nachgewiesen werden, während man 93 Personen-Tage ab Elektrofischung benötigte, um ein einzelnes Exemplar zu fangen.

Mittlerweile wird eDNA vermehrt auch an Fließgewässern eingesetzt, was einen zusätzlichen Reiz der Methode ausmacht. Allerdings erfordert die Methode an Fließgewässern einen höheren Aufwand. Zum einen muss eine deutlich größere Wasserprobe genommen und filtriert werden. Größere Wassermengen zu filtrieren ist zudem laut Literatur besser um, auch bei Stillgewässern, die Nachweiswahrscheinlichkeit deutlich zu erhöhen. Allerdings ist die Filtration in Stillgewässern durch Schwebstoffe und Phytoplankton meist sehr viel schwieriger als in Fließgewässern. Zum anderen ist auch der Nachweis selber schwieriger, denn in Fließgewässern legt die eDNA schnell große Distanzen zurück und der Ort der Probennahme muss nicht identisch sein mit dem Ort des Vorkommens der Art (vgl. DEINER & ALTERMATT 2014).

Anlässlich der publizierten Möglichkeiten und Versprechen der neuen Methode mittels eDNA Arten nachweisen zu können, hat die LBV BGS Oberfranken beschlossen selbst einen Versuch zu unternehmen, das Potential der Methodik auszuloten.

#### **Die Methode „environmental DNA“ (eDNA)**

Organismen sondern DNA in Form von Körperzellen, Kot und Urin an ihre Umwelt ab. Diese DNA kann man in der Umwelt, zum Beispiel in Wasserproben, nachweisen. MARUYAMA et al (2014) haben gezeigt, dass ein Individuum des Sonnenbarsch *Lepomis macrochirus* RAFINESQUE, 1810 pro Stunde mehr als  $10^7$  Kopien DNA ins Wasser abgibt. Auch THOMSEN et al. (2012) konnten zeigen, dass die DNA im Wasser schon nach wenigen Tagen der Anwesenheit des Individuums im messbaren Bereich war und die Konzentration bis zum Ende der Versuchsdauer von 60 Tagen weiter anstieg. Daraus resultiert die Annahme, dass man bisher mit der Methode nur dauerhaft im Gewässer vorkommende Arten sicher nachweisen kann, nicht aber Arten die sich nur vorübergehend oder kurz im Gewässer aufhalten. Umgekehrt haben Studien (DEJEAN et al. 2011, THOMSEN et al. 2012) gezeigt, dass eDNA ein bis zwei Wochen im Wasser nachweisbar bleibt, nachdem die Art entfernt wurde. In der Praxis bedeutet dies, dass man nur Arten nachweist die aktuell im Gewässer oder sehr kurz vorher vorkamen. Allerdings hält sich eDNA laut einer anderen Studie im Sediment der Gewässer deutlich länger (TURNER et al. 2015).

Das Sammeln der Wasserproben selbst ist leicht und nach einer kurzen Schulung auch für den Amateur durchführbar. Man entnimmt dem Gewässer dabei eine möglichst große Wasserprobe (mindestens 15ml laut Literatur) mit einem geeigneten Gefäß. Wichtig ist vor allem, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination zwischen den Gewässern kommt. Das bedeutet, dass extrem sauber gearbeitet werden muss, da bereits wenige Körperzellenzellen eines Organismus genügen, um ein positives Signal dieser Art zu erzeugen. Der Probennehmer sollte daher Laborhandschuhe tragen und Gefäße und anderes Material nach und vor jeder Probennahme desinfiziert werden, sofern es wieder verwendet wird. Man sollte bei der Probennahme darauf achten, dass man möglichst kein Sediment aufwirbelt. Um die Nachweiswahrscheinlichkeit zu erhöhen und das Ergebnis abzusichern nimmt man pro Gewässer in der Regel mehrere Wasserproben und mittlerweile wird empfohlen bei intensiveren Studien die gesamte Uferlinie des Gewässers zu beproben. Ob man zu unterschiedlichen Zeiten Wasserproben entnimmt hängt von der Fragestellung der Studie ab, die ohnehin gegenüber der Methode im Vordergrund stehen sollte. Bisher gibt es zur Probennahme aber noch keine allgemeingültigen Standartregeln.

Die im Wasser enthaltene DNA ist aufgrund der verschiedenen Witterungseinflüsse (UV-Strahlung, biologischer Abbau etc.) im Vergleich zu DNA aus Gewebeproben von schlechter Qualität und eher bruchstückhaft als kurze DNA Fragmente erhalten. Daher ist es unabdingbar die DNA zu fixieren. Bei kleineren Mengen kann man laut einer Studie die Wasserprobe selbst fixieren indem man 1,5g 3M Natriumacetat und 33ml Ethanol auf 15ml Probenwasser gibt. So wird die DNA ausgefällt und bleibt erhalten. Größere Volumina filtert man am besten und fixiert den Filter in reinem (96-99%), unvergällten Ethanol. Die so erhaltenen Proben sollten bei -20°C gefroren und aufbewahrt werden bis sie im Labor weiter prozessiert werden.

Bisher beschränkt man sich bei der Analyse der eDNA vor allem auf die so genannte mitochondrielle DNA (mtDNA). Der Hauptgrund dafür ist, dass in einer Körperzelle nur zwei Kopien der Kern-DNA (nDNA) vorliegen, es aber pro Zelle 1000–5000 Mitochondrien gibt und in jedem Mitochondrium mtDNA enthalten ist. Daher findet man in den eDNA Proben sehr viel mehr mtDNA als nDNA. Ein weiterer Vorteil ist, dass für viele Arten die Sequenz der mtDNA bekannt ist, und es daher möglich ist artspezifische Primer zu entwickeln, die spezifisch die Zielart finden. Zudem enthalten die vorhandenen Datenbanken weitaus mehr Arten mit mitochondrialen DNA Sequenzen, als Kernsequenzen.. Dennoch ist die Konzentration von eDNA in einer Wasserprobe sehr gering und es braucht Methoden der DNA-Extraktion, um die Konzentration weiter zu erhöhen und messbar zu machen (vgl. z.B. DEINER & ALTERMATT 2014).

Je nach Fragestellung kommen dabei zwei verschiedene Ansätze zum Tragen: man kann entweder nur nach der eDNA einer einzigen bestimmten Zielart suchen oder versuchen, die gesamte Vielfalt der im Wasser enthaltenen eDNA bestimmen. Der erste Ansatz hat das Ziel, das Vorkommen einer bestimmten Art zu untersuchen und kann sowohl qualitativ (FICETOLA et al. 2008, REES et al. 2014) wie auch quantitativ (PILLIOD et al. 2013) durchgeführt werden. Dafür müssen genetische Marker entwickelt werden, die nur die DNA der Zielart amplifizieren und nicht von der DNA anderer Arten beeinflusst werden. In der Regel wird dafür eine „quantitative PCR“ (qPCR oder auch „real-time“ (rt)PCR) durchgeführt, mittels der es möglich ist, nicht nur zu testen, ob die gesuchte Zielart in der eDNA Probe vorhanden ist, sondern auch die Konzentration der eDNA im Wasser exakt bestimmt werden kann, um - mit Einschränkungen - auf die Biomasse der Zielart Rückschlüsse ziehen zu können (THOMSEN et al. 2012a). Bei diesen Verfahren wird keine DNA sequenziert, sondern sich darauf verlassen, dass die entwickelten Primer nur ein Signal auslösen, wenn DNA der Zielart vorliegt.

Ein neuerer Ansatz setzt Hochdurchsatzsequenziermethoden (Next Generation Sequencing [NGS]) ein, durch die es möglich ist, Millionen DNA Stücke gleichzeitig abzulesen. Vor der DNA-Sequenzierung mittels NGS wird die DNA der eDNA Probe über eine oder zwei PCRs (Polymerase-Kettenreaktion) vervielfältigt, um 1) in ausreichend großer Menge zum wiederholten Lesen (Sequenzieren) enthalten zu sein, aber auch 2) um die DNA von seltener in der Probe vertretenen Arten zu vermehren. Durch den Abgleich der im Anschluss erhaltenen Sequenzen mit Vergleichsdatenbanken wird dann eine Artenliste erstellt. Auch hier werden spezielle Primer genutzt, die aber weniger spezifisch sind und viele Arten gleichzeitig erfassen können. Mit diesem Ansatz ist es theoretisch möglich, alle Arten zu erfassen, die in einer Wasserprobe eDNA hinterlassen haben.

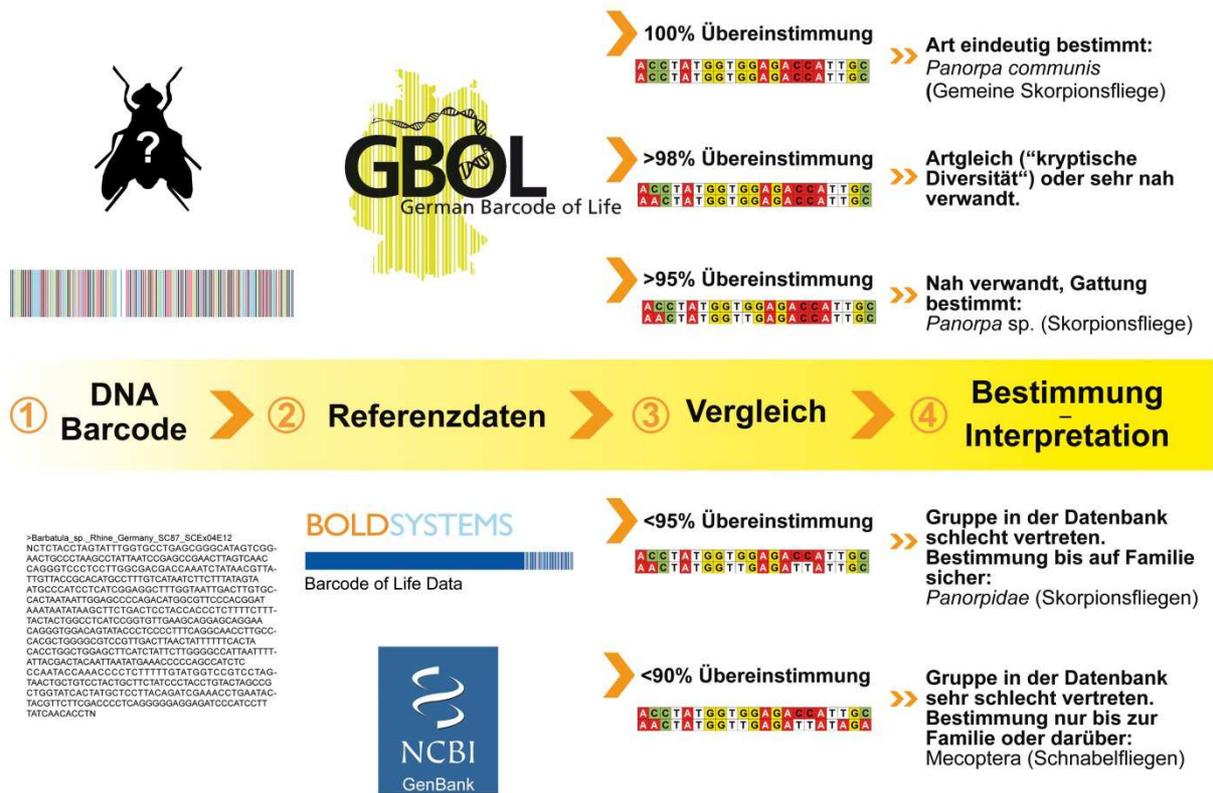
Thomsen et al. (2012b) konnten so zum Beispiel 15 verschiedene marine Fischarten im Hafen von Elsinore (Dänemark) über Wasserproben nachweisen. Allerdings ist NGS derzeit noch relativ teuer, wird aber durch den vermehrten Einsatz in Zukunft deutlich günstiger werden. Zudem kann man mit einer NGS-Analyse eine Vielzahl von Proben gleichzeitig untersuchen, wodurch der Preis pro Probe deutlich sinkt. Hierbei ist es wichtig von Beginn an das Studiendesign sorgfältig zu planen.

Insgesamt scheint eDNA eine einfache und ideale Alternative zu traditionellen Methoden zu sein, zumindest für den Nachweis schwer zu erfassender Arten, oder wo schnell ein möglichst großes Artenspektrum erfasst werden soll. Allerdings gibt es auch Vorbehalte. In erster Linie muss die Probennahme und die Analyse sorgfältig durchgeführt werden, damit es zu keiner Kontamination kommt. Daher sind auch Null- und Negativproben unerlässlich. Zudem ist es wichtig, dass man alle Materialien zwischen den Probennahmen desinfiziert um eine Übertragung von eDNA von Gewässer zu Gewässer zu vermeiden.

Allgemein kann man sagen, dass jeder, der sich in der Faunistik mit der Methode eDNA beschäftigen will, sich mit der neuen Literatur vertraut machen sollte. Schmidt et al. (2013) zeigten, dass entscheidend für die Nachweiswahrscheinlichkeit eher die Wasserprobe, als die Analyse im Labor ist. Verschiedene Studien setzen sich aktuell mit der Optimierung dieses Schritts auseinander. Daraus folgt, dass es sinnvoller ist pro Gewässer mehr Wasserproben zu sammeln als die Anzahl der PCR pro Wasserprobe zu erhöhen. Und genau in diese Richtung gehen auch die Tendenzen in den Monitoringprogrammen, da vermehrt nicht nur mehrere Gewässer untersucht, sondern auch pro Gewässer deutlich mehr als eine Probe genommen werden.

### **DNA Barcoding & Referenzdatenbanken**

Basis von eDNA-Untersuchungen zur Erfassung von Artenvielfalt ist DNA-Barcoding. Die Methode ist simpel: Experten (darunter in Deutschland über 250 Bürgerwissenschaftler\*Innen) hinterlegen bei beteiligten wissenschaftlichen Sammlungen auf Artniveau bestimmtes Belegmaterial, aus welchem erst die DNA extrahiert wird und dann der DNA-Barcode im Labor erstellt wird. Dabei handelt es sich um einen (Tiere) bzw. mehrere (Pflanzen) weltweit standardisierte(n) Genabschnitt(e), die lang genug sind, um für eine bestimmte Art einzigartig zu sein, aber auch kurz genug (658 Basenpaare bei Tieren), um robust und zuverlässig mit wenig Aufwand im Labor erstellt werden zu können. Alle erstellten DNA-Barcodes werden in internationalen Datenbanken öffentlich hinterlegt (z. B. BOLD, GenBank), wo sie als Vergleich für DNA-Barcodes von unbekanntem Proben dienen. Die Bestimmung einer Probe über ihren DNA-Barcode ist einer Suche im Internet ähnlich, bei der eine Suchmaschine die besten Treffer für eine bestimmte Buchstabenfolge ausgibt. Allerdings können nur solche Proben einer bestimmten Art eindeutig zugeordnet werden, für die ein taxonomischer Spezialist bereits Material verifiziert hat und ein Eintrag in der Datenbank existiert. Ist dies nicht der Fall, kann zumindest über die Ähnlichkeit in Form einer genetischen Distanz zu bereits vorhandenen DNA-Barcodes eine Hypothese zur Artverwandtschaft erstellt werden, wodurch die korrekte Zuordnung zur Gattung oder Familie möglich ist. Vor diesem Hintergrund arbeitet das BMBF-finanzierte Verbundprojekt German Barcode of Life (GBOL) seit 2011 am Aufbau einer Referenzbibliothek mit DNA-Barcodes der deutschen Biodiversität, welche es erlaubt, Organismen (oder Teile davon) über



**ABBILDUNG 1:** Schematischer Ablauf einer Artbestimmung über DNA-Barcoding

ihre DNA auf Artniveau und oft auch darunter (Populationen) erfassen zu können ([www.bolgermany.de](http://www.bolgermany.de)). Das Projekt Barcoding Fauna Bavaria (BFB) der Zoologischen Staatssammlung München ist eine weitere Initiative zum Aufbau einer nationalen Datenbank und Partner in GBOL.

Barcodes sind also so etwas wie der genetische Fingerabdruck einer Art, benannt in Analogie zum industriellen Strichcode eines Produktes im Supermarkt – beide sind einzigartig für ein bestimmtes Objekt. Der große Vorteil von DNA-Barcoding ist, dass man auch Individuen schwer identifizierbarer oder sehr artenreicher Gruppen schnell erfassen kann, oder sogar spezielle Entwicklungsstadien (Spore, Ei, Larve) beziehungsweise Fragmente der Individuen (Fliegenbein, Pilzhyphe, Haar) sicher ansprechen kann.

### Pilotstudien

Wie jede neue Methode, so muss auch eDNA auf Effizienz in der Praxis, Nachweiswahrscheinlichkeiten und anderes getestet werden, um methodische Protokolle und Standards zu entwickeln. Auf europäischer Ebene läuft hierzu seit 2016 eine EU COST action (DNAqua-Net, <http://dnaqua.net>), welche sich genau mit diesem Problemfeld beschäftigt und versucht die Methoden und Analysen der unterschiedlichen Labore zu harmonisieren. Vergleichende Untersuchungen sind rar und wurden zum Beispiel von REES et al. (2014) durchgeführt. Hier wurden traditionelle Methoden (Ei-Suche, Keschern, Wasserfallen, Ableuchten) neben der eDNA Methode an den verschiedenen Gewässern durchgeführt. Der Einsatz der traditionellen Methoden dauerte ca. drei Stunden pro Weiher und Besuch. Die traditionellen Methoden hatten eine Nachweiswahrscheinlichkeit

von 74%, die eDNA eine von 80%, womit beide Methoden in dieser Studie vergleichbar sind. Allerdings hat der Nachweis mit traditionellen Methoden pro Standort 12–18 Stunden gedauert, während das Probensammeln und die Laboranalyse der eDNA insgesamt nur wenige Stunden gedauert hat. Eine vergleichbare Studie haben Biggs et al. (2015) durchgeführt und dabei pro Gewässer an 20 Stellen je 30ml Wasser für eDNA Analysen entnommen. Alle 20 Proben pro Gewässer wurden gemischt und daraus sechs Proben mit je 15ml entnommen. Je Wasserprobe wurden dann sechs PCRs durchgeführt. Im Gegensatz zu den Vorgängerstudien war der Aufwand für die eDNA also deutlich höher. Das führte zu einem deutlichen Erfolg, denn in den Gewässern mit bekannten Kammolchvorkommen wurden so bei 139 von 140 Besuchen von professionellen Herpetologen ein positiver Nachweis geführt. Bei Besuchen derselben Gewässer durch Citizen Scientists anstatt von Herpetologen, war die Nachweiswahrscheinlichkeit immerhin noch bei 91,3%. Dem gegenüber stehen die traditionellen Methoden, durchgeführt von einem professionellen Biologen, bei einer Nachweiswahrscheinlichkeit von 44% (Eiersuche), 76% (Wasserfallen) und 75% (Ableuchten). Durch eine Kombination der Methoden ließ sich die Nachweiswahrscheinlichkeit auf 95% steigern. Dem gegenüber stehen auch wieder extreme Kostenunterschiede. Biggs et al. (2015) berechneten die Kosten für die eDNA auf 140 EUR pro Gewässer, während der Nachweis über die traditionellen Methoden mit je 1450 EUR zu Buche schlägt.

Insgesamt fehlen in Deutschland derzeit noch weitestgehend Pilotstudien, die sich mit der Praxistauglichkeit des umfassenderen „multispecies approach“ auseinandersetzen, also das Ziel haben möglichst alle im Gewässer vorkommenden aquatischen und semi-aquatischen Arten zu identifizieren. Vor allem fehlen auch Tests zu unterschiedlichen Ansätzen, die Methode an verschiedenen Gewässertypen zu testen. In unserer hier vorliegenden Studie haben wir daher Gewässer nach dem Vorkommen der Zielarten hin ausgewählt und an einzelnen Gewässern Vergleichsuntersuchungen der Zielarten mit traditionellen Methoden durchgeführt, bzw. Ergebnisse von entsprechenden Kartierungen übernommen. Insgesamt verfolgen wir den „multispecies approach“ Ansatz und haben das Studiendesign so gewählt, dass neben wenigen, primären Zielarten, auch weitere Arten nachgewiesen werden können. Ziel ist weiterhin ein Test der Praktikabilität des Probennehmens, auch in Hinblick auf die mögliche Beteiligung von Bürger\*Innen (neu-deutsch auch: Citizen Scientists) in Zukunft. Die unterschiedlichen Ergebnisse der untersuchten Gewässer werden schließlich hinsichtlich der ermittelten Artenzusammensetzung aus naturschutzfachlicher Sicht diskutiert. Da überwiegend Gewässer ausgesucht wurden, die entweder unter Schutz stehen, im Besitz des LBV sind, oder anderweitig ein Zugriff auf die Gewässer besteht, können je nach Ergebnislage entsprechende Managementpläne erstellt oder bestehende Maßnahmen verbessert werden.

## **MATERIAL & METHODEN**

### ***Projektgebiet***

Das Projektgebiet ist der bayerische Regierungsbezirk Oberfranken mit ausgesuchten Gewässern in den Landkreisen Bayreuth, Coburg und Lichtenfels. Die Gewässer wurden nach folgenden Kriterien ausgesucht: [1] bekanntes oder ehemaliges Vorkommen einer der Zielarten beziehungsweise

Gewässer an dem mit traditionellen Methoden nach einer der Zielarten gesucht wurde; [2] das Spektrum unterschiedlicher Gewässertypen sollte ziemlich groß sein (z.B. Tümpel, Sickerfläche, Regenrückhaltebecken, Höhle); [3] hoheitlicher oder privater Schutz der Gewässer um ggf. Ergebnisse direkt in Entwicklungsmaßnahmen umzusetzen; [4] Potential des Gewässers für besondere Fragestellungen.

Insgesamt wurden nach den Kriterien 13 Gewässer (siehe nächstes Kapitel) ausgesucht. Allerdings erfüllen nicht alle Gewässer jedes Kriterium.

## Untersuchte Gewässer

### Craimoosweiher



#### Beschreibung

Der Craimoosweiher wurde vermutlich im 16. Jahrhundert als Fischweiher angelegt und wird seither zur Karpfenzucht genutzt. Im Umfeld haben sich über die Jahrhunderte Flachmoore entwickelt. Der Teich ist sehr strukturreich, inklusive Röhrichtzonen und Tiefwasserbereiche. Der Craimoosweiher ist eine geomorphologische Besonderheit, denn er liegt auf einer Wasserscheide, weshalb er sowohl nach Norden zum Roten Main als auch nach Süden zur Pegnitz hin einen Abfluss hat. Der Weiher wird noch bewirtschaftet und regelmäßig abgelassen.

#### eDNA Probennahme

Probe-ID: GWe013-016  
Tag: 28.07.2016  
Probenmenge [ml]: 13 [0]; 14 [250]; 15 [250]; 16 [250]  
Ort der Probennahme: siehe Pfeil  
Probennehmer: Stefanie Braun, Philipp Wagner  
Bemerkungen: Viele Wasservögel am Ort der Probennahme

#### Vergleichende Kartiermethode

keine

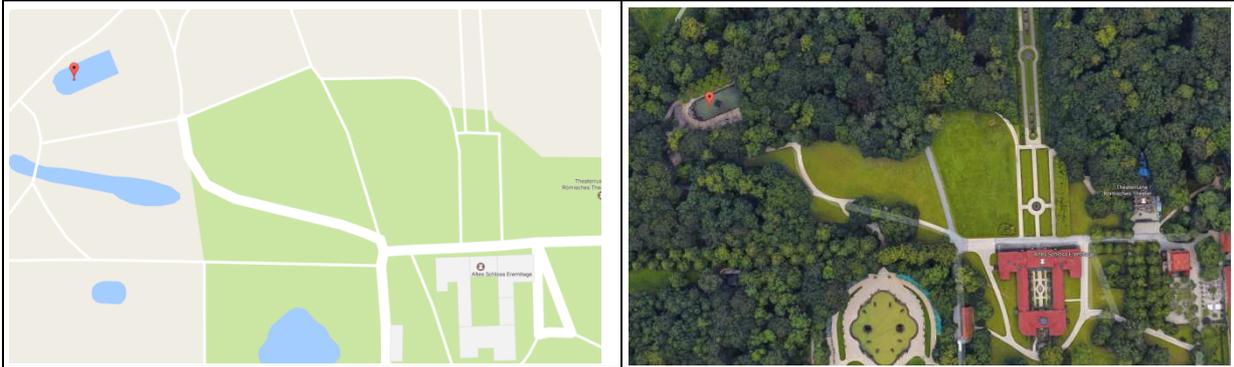
#### Daten

Landkreis: Bayreuth  
Koordinaten: 49.819977|11.593311  
Schutzstatus: FFH Gebiet, NSG

#### Bekannte (relevante) Arten

*Triturus cristatus*, *Pelobates fuscus*,  
*Rana arvalis*.

## Eremitage | Untere Grotte



### Beschreibung

Steinbecken im Bereich des Schlossgartens der Eremitage in Bayreuth. Das Gewässer ist nahezu vegetationslos und fischfrei, da es über die Wintermonate abgelassen und jährlich gereinigt wird. An den vier Ecken finden sich kleinere Landlebensräume über die die Tiere auch zu- und abwandern können. Das Gewässer ist umgeben von strukturreichen Laubwald. Der Überlauf des Beckens entwässert direkt in den Main. Gespeist wird die Untere Grotte aus dem oberen großen Teich nahe dem Schloss. Mehrfach am Tag finden Wasserspiele statt.

### eDNA Probennahme

Probe-ID: GWe004-007  
 Tag: 18. Juli 2016  
 Probenmenge [ml]: 4 [0]; 5 [500]; 6 [400]; 7 [400]  
 Ort der Probennahme: auf vier Seiten  
 Probennehmer: Matthias Geiger, Philipp Wagner  
 Bemerkungen:

### Vergleichende Kartiermethode

Reusenkartierung, nächtliche Begehungen

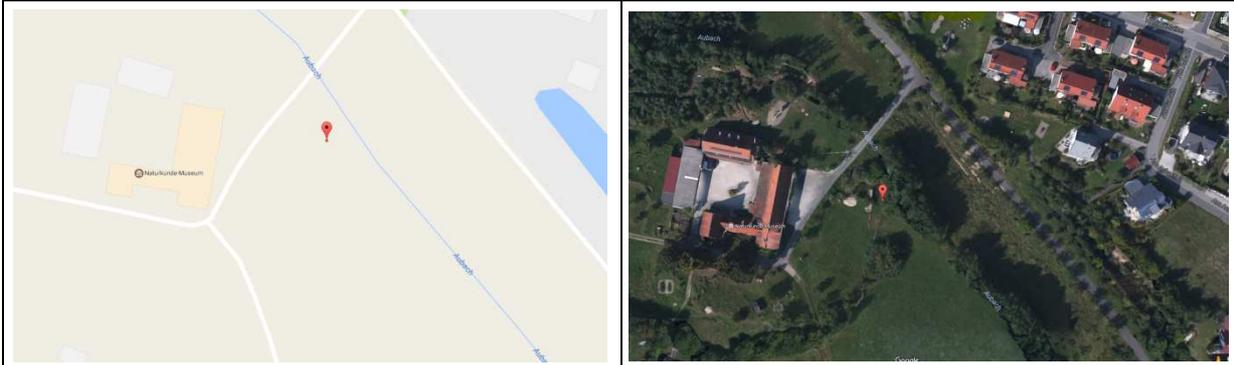
### Daten

Landkreis: Bayreuth  
 Koordinaten: 49.950003|11.621840  
 Schutzstatus: FFH Gebiet

### Bekannte (relevante) Arten

*Triturus cristatus*, *Lissotriton vulgaris*,  
*Ichthyosaura alpestris*  
 (die beiden letzteren wurden über die vergleichende Kartiermethode)

## LBV Lindenhof



### Beschreibung

Kleiner, künstlich angelegter Tümpel am Eingang zum Lindenhof (LBV Außenstelle). Stark verkrautet und verschlammt, teils stark besonnt aber auch schattige Bereiche. Fischfrei aber mit hoher Dichte von Libellenlarven. Fällt häufiger, zu mindestens in Teilbereichen, trocken. Keine Schwimmblatt- oder Röhrlichtbereiche. Ufer teils sandig, teils mit Vegetation bewachsen Am Rand fließt der Aubach und im näheren Umfeld befinden sich Feuchtwiesen die als Sommerhabitat dienen können.

### eDNA Probennahme

Probe-ID: GWe001–003  
 Tag: 18. Juli 2016  
 Probenmenge [ml]: 1 [150]; 2 [150]; 3 [150]  
 Ort der Probennahme: drei Seiten (nicht Richtung Aubach)  
 Probennehmer: Philipp Wagner, Matthias Geiger  
 Bemerkungen: 0 Probe vergessen

### Vergleichende Kartiermethode

Reusenkartierung, nächtliche Begehung

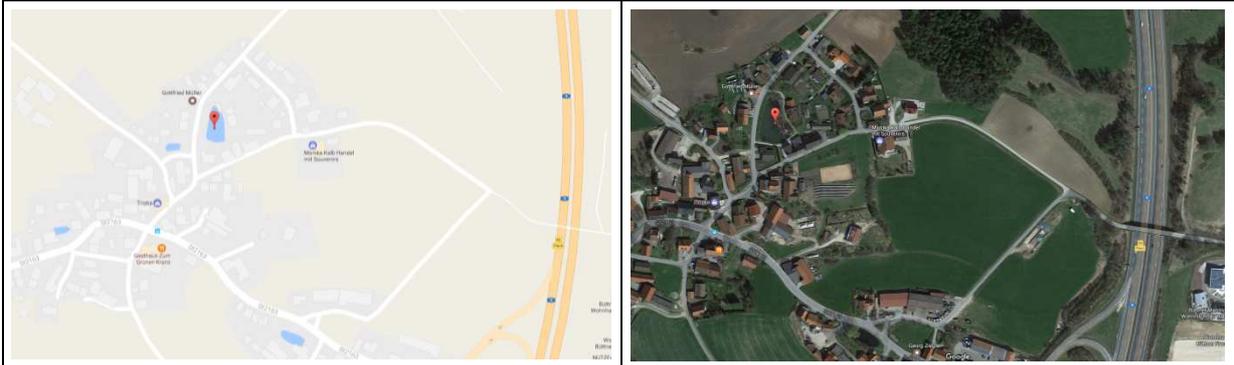
### Daten

Landkreis: Bayreuth  
 Koordinaten: 49.917725|11.590248  
 Schutzstatus: keiner

### Bekannte (relevante) Arten

*Triturus cristatus*, *Pelobates fuscus*  
 (direkte Nachweise über die vergleichende Kartiermethode)

## Ottenhof



### Beschreibung

Historischer Hühlweiher in der Ortsmitte von Ottenhof. Zu allen Seiten umgeben von Wohnbebauung, an einer Seite getrennt durch Dorfstraße. Ufer vollständig bewachsen, entwickelte Unterwasservegetation mit Schwimmblatt- und Röhrrietzzone. Nicht fischfrei. Wird in losen Abständen von der Bevölkerung gepflegt, trocknet aber nicht aus. Stark besonnt mit einzelnen schattigen Bereichen.

### eDNA Probennahme

Probe-ID: GWe012, 017–020  
Tag: 18. Juli 2016 und 28. Juli 2016  
Probenmenge [ml]: 12 [0]; 17 [0]; 18 [150]; 19 [250]; 20 [200]  
Ort der Probennahme: parallel zur Straße  
Probennehmer: Stefanie Braun, Philipp Wagner  
Bemerkungen: doppelte Null-Probe, da Probenahme abgebrochen und neu angesetzt wurde

### Daten

Landkreis: Bayreuth  
Koordinaten: 49.669206|11.462744  
Schutzstatus: keiner

### Bekannte (relevante) Arten

keine

### Vergleichende Kartiermethode

Reusenkartierung, nächtliche Begehung

## Höhle bei Plech



### Beschreibung

Historischer Hühlweiher der jetzt als Sickerfläche für das angrenzende Regenrückhaltebecken dient. Tiefes Gewässer, komplett mit Vegetation, Schilfrand, Hochstaudenflut, Wiese, umgeben. Relativ schlammiges Wasser ohne Schwimmblattvegetation. In manchen Bereichen mit ausgeprägter Unterwasservegetation. Zum Teil stark besonnt, andere Bereiche durch Bäume sehr schattig. Nicht fischfrei. Trocknet wahrscheinlich nur äußerst selten aus. Angrenzend befinden sich die BAB 9 und eine Wiesenfläche mit einem Nadelholzbestand.

### eDNA Probennahme

Probe-ID: GWe008-011  
 Tag: 18. Juli 2016  
 Probenmenge [ml]: 8 [0]; 9 [230]; 10 [225]; 11 [200]  
 Ort der Probennahme: rundherum  
 Probennehmer:  
 Bemerkungen:

### Vergleichende Kartiermethode

Reusenkartierung, nächtliche Begehung

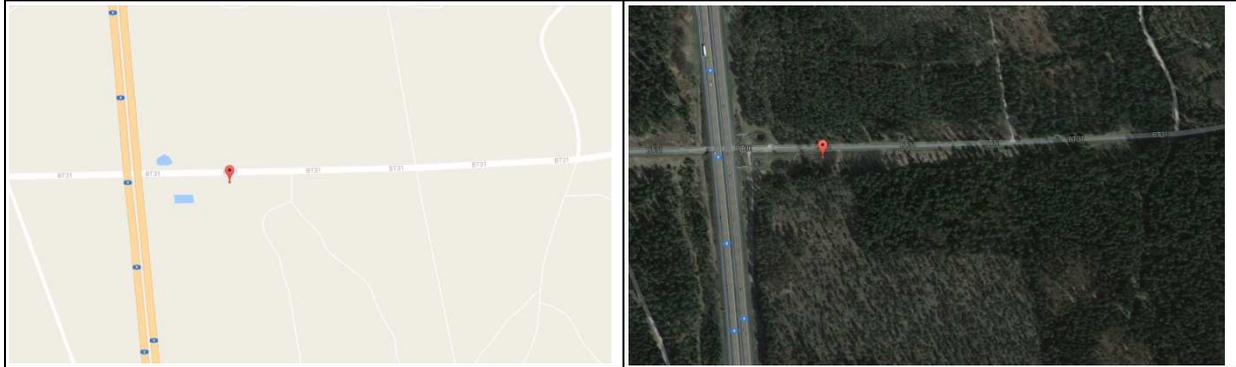
### Daten

Landkreis: Bayreuth  
 Koordinaten: 49.660294|11.464530  
 Schutzstatus: keiner

### Bekannte (relevante) Arten

*Triturus cristatus* (aktueller Nachweis durch die vergleichende Kartiermethode). Flussuferläufer wurde bei der Probennahme nachgewiesen

## Regenrückhaltebecken Nördlich Plech



### Beschreibung

Sickerfläche eine Regenrückhaltebecken-Komplexes. Sehr niedrige Gewässertiefe, stark bewachsen, teilweise durch Binsen schon in der Verlandung befindlich. Zur Straße hin mit einem Rohrkolbensaum. Kaum offene Wasserfläche, dafür aber stark besonnt und fischfrei. Im Randbereich leicht anmoorig mit einem guten bestand von *Epipactis helleborine*. Keine dichte Unterwasservegetation. Aufgrund der starken Verlandung ist anzunehmen, dass das Gewässer öfter austrocknet.

### eDNA Probennahme

Probe-ID: GWe021–024  
 Tag: 28. Juli 2016  
 Probenmenge [ml]: 21 [0]; 22 [250]; 23 [250]; 24 [250];  
 Ort der Probennahme: parallel zur Straße  
 Probennehmer: Stefanie Braun, Philipp Wagner  
 Bemerkungen:

### Vergleichende Kartiermethode

Reusenkartierung, nächtliche Begehungen

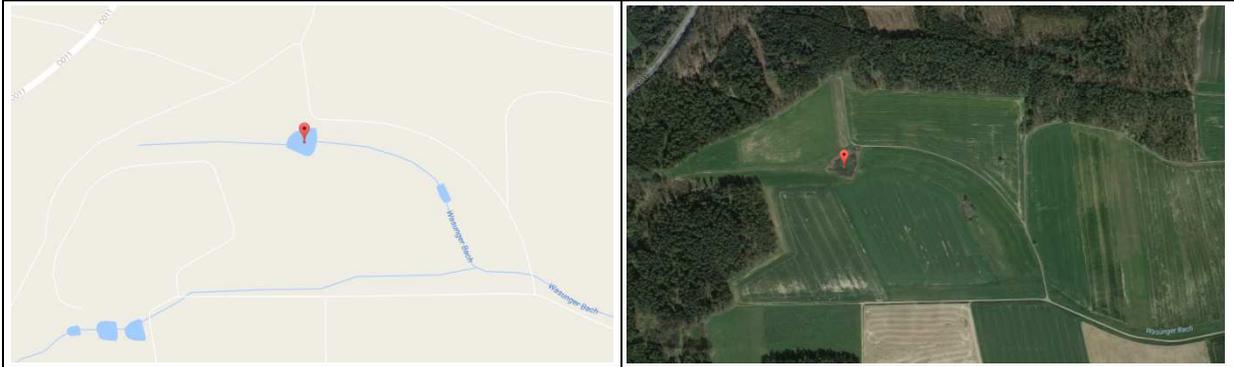
### Daten

Landkreis: Bayreuth  
 Koordinaten: 49.689458|11.468220  
 Schutzstatus: keiner

### Bekannte (relevante) Arten

*Triturus cristatus*, *Hyla arborea*  
 (direkte Nachweise über vergleichende Kartiermethode)

## Aichaer Teich



### Beschreibung

Kleinerer Teich inmitten der Agrarlandschaft mit gut ausgeprägter Schilf- und Schwimmbblattzone und dichter Unterwasservegetation. Vermutlich nicht fischfrei. Stark besonnt mit leicht schattigen Ufern. Umgeben von Ackerflächen die nicht allen Arten als Landlebensraum dienen können. In der weiteren Umgebung einige Waldflächen.

### eDNA Probennahme

Probe-ID: GWe041-044  
 Tag: 29. Juli 2016  
 Probenmenge [ml]: 41 [0]; 42 [250]; 43 [250]; 44 [250];  
 Ort der Probennahme: siehe Pfeil  
 Probennehmer: Jessica Jacobitz, Philipp Wagner  
 Bemerkungen:

### Vergleichende Kartiermethode

keine

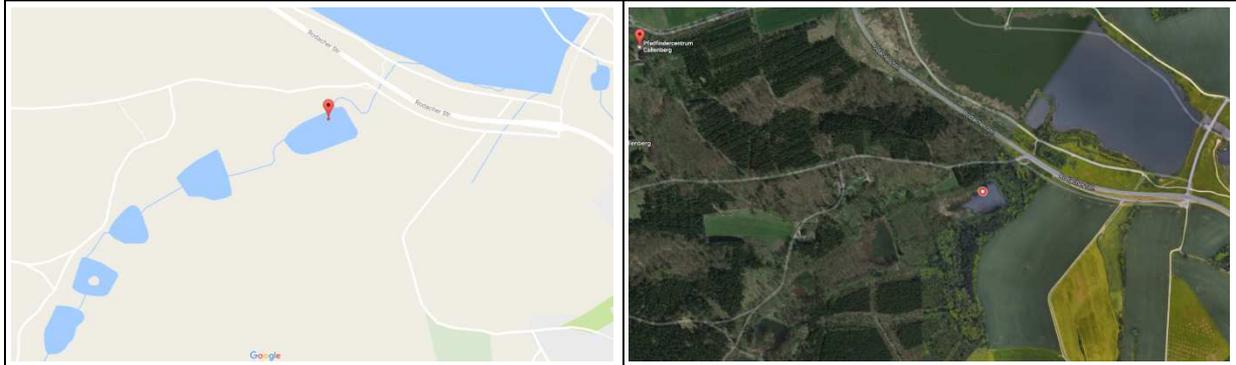
### Daten

Landkreis: Coburg  
 Koordinaten: 50.267381|11.098740  
 Schutzstatus: GLB

### Bekannte (relevante) Arten

*Triturus cristatus*, *Pelobates fuscus*

## Callenberger Forst



### Beschreibung

Erster Teich einer im Callenberger Forst gelegenen Kette ehemaliger Fischteiche. Offene, stark besonnte Wasserfläche. Teilweise gut ausgeprägte Schilfzone aber kaum Schwimmblattvegetation. Nicht fischfrei. Umgeben von Laub-Mischwald mit geeigneten Landlebensräumen für Amphibien.

### eDNA Probennahme

Probe-ID: GWe029–032  
Tag: 29. Juli 2016  
Probenmenge [ml]: 29 [0]; 30 [250]; 31 [250]; 32 [250];  
Ort der Probennahme: siehe Pfeil  
Probennehmer:  
Bemerkungen:

### Vergleichende Kartiermethode

keine

### Daten

Landkreis: Coburg  
Koordinaten: 50.276845|10.935803  
Schutzstatus: FFH

### Bekannte (relevante) Arten

*Triturus cristatus*

## Froschgrundsee



### Beschreibung

Ein 1986 in Betrieb genommenes Hochwasserrückhaltebecken für die Stadt Coburg. Im Tal der Zuflüsse Itz und Effelder wurde 1997 ein NSG ausgerufen, der See selbst wird vorwiegend zum Baden und Angeln genutzt und hat einen hohen Besatz an Karpfen und Raubfischen, sowie Wallern und Schleien. Die offene Wasserfläche des Sees ist stark besonnt, die Ufer teils schattig ohne große Schilfbestände. Die Ufer sind teilweise an kleinere Waldstücke angrenzend.

### eDNA Probennahme

Probe-ID: GWe033–036  
 Tag: 29. Juli 2016  
 Probenmenge [ml]: 33 [0]; 34 [250]; 35 [250]; 36 [250];  
 Ort der Probennahme: siehe Pfeil  
 Probennehmer: Jessica Jacobitz, Philipp Wagner  
 Bemerkungen:

### Vergleichende Kartiermethode

keine

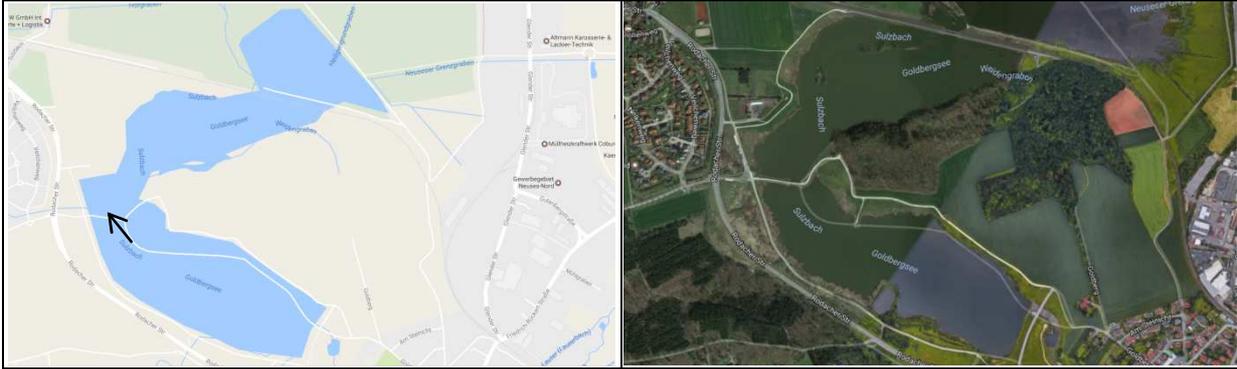
### Daten

Landkreis: Coburg  
 Koordinaten: 50.352752|11.025419  
 Schutzstatus: keiner

### Bekannte (relevante) Arten

*Misgurnus fossilis*

## Goldbergsee



### Beschreibung

Der Goldbergsee ist ein relativ junges Hochwasserrückhaltebecken für die Stadt Coburg, dessen Anstau ab 2010 erfolgte. Er gliedert sich in die drei Bereiche: Grundsee, Biotopsee und Flutmulde. Nördlich am Biotopsees findet sich eine Flachwasserzone und einem Röhrichtbestand. Hier schließt sich das NSG *Vogelfreistätte Glender Wiesen* an. Im Bereich der Probennahme hat der See eine offene Wasserfläche ohne größeren Schilfbestände oder Schwimmblattvegetation.

### eDNA Probennahme

Probe-ID: GWe025–028  
 Tag: 29. Juli 2016  
 Probenmenge [ml]: 25 [0]; 26 [350]; 27 [250]; 28 [250];  
 Ort der Probennahme: siehe Pfeil  
 Probennehmer: Jessica Jacobitz, Philipp Wagner  
 Bemerkungen: Die Proben wurden am Durchfluss zwischen den beiden Grundsee-bereichen genommen

### Vergleichende Kartiermethode

keine

### Daten

Landkreis: Coburg  
 Koordinaten: 50.282607|10.938478  
 Schutzstatus: NSG, FFH

### Bekannte (relevante) Arten

*Misgurnus fossilis*

## Muggenbacher Tongruben



### Beschreibung

Insgesamt ein FFH Gebiet mit ca. 28ha Größe. Drei ehemalige Tongruben die von Wald umgeben sind, der randlich in unterschiedlichem Maße auch in die Grube vordringt. Grubensee mit ausgeprägter Unterwasservegetation und einzelnen Schwimmblatt- und Schilfbereichen. Sehr klares Wasser. Vermutlich nicht fischfrei. Stark besonntes Gewässer mit sehr strukturreichen Ufern und teilweise vegetationsfreien Ufersäumen. Ufer wachsen teilweise mit Erlen zu und beschatten die Uferlinien teilweise. Im direkten Umfeld umgeben mit laubbaumdominierten Wald der später in stärker nadelwaldbaumdominierte Bestände übergeht.

### eDNA Probennahme

Probe-ID: GWe037-040  
 Tag: 29. Juli 2016  
 Probenmenge [ml]: 37 [0]; 38 [250]; 39 [250]; 40 [250];  
 Ort der Probennahme: siehe Pfeil  
 Probennehmer: Jessica Jacobitz, Philipp Wagner  
 Bemerkungen:

### Daten

Landkreis: Coburg  
 Koordinaten: 50.217656|10.789378  
 Schutzstatus: NSG, FFH

### Bekannte (relevante) Arten

*Triturus cristatus*, *Bombina variegata*

### Vergleichende Kartiermethode

keine

## Theisau 1 [bei Horb]



### Beschreibung

Altarm des Mains. Durch die umgebenden Bäume stark beschattet mit relativ wenig Unterwasservegetation, dafür mit einer sehr dichten Schwimmblattvegetation aus Wasserlinse. Die Ufer stark verbuscht und bewachsen. Sehr schlammig durch das eingetragene Laub. Nicht fischfrei.

### eDNA Probennahme

Probe-ID: GWe045–048  
 Tag: 29. Juli 2016  
 Probenmenge [ml]: 45 [0]; 46 [250]; 47 [250]; 48 [250];  
 Ort der Probennahme: siehe Pfeile  
 Probennehmer: Jessica Jacobitz, Philipp Wagner  
 Bemerkungen:

### Vergleichende Kartiermethode

Elektrobefischung

### Daten

Landkreis: Lichtenfels  
 Koordinaten: 50.152579|11.200038  
 Schutzstatus: FFH

### Bekannte (relevante) Arten

*Misgurnus fossilis*

## Theisau 2 [bei Burgkunstadt]



### Beschreibung

Altarm des Mains. Auf einer Seite sehr stark besonnt mit ausgeprägter Schwimmblattvegetation. Zum Teil mit einem nicht stark ausgeprägten Schilfrand. Erstere ist so stark ausgeprägt, dass sie quasi die gesamte Wasserfläche überwächst. Wenig stark entwickelte Unterwasservegetation. Zum Main hin stark mit Bäumen überwachsen und beschattet. Die Verbindung zum Main war zur Zeit der Probennahme ausgetrocknet.

### eDNA Probennahme

Probe-ID: GWe049–052  
Tag: 29. Juli 2016  
Probenmenge [ml]: 49 [0]; 50 [250]; 51 [250]; 52 [250];  
Ort der Probennahme: siehe Pfeil  
Probennehmer: Jessica Jacobitz, Philipp Wagner  
Bemerkungen:

### Vergleichende Kartiermethode

Elektrobefischung

### Daten

Landkreis: Lichtenfels  
Koordinaten:  
Schutzstatus: FFH

### Bekannte (relevante) Arten

*Misgurnus fossilis*

## Beprobung

Bei der Auswahl und Planung der Probenahmen sowie den anschließenden Analysen wurden wir von der AG Leese (Universität Duisburg-Essen, Aquatische Ökosystemforschung) beraten, welche in Deutschland unter den führenden Forschungsgruppen auf dem Gebiet Metabarcoding und eDNA Analysen ist (vergleiche Elbrecht & Leese 2015, Elbrecht et al. 2016a, Elbrecht et al. 2016b, Leese et al. 2016, Macher et al. 2015, Macher et al. 2017, Pauls et al. 2014). Professor Leese ist Initiator und Koordinator der EU COST action DNAqua-Net, welche sich mit der Etablierung und EU-weiten Standardisierung der neuen Methoden beschäftigt. Um eine möglichst hohe DNA-Qualität und Quantität zu erhalten, wurde an jedem Gewässer versucht, maximal 1 Liter Wasser zu filtern. Dabei kam zunächst eine PVC Vakuumpumpe (Nalgene®, Lieferant: Thermo Scientific) mit 36 ml Saugvolumen pro Hub und 480 mbar Überdruck am Auslassventil zum Einsatz (# 181-9903). Diese hielt leider nur einen halben Tag lang und wurde durch eine Version mit Zinklegierung ausgetauscht (# 181-9904). Gefiltert wurde über Einweg-Filtertrichter für analytische Tests (Nalgene®, Lieferant: Thermo Scientific) aus Cellulosenitrat und einem Porendurchmesser von 0,45 µm bei 47 mm Durchmesser (#513-1454).



**ABBILDUNG 2:** Bereits bei der dritten Probestelle erlag die PVC Handpumpe einer Ermüddungserscheinung und musste getauscht werden. Es empfiehlt sich, stets Ersatz parat zu haben.

Bereits bei der ersten Probestelle (LBV Lindenhof) zeigten sich dabei erste, wichtige Erkenntnisse, die nur im Praxistest erfahren werden können und nicht in Publikationen Erwähnung finden: das Filtern großer Wasservolumina mittels manueller Vakuumpumpe ist körperliche Arbeit und bei einem normaltrüben Teich können nicht mehr als 150 ml Wasser durch einen Filter dieser Porengröße (0,45 µm) gezogen werden. Die Strategie wurde daraufhin angepasst und an jedem Gewässer drei Proben an unterschiedlichen Stellen genommen (in je eine 1 Liter Weithalsflasche mit Schraubverschluss, Nalgene®, Lieferant: Thermo Scientific, # 215-7226), welche dann separat durch je einen neuen Filter

gefiltert wurden, bis dieser nicht mehr Material aufnehmen konnte (zwischen 150 ml und 500 ml pro Filter). Zudem wurde an jedem Gewässer zuerst eine Nullprobe als Kontaminationskontrolle genommen, und zwar in Form eines Filters, welcher ausgepackt und direkt in ein Röhrchen mit EtOH überführt wurde. Die Probefilter wurden ebenfalls mit Hilfe zweier vernickelter Stahl Pinzetten für Deckgläser (Lieferant: Usbeck, # 232-0111) vorsichtig gefaltet und in ein 2 ml Röhrchen (Micro tubes with thread, Lieferant: SARSTEDT, # SARS72.694.006) mit reinem Laborethanol (Lieferant: Hoffmann, Sorte 410) gegeben. Alle Utensilien, die potentiell DNA übertragen können (Pinzetten, Flaschen, Filterflaschenstopfen) wurden nach jeder Probestelle in eine konzentrierte Chlorbleichlösung (DanKlorix) in Lock-lock Boxen gegeben und über Nacht dort belassen. Vor jedem Einsatz wurden sie mit destilliertem Wasser gespült. Die Box mit den 2 ml Röhrchen wurde im Feld in einer kleinen Styroporkiste mit Kühlakkus aufbewahrt und zwischen den Feldtagen eingefroren. Eine weitere Erkenntnis der Feldphase war die sub-optimale Eignung von Stahlpinzetten, da diese sehr schnell von der Chlorbleiche angegriffen wurden und stark oxidierten. Für die Arbeit im Labor wurden deswegen günstigere, sterile Einweg PS-Pinzetten (Lieferant: VWR Collection, # 232-0191) ersetzt, welche auch nach einer Behandlung mit Chlorbleiche wieder verwendet werden können. Alle Proben wurden im Zeitraum 18. – 29. Juli 2016 genommen (vgl. Tabelle X).

### **Primerdesign**

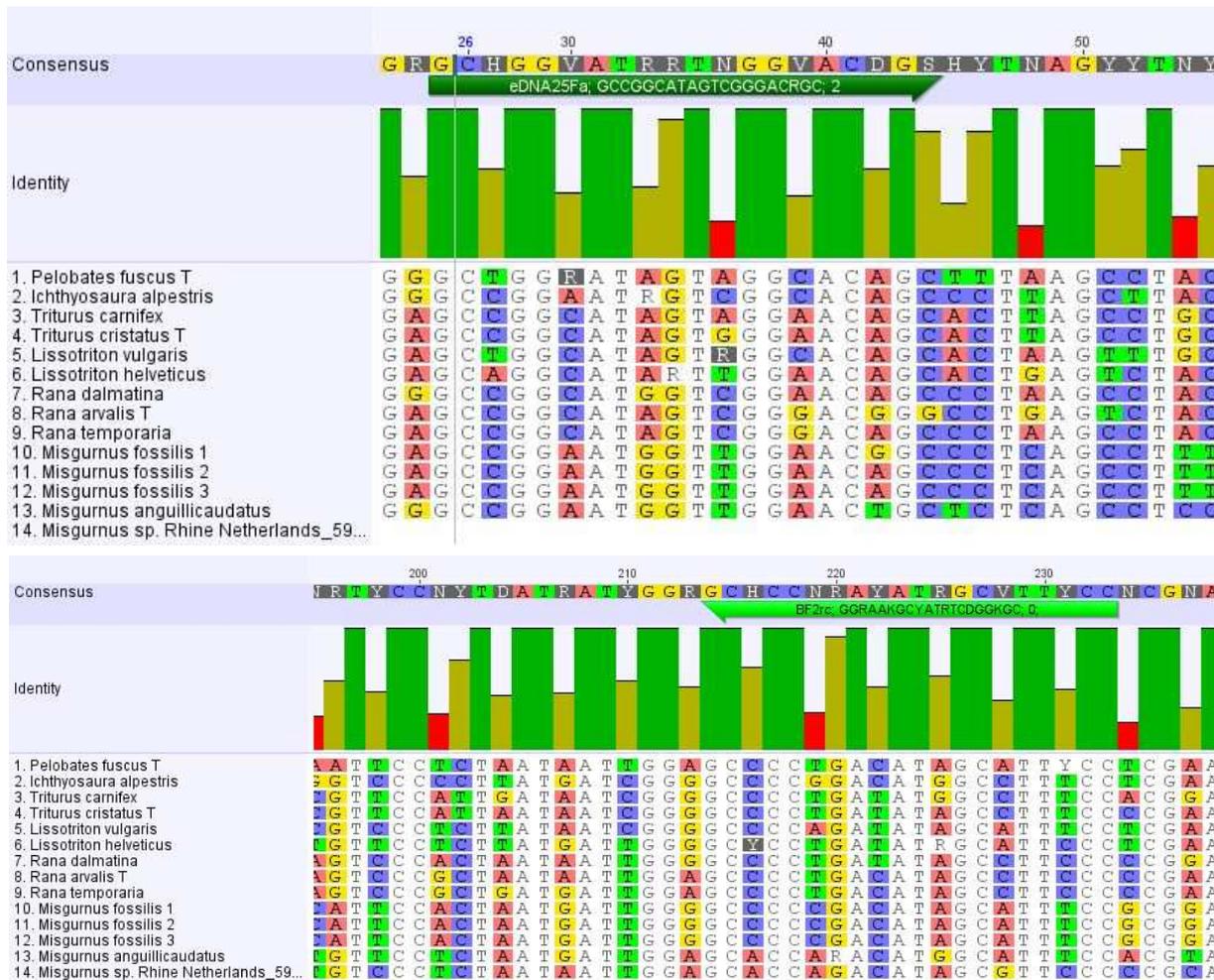
Wie bereits dargestellt gibt es unterschiedliche Ansätze für den gezielten Nachweis von Arten aus DNA-Mischproben bzw. über eDNA. Nach Durchsicht der Literatur zu eDNA-Nachweismöglichkeiten der drei Zielarten (*Triturus cristatus*, *Pelobates fuscus*, *Misgurnus fossilis*), sowie unter Einbeziehung der verfügbaren molekularen Daten in den Genbanken (BOLD und NCBI GenBank, bzw. GBOL und BFB), haben wir uns entschieden neue Primer zu entwickeln. Diese sollten auf jeden Fall alle drei Zielarten erfassen können, aber wenn möglich auch noch weitere Vertreter der Amphibien und Fische detektieren. Grundsätzlich können Primer umso besser und gezielter entwickelt werden, je mehr Sequenzinformationen zu den Zielarten und nah-verwandten Arten verfügbar sind. Aufgrund der großen DNA-Barcoding Initiativen wie GBOL und BFB in Deutschland, aber auch NORBOL und FINBOL in Skandinavien, die alle den internationalen Standards folgen und den offiziellen DNA-Barcode Marker nutzen (das 5' Ende des mitochondrialen Gens für die Cytochrom-Oxidase I, kurz COI) haben wir uns entschieden, ein informatives Teilstück innerhalb von COI für das Vorhaben zu suchen. Das Ziel DNA-Fragment muss dabei drei Anforderungen erfüllen: 1) Es muss möglichst kurz sein, um der potentiell schlechten DNA-Qualität von eDNA Rechnung zu tragen; 2) Es muss ausreichend phylogenetische Information beinhalten (=Sequenzunterschiede zwischen Arten), um alle Arten damit eindeutig bestimmen zu können; 3) Die das gewählte Fragment flankierenden Sequenzstücke müssen hinreichend konserviert (=gleich zwischen Arten) sein, um mit möglichst einem Hin- und einem Rückwärtsprimer alle Fragmente über eine PCR vervielfältigen zu können. Das letzte Kriterium ist das am schwierigsten zu erfüllende und nur möglich unter Nutzung von sog. degenerierten Nukleotidpositionen (wobbles) in der Primersequenz, bei denen eine künstliche Base nicht wie sonst nur mit einer Base eine Bindung eingeht, sondern je nach Grad der Degeneriertheit mit zwei oder allen vier Basen binden kann (letztlich über eine Mischung von an den betroffenen Positionen unterschiedlichen Primern). Das Design solcher Primer ist eine nicht-triviale Aufgabe:

neben dem Kompromiss zwischen universeller Amplifikation (passt für Alles) – mit der Gefahr die Zielart zu „übersehen“ wenn sie selten ist – und extremer Spezifität (passt nur bei einer oder sehr wenigen Arten) - mit der Gefahr eine bislang unbekannte COI-Variante (Haplotyp) einer Zielart zu „übersehen“ – gibt es weitere Faktoren, die einen funktionalen Primer ausmachen. Dazu gehören etwa der G/C Gehalt, die Schmelztemperatur, die Selbstbindungswahrscheinlichkeit und weitere Details, die wir hier nicht behandeln werden. Um die Sicherheit zu erhöhen, geeignete Primer gefunden zu haben, werden diese idealerweise in drei Schritten getestet: *in silico* (theoretisch am PC), *in vitro* (unter künstlichen Laborbedingungen), und *in situ* (mit vergleichbaren, realen Proben).

Ausgangspunkt der *in silico* Primerentwicklung war eine Sammlung von COI Sequenzen der folgenden elf Arten, welche potentiell in den untersuchten Gewässern vorkommen können: *Pelobates fuscus* (Knoblauchkröte), *Ichthyosaura alpestris* (Bergmolch), *Triturus carnifex* (Alpen-Kammolch), *Triturus cristatus* (Kammolch), *Lissotriton vulgaris* (Teichmolch), *Lissotriton helveticus* (Fadenmolch), *Rana dalmatina* (Springfrosch), *Rana arvalis* (Moorfrosch), *Rana temporaria* (Grasfrosch), *Misgurnus fossilis* (Schlammpeitzger), *Misgurnus anguillicaudatus* (Ostasiatischer Schlammpeitzger). Insgesamt standen davon 93 DNA Barcodes zur Verfügung, welche durch die Erstellung eines sog. alignments und anschließende Stammbaumerstellung auf Plausibilität geprüft wurden, um Fehlbestimmungen oder ähnliches auszuschließen (alle Analysen in Geneious R7). Im nächsten Schritt wurden identische Sequenzen (Haplotypen) entfernt und aus den verbliebenen 52 Sequenzen eine Neugruppierung (clustering) bei 3% Sequenzdivergenz durchgeführt. Daraus resultierten 15 sog. Consensus Sequenzen, wobei jede einzelne den „Durchschnitt“ aller Individuen einer Art darstellt (durch wobbles bei Positionen mit unterschiedlichen Basen), sofern sich diese in weniger als 3% der Nukleotidpositionen unterscheiden. Dies war bei allen Arten der Fall, außer dem Schlammpeitzger, da auch Tiere bzw. deren Barcodes analysiert wurden, die von Populationen in Italien und den Niederlanden stammen, welche durch ein Introgressionereignis von *Cobitis* sp. (Steinbeißer) in der Vergangenheit die Mitochondrien der fremden Art aufgenommen haben. Phänotypisch sind die Tiere eindeutig Schlammpeitzger, aber da das Einkreuzen der fremden Mitochondrien keinen negativen Einfluss hatte besitzen sie Barcodes einer anderen Art, bzw. sogar einer anderen Gattung. Würde man diese Tatsache beim Primerdesign außeracht lassen, liefe man Gefahr die Art zu übersehen wenn sie auf eine introgressierte Linie zurückgeht.

Nach einem ersten, semi-automatischen Primersuchlauf mittels der Primer3 Software, wurden einige Kandidaten gefunden, welche händisch weiter angepasst wurden. Dadurch konnte ein geeignet erscheinender Primer relativ am Beginn der 5' COI Region gefunden werden. Ein passender Rückwärtsprimer dazu wurde aus einer Studie übernommen (Elbrecht & Leese 2016), aber in seine revers-komplementäre Form übersetzt, um als Rückwärtsprimer fungieren zu können.

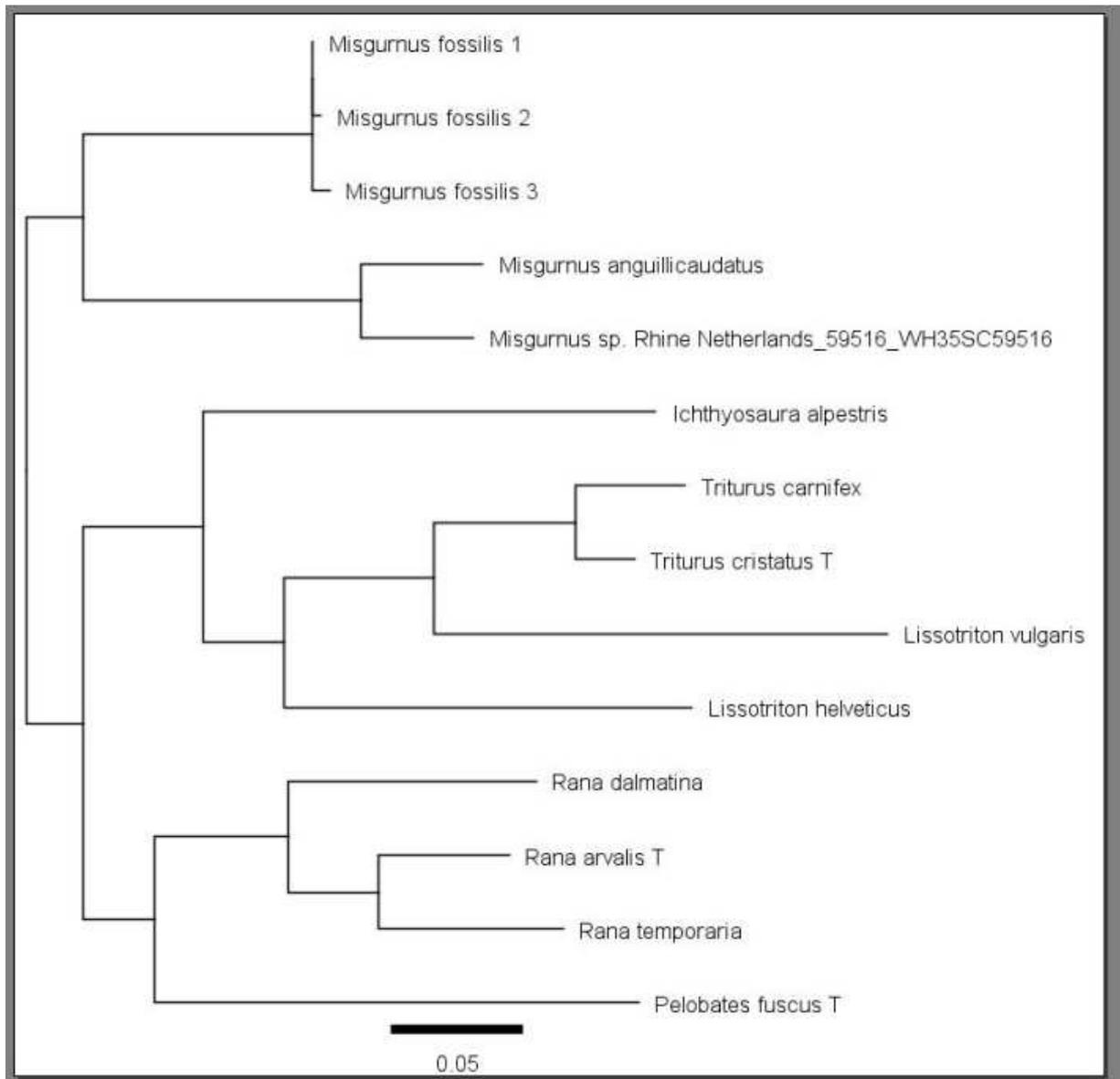
Das gefundene COI-Fragment der Länge 169 Basenpaare wurde dann auf seinen Informationsgehalt hin getestet, und die errechneten Sequenzunterschiede in ein Baumdiagramm übersetzt:



**Abbildung 3:** Ausschnitte aus dem alignment der 14 consensus COI Sequenzen, welche dem Primerdesign zugrunde lagen. Oben ist die Bindestelle und der Vorwärtsprimer dargestellt (ab Pos. 24) unten der gegenläufige Rückwärtsprimer, welche das Zielfragment flankieren.

**TABELLE 1: BENUTZTE ABKÜRZUNGEN**

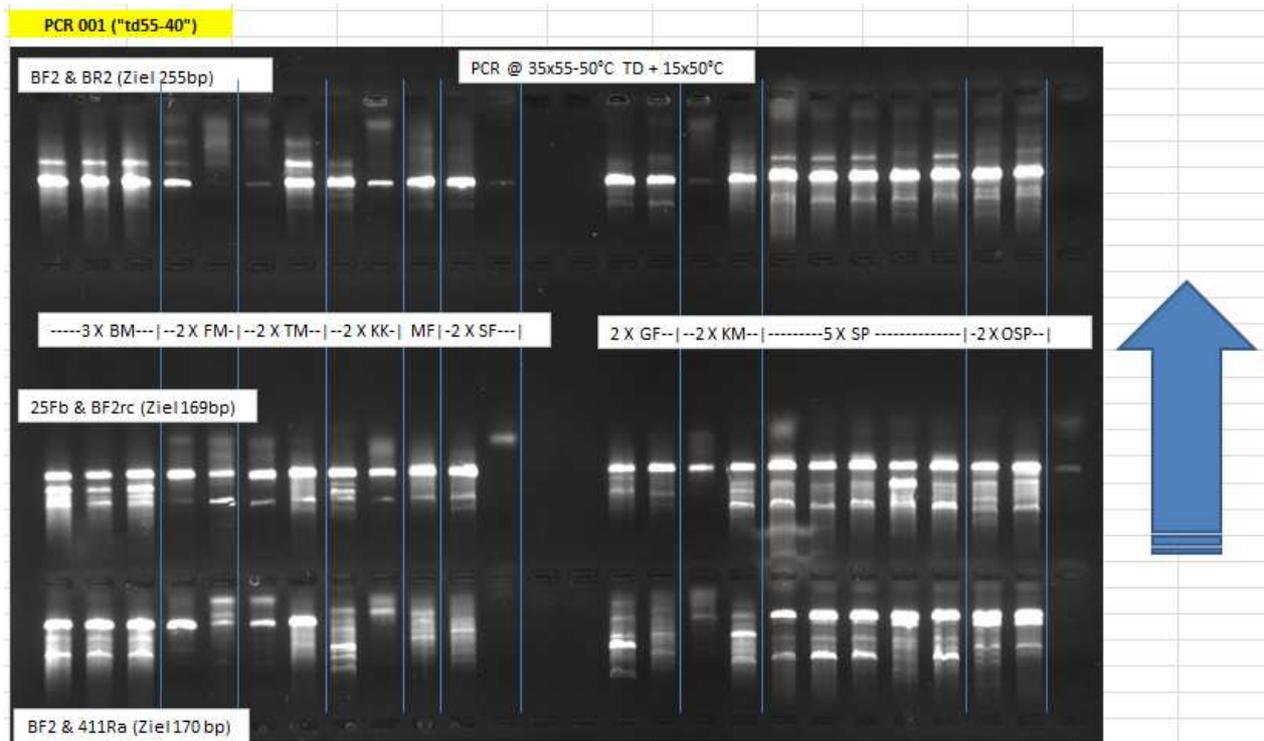
Abkürzung und Art	
BM	Bergmolch
FM	Fadenmolch
TM	Teichmolch
KK	Knoblauchkröte
MF	Moorfrosch
SF	Springfrosch
GF	Grasfrosch
KM	Kammolch
SP	Schlammpeitzger
OSP	Ostasiatischer Schlammpeitzger
AKM	Alpen Kammolch



**Abbildung 4:** Die Darstellung der genetischen Distanzen (K2P Modell) zeigt eine deutliche Trennung aller Zielarten. Das gewählte, kurze Fragment besitzt also genug Information, um die Arten sicher darüber zu bestimmen.

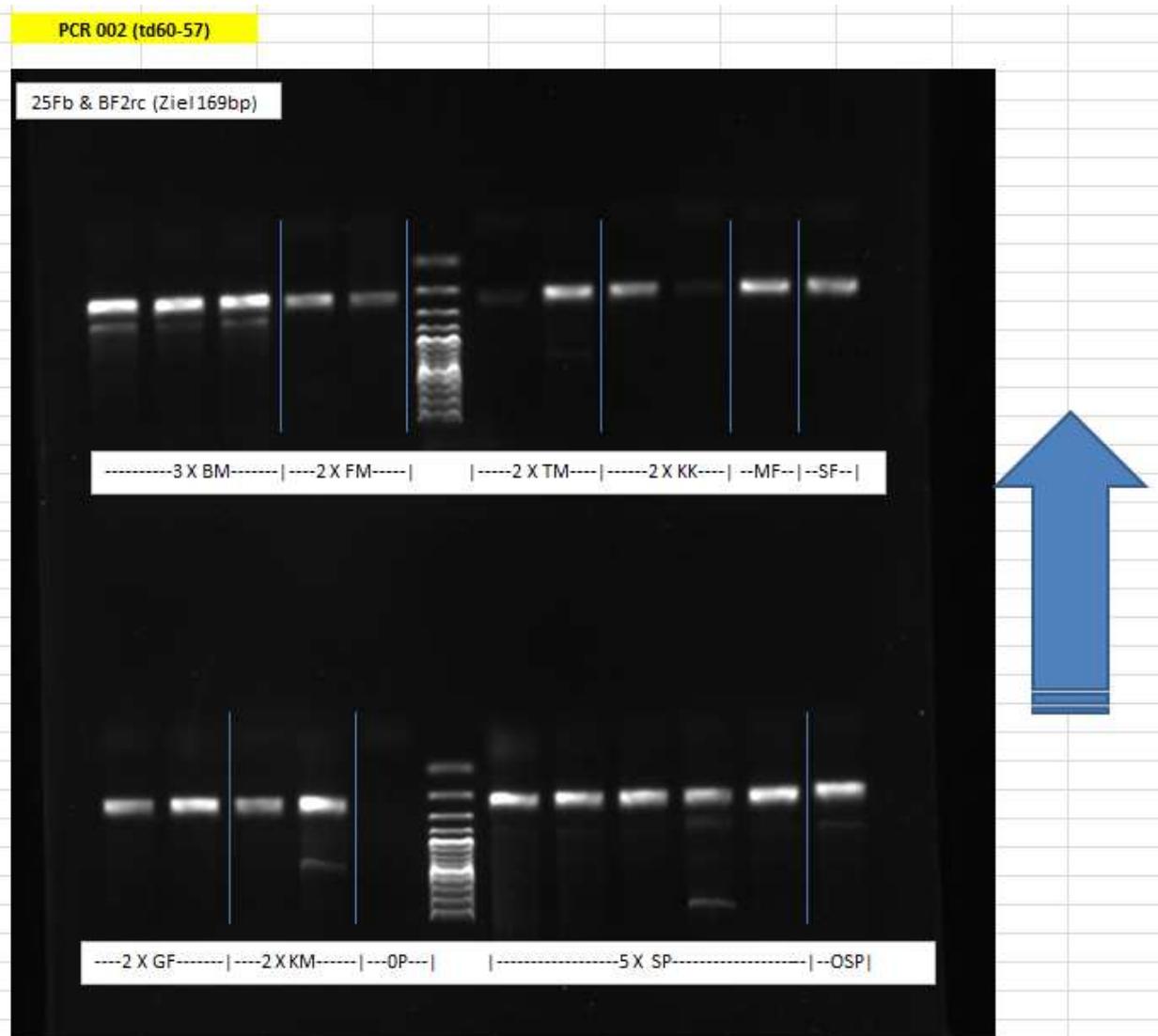
Auf die theoretischen Tests in der Geneious Umgebung folgte im Anschluss ein Versuch mit echten DNA-Proben einer Reihe verschiedener Arten. Die DNA dazu wurde entweder aus der Biobank des ZFMK und dem GBOL-Projekt genutzt, oder stammte von Kollegen der ZSM in München.

Die erste Test-PCR umfasste 23 Tiere aus 10 Arten (vgl. Tabelle oben) und es wurden drei verschiedene Primerkombinationen getestet (BF2 & BR2, Oben; 25Fb & BF2rc, Mitte; BF2 & 411Ra, Unten). Die Abbildung oben zeigt, dass die Kombination 25Fb & BF2rc bei allen Tieren ein Produkt (eine leuchtende Bande) erzeugte, wohingegen die anderen beiden Kombinationen (leichte) Ausfälle zeigten (Oben: FM, SF, KM; Unten: KK, GF, KM). Weitere Tests dienten dann dazu, die PCR Einstellungen zu optimieren, um sog. Fehlbanden zu unterdrücken.



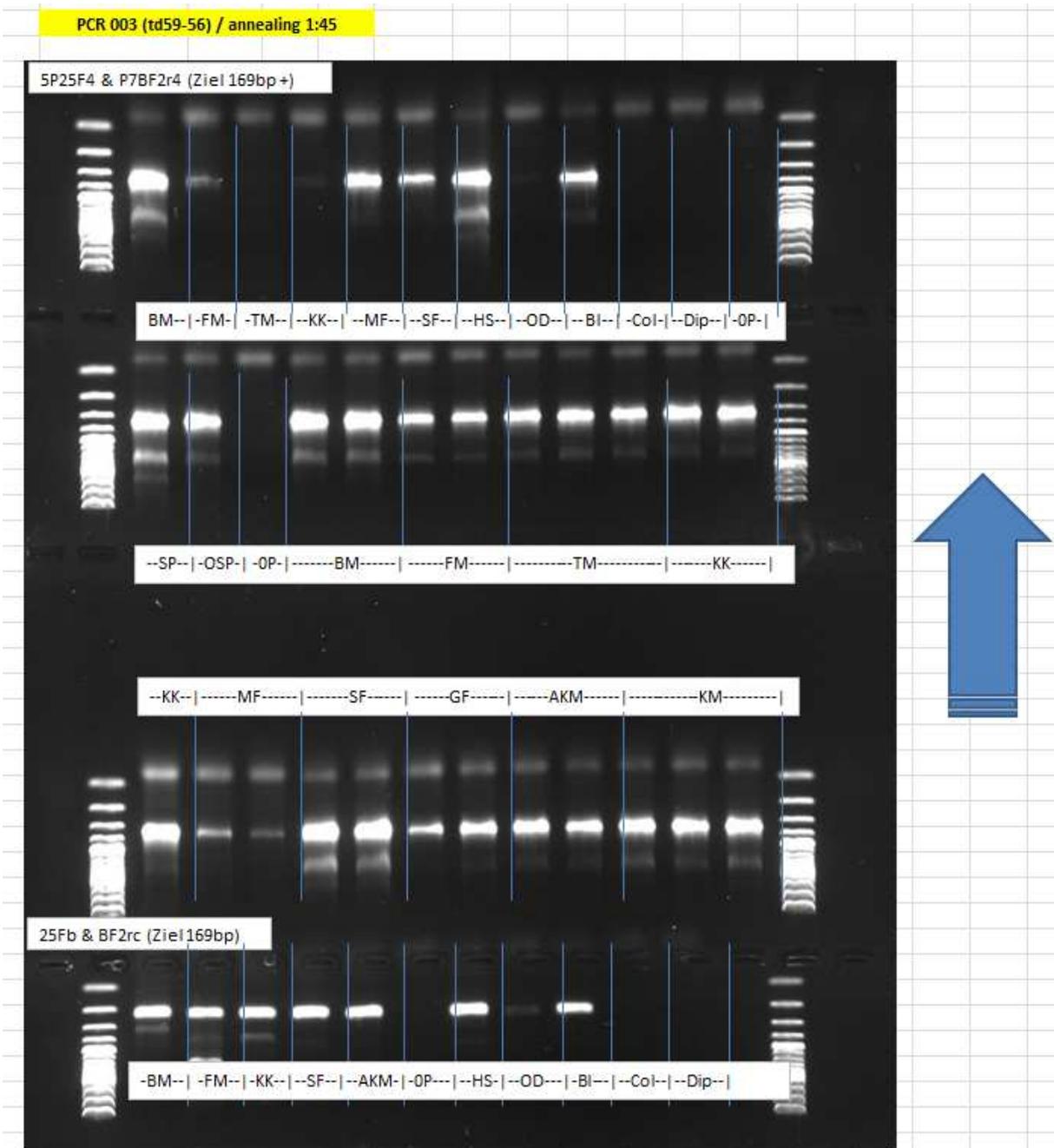
**Abbildung 5:** Das Ergebnis der ersten Test-PCR. Die nach der Vervielfältigung mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzte DNA wandert in einem Agarosegel unter Spannung von unten nach oben und wird der Größe nach sortiert. Details im Text.

Die zweite Test-PCR zeigte dann durch Erhöhung der Temperatur bei der Anlagerung (annealing) der Primer an die DNA-Vorlagen (templates) auf 60°-57°C eine deutliche Verbesserung in Form von weniger Schatten- und Doppelbanden. Die in der Mittleren Spalte mit-wandernde DNA-Leiter zeigt, dass das Produkt der theoretisch erwarteten Fragmentlänge von 169 Basenpaaren (plus Primerlängen) entspricht.



**Abbildung 6:** Das Ergebnis der zweiten Test-PCR. Die nach der Vervielfältigung mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzte DNA wandert in einem Agarosegel unter Spannung von unten nach oben und wird der Größe nach sortiert. Details im Text.

Die dritte Test-PCR diente einerseits dazu, die Primer in ihrer NGS-Variante („fusion“) mit Illumina Adaptoren und Index mit maximalem N-Shift zu testen (Oben), sowie zu beurteilen, welche anderen Tiergruppen wahrscheinlich mit-amplifiziert werden würden (HS: Höckerschwan; OD: Libellen; BI: Biber; Col; Käfer; Dip: Fliegen).



**Abbildung 7:** Das Ergebnis der dritten Test-PCR. Die nach der Verfielfältigung mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzte DNA wandert in einem Agarosegel unter Spannung von unten nach oben und wird der Größe nach sortiert. Details im Text.

Der erste Teil des dritten Tests hat den Hintergrund, dass es kostengünstiger ist, selbst Primer mit den nötigen Adaptorsequenzen für die Illumina NGS-Maschinen zu bestellen, anstatt die fertigen Kits der Firma zu bestellen. Zudem würde so nur eine einzige PCR durchgeführt werden müssen, was wiederum Zeit & Kosten einsparen würde, aber auch die Gefahr von Kontamination und Chimärenbildung („künstliche“ Artefakt-Barcodes) reduziert. Jeder Primer erhält zudem einen sog. Index (zwischen 0 und 4 Basenpaar Länge), welcher es durch Variation in der Zusammensetzung später ermöglicht, viele Proben auf einmal zu sequenzieren. Die einzelne Probe kann über die Basenabfolge der Indizes des Vorwärts- und Rückwärtsprimers eindeutig zugeordnet werden. Allerdings werden die Primer dadurch sehr lang (von ca. 20 auf über 80 Basen), was in der Regel zu etwas schlechteren PCR –Ergebnissen führen soll. Aus dem ersten PCR-Primer „25F“ wird somit aus GCHGGMATRGTNGGMACRGC die Fusion-Variante „5P25F0“:

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCHGGMATRGTNGGMACRGC (Illumina flow cell bind + Sequenzier Primer bind + Shift(hier: 0) + PCR-Primer).

Wie aus der Abbildung oben ersichtlich, lieferte die PCR trotz der benutzten, mit zwei Mal 4 Basen N-Shift als Indizes maximal langen Primern ein sehr gutes Ergebnis und zeigte bei allen Zielarten ein Produkt. Der Versuch mit den Wirbellosen Arten verlief negativ, nur der Biber und Höckerschwan zeigten eine klare Bande. Basierend auf diesen Tests wurden dann folgende Primer bestellt:

TABELLE 2: PRIMERSEQUENZEN

Name	Fusion-Primer Sequenzen	Länge bps
5P25F 0	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTGCHGGMATRGTNGGMACRGC	78
5P25F 2a	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTATGCHGGMATRGTNGGMACRGC	80
5P25F 2b	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTGAGCHGGMATRGTNGGMACRGC	80
5P25F 3a	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTCGAGCHGGMATRGTNGGMACRGC	81
5P25F 3b	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTCTTGCHGGMATRGTNGGMACRGC	81
5P25F 4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTTACAGCHGGMATRGTNGGMACRGC	82
P5BF 2r0	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTGGRAAKGCIYATRTCDGGKGC	78
P5BF 2r2a	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTAAGGRAAKGCIYATRTCDGGKGC	80
P5BF 2r2b	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTTTGGRAAKGCIYATRTCDGGKGC	80
P5BF 2r3a	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTCAGGGRAAKGCIYATRTCDGGKGC	81
P5BF 2r3b	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTTGCGGRAAKGCIYATRTCDGGKGC	81
P5BF 2r4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTAATTGGRAAKGCIYATRTCDGGKGC	82
7P25F 0	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTT CCGATCTGCHGGMATRGTNGGMACRGC	81
7P25F 2a	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTT CCGATCTATGCHGGMATRGTNGGMACRGC	83
7P25F 2b	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTT CCGATCTGAGCHGGMATRGTNGGMACRGC	83
7P25F 3a	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTT CCGATCTCGAGCHGGMATRGTNGGMACRGC	84
7P25F 3b	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTT CCGATCTCTTGCHGGMATRGTNGGMACRGC	84
7P25F 4	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTT CCGATCTTACAGCHGGMATRGTNGGMACRGC	85
P7BF 2r0	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTT CCGATCTGGRAAKGCIYATRTCDGGKGC	81
P7BF 2r2a	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTT CCGATCTAAGGRAAKGCIYATRTCDGGKGC	83
P7BF 2r2b	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTT CCGATCTTTGGRAAKGCIYATRTCDGGKGC	83
P7BF 2r3a	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTT CCGATCTCAGGGRAAKGCIYATRTCDGGKGC	84
P7BF 2r3b	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTT CCGATCTTGCGGRAAKGCIYATRTCDGGKGC	84
P7BF 2r4	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTT CCGATCTAATTGGRAAKGCIYATRTCDGGKGC	85

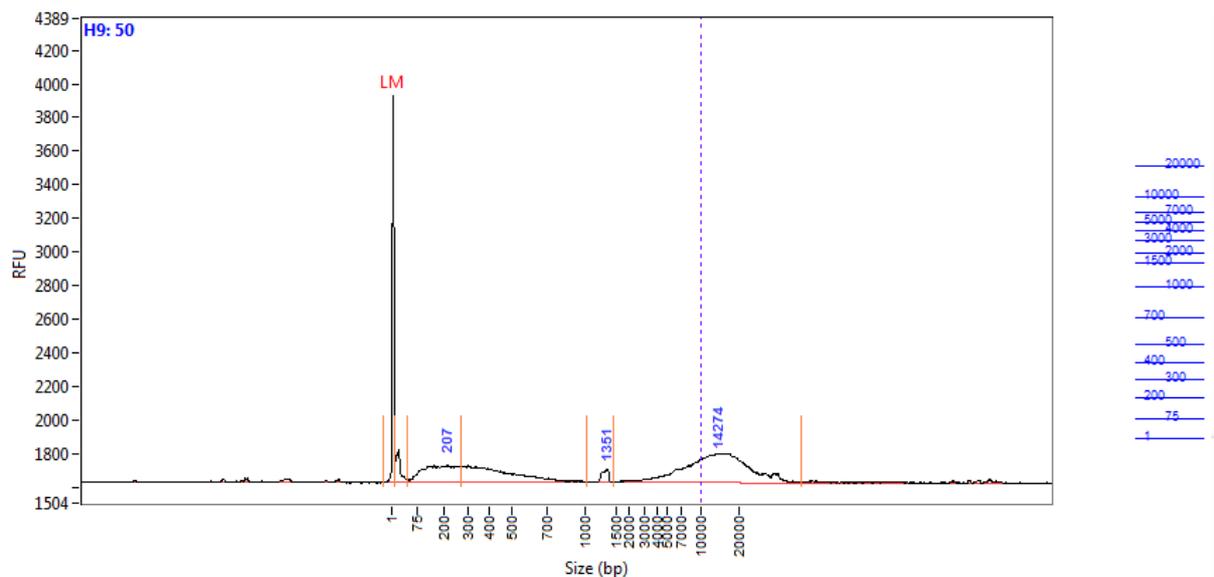
### DNA Extraktion & Quantifizierung

Der erste Schritt im Molekularlabor nach der Probennahme ist die DNA-Extraktion. Auch dafür gibt es keinen allgemein gültigen Standard und jede Methode hat Vor- und Nachteile. Wir haben uns für eine Extraktion mittels kommerziell erhältlichen Kit entschieden, da die Laborkraft damit am besten vertraut war und dieses auch in der Literatur oft für eDNA Filter Verwendung findet (Lieferant: Qiagen, DNeasy Blood & Tissue Kit, # 69506). Die DNA-Extraktion folgte dem offiziellen Protokoll von Qiagen, es wurden jedoch die doppelten Volumina eingesetzt, um dem vergleichsweise großen Volumen der Filter im Vergleich zu normalen Gewebeproben Rechnung zu tragen:

TABELLE 3: LABORPROTOKOLL

Tag	Maßnahmen
1	<ul style="list-style-type: none"><li>- Filter vorsichtig herausholen, abtropfen &amp; trocknen lassen (über Nacht)</li><li>- pro Filter neue Pinzetten benutzen</li><li>- Filter ganz in 2 ml Eppendorf tube packen, etwas zerrupfen &amp; drücken / stopfen</li><li>- 360 µl ATL + 40 µl ProtK dazu pipettieren</li><li>- über Nacht oder mind. 3 Stunden bei 55°C und 300rpm lysieren</li></ul>
2	<ul style="list-style-type: none"><li>- Eppendorf tube kurz (10s @ 600 rpm) abzentrifugieren</li><li>- 800µl der 1:1 AL+EtOH Mischung dazu pipettieren</li><li>- 10s vortexen, kurz abzentrifugieren</li> <li>- 600µl davon in spin-column tube auf 2ml collection-tube pipettieren</li><li>- 1 Minute zentrifugieren bei 8000rpm (6000g)</li><li>- collection-tube ausleeren &amp; wieder verwenden</li> <li>- restlichen 600µl in das gleiche spin-column tube auf 2ml collection-tube pipettieren</li><li>- 1 Minute zentrifugieren bei 8000rpm (6000g)</li><li>- collection-tube entsorgen, spin-column in neues 2ml collection-tube setzen</li> <li>- 500µl AW1 Puffer dazu pipettieren</li><li>- 1 Minute zentrifugieren bei 8000rpm (6000g), collection-tube entsorgen</li><li>- spin-column in neues 2ml collection-tube setzen</li> <li>- 500µl AW2 Puffer dazu pipettieren</li><li>- 3 Minuten zentrifugieren bei 14000rpm (20000g), collection-tube entsorgen</li><li>- spin-column in neues 1,5ml Eppendorf tube setzen</li> <li>- 2 X 25µl ddH2O auf den Filter pipettieren, 1 Minute inkubieren (bei Raum Temperatur)</li><li>- 1 Minute zentrifugieren bei 8000rpm (6000g)</li></ul>
	Das Lysat mit der DNA einfrieren wenn nicht unmittelbar damit weiter gearbeitet wird.

Zur Evaluierung des DNA-Extraktionserfolges und zur Quantifizierung der enthaltenen DNA wurde ein Aliquot jedes Lysats auf einem Fragment Analyzer (AATI) mit dem Standard und High Sensitivity Genomic DNA Analysis Kit analysiert. Dabei wird die DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und aufgrund ihrer elektrischen Ladung in einer Gelmatrix nach Größe aufgetrennt. Kleine DNA Fragmente bewegen sich dabei schneller und werden zuerst detektiert, längere Fragmente laufen langsamer durch das Gel. Die Menge an DNA einer bestimmten Länge wird anhand der Stärke des Leuchtsignals ermittelt. Ein dazu gegebener Größenstandard (sog. DNA-Leiter bekannter Zusammensetzung) dient dabei als Kalibrierung.



**Abbildung 8:** Darstellung der DNA-Qualität und Menge in einer Probe. Die X-Achse gibt die Länge der DNA-Fragmente in Basenpaaren an, die Y-Achse zeigt die relative Intensität des Fluoreszenzsignals. In diesem Beispiel sind viele kurze DNA-Fragmente zwischen 75 und 500 Basenpaaren vorhanden, aber auch viel hochmolekulare DNA mit Längen zwischen 5000 und 23000 Basenpaaren.

Der Vergleich aller Proben zeigte erfreulicherweise immer einen deutlichen Unterschied zwischen den Nullproben und den drei „echten“ Proben mit DNA aus den Gewässern.

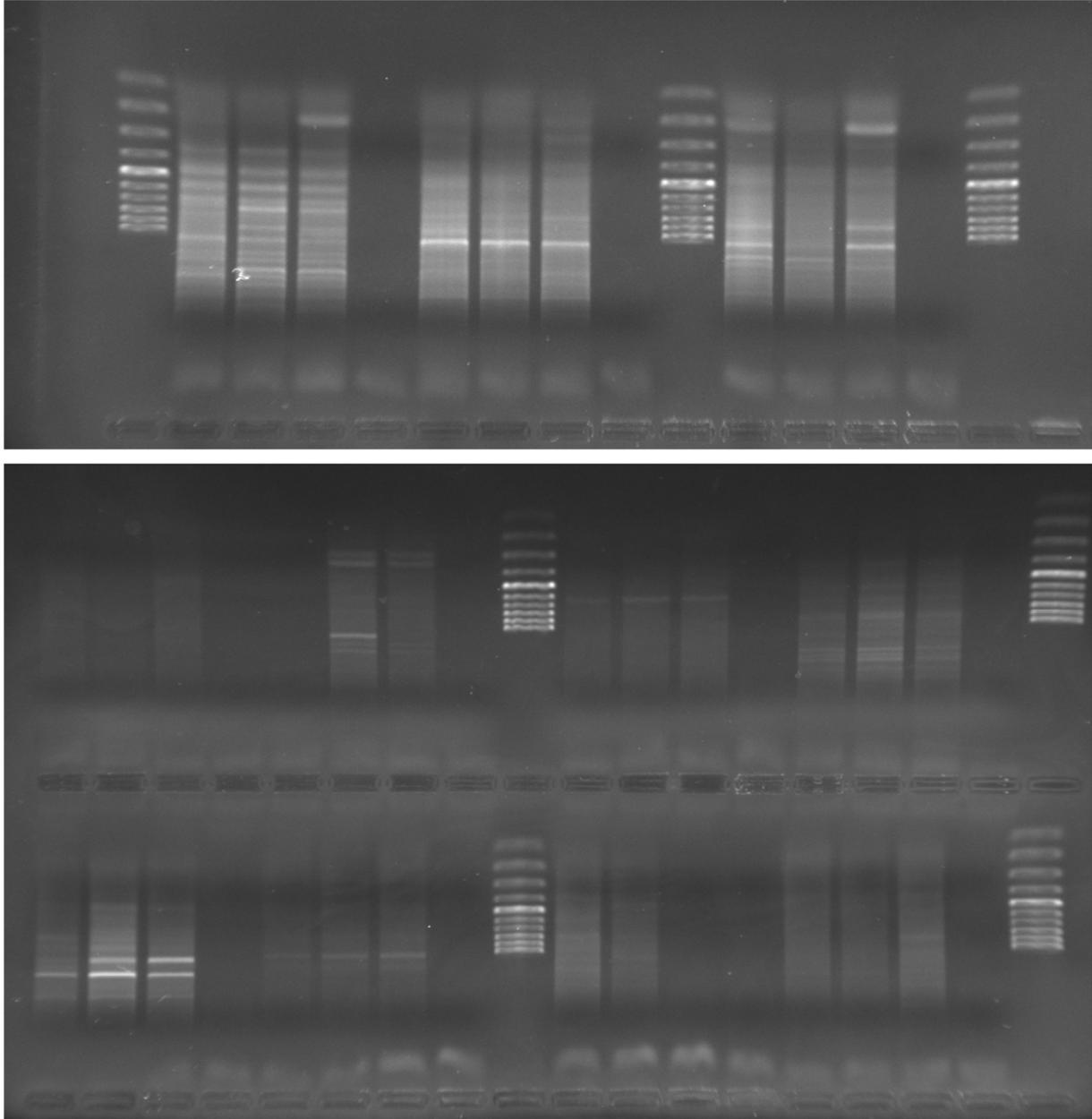
Zusätzlich wurde die Gesamt-DNA-Menge aller Proben (ohne Nullproben) mittels Messung auf einem Qubit-Fluorometer bestimmt. Dazu wurden jeweils 3 Messungen pro Probe durchgeführt und der Mittelwert gebildet:

**TABELLE 4: PROBENÜBERSICHT**

Probe	DNA (ng/µl)				
	ml Filtrat	Qubit 1	Qubit 2	Qubit 3	Qubit m
GWe001	150				8
GWe002	150	7,48	7,3	7,32	7
GWe003	150	9,38	8,76	8,9	9
GWe013	0				
GWe014	250	9,26	8,9	8,9	9
GWe015	250	24,6	24	24	24
GWe016	250	14	13,8	13,8	14
GWe017	0				
GWe018	150	33,2	32,2	33,2	33
GWe019	250	9,74	9,46	9,5	9
GWe020	200	28,6	28,2	28	28
GWe021	0				
GWe022	250	17,4	17	17	17
GWe023	250	16,2	15,7	15,7	16
GWe024	250	9,52	9,24	9,26	9
GWe025	0				
GWe026	350	28,8	27,8	27,8	28
GWe027	250	19,5	19,2	19,3	19
GWe028	250	31,4	30,8	30,8	31
GWe029	0				
GWe030	250	9,12	8,86	8,88	9
GWe031	250	6,06	5,84	5,84	6
GWe032	250	5,18	4,96	4,98	5
GWe033	0				
GWe034	250	3,5	3,38	3,4	3
GWe035	250	4,02	3,76	3,8	4
GWe036	250	6,16	6	5,86	6
GWe037	0				
GWe038	250	8,46	8,26	8,24	8
GWe039	250	15,6	15,4	15,4	15
GWe040	250	12,7	12,7	12,7	13
GWe041	0				
GWe042	250	57	56,6	56,8	57
GWe043	250	66,6	65,8	65,4	66
GWe044	250	58,4	57,6	57	58
GWe045	0				
GWe046	250	58,2	57,4	57,2	57
GWe047	250	83,4	82,4	83	83
GWe048	250	37,8	37	37,2	37
GWe049	0				
GWe050	250	34,8	34	34	34
GWe051	250	18,8	18,4	18,6	19
GWe052	250	22,6	22	22	22

## ERGEBNISSE

Entgegen den Erwartungen basierend auf den *in silico* und *in vitro* Tests konnten mit den DNA-Extrakten der Teichproben keine raschen Erfolge erzielt werden. Zwar wurde erwartet, dass die geringen DNA-Mengen und suboptimale Qualität bei einzelnen Proben zu Ausfällen führen würden, allerdings konnten mit verschiedensten PCR-Ansätzen (Qiagen Multiplex & Illustra beads) und Verdünnungen (1:10 bis 1:100) der Extrakte zur Reduzierung von PCR-Inhibitoren keine aussichtsreich-sequenzierbaren Produkte erstellt werden.



**Abbildung 9:** Das Ergebnis einer PCR mit DNA aus den Gewässerproben. Die nach der Verfielfältigung mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzte DNA wandert in einem Agarosegel unter Spannung von unten nach oben und wird der Größe nach sortiert. Details im Text.

Interessanterweise zeigen die drei genommenen Proben pro Gewässer ein sehr ähnliches PCR-Gelbild, was auf das gemeinsame Vorkommen von Mikroorganismen deutet, deren DNA sich leider besser mit den PCR-Primern amplifizieren lässt, als die DNA der Ziel-Wirbeltiere. In der Abbildung oben kann man das an den jeweils drei ähnlichen Banden-Schmiermustern erkennen, auf die jeweils das Ergebnis der erfreulich sauberen Nullprobe (ohne Bande) folgt.

Da die DNA-Messungen zeigten, dass prinzipiell DNA in den Proben aus gefiltertem Wasser vorliegt, und wir sicher sind, mit geeigneten Primern auch Amphibien und Fische nachweisen zu können, laufen derzeit neue Tests mit der an anderer Stelle erfolgreich eingesetzten Primerkombination BF2 & BR2 (Elbrecht & Leese 2016). Am Beginn der Studie hatten wir uns gegen deren Einsatz entschieden, da der Rückprimer BR2 außerhalb der bekannten COI-Sequenzen der Zielarten liegt, es also keine Information darüber gibt, wie gut die Primer dort binden werden. Zudem hatte die Kombination im ersten PCR-Test (s.o.) weniger gut funktioniert.

### **Untersuchte Gewässer (inkl. Teildiskussion)**

Insgesamt konnten in der Studie 160 Arten nachgewiesen und identifiziert werden. Dazu kommen mehrere Tausend OUT's bei denen ersichtlich ist, dass es zusätzliche Arten sind, es aber derzeit noch nicht möglich ist diese über die Datenbanken zu identifizieren. Dennoch gehört nur ein kleiner Teil, 23 Arten, zu den Wirbeltieren während der Großteil sich auf Wirbellose oder Pilze verteilt. Das Artenspektrum wird von vollaquatischen Arten dominiert, gefolgt von semi-aquatischen (z.B. den verschiedenen Molcharten) und rein terrestrischen Arten (z.B. Rothirsch oder Mauersegler).

### **Craimoosweiher**

Am Weiher konnten 17 Arten sicher zugeordnet werden. Artenschutzrechtlich interessant ist nur der Nachweis des Teichfroschs, der eine Anhang V Art ist. Neben vornehmlich Wirbellosen wurden nur einzelne Wirbeltiere und insgesamt sehr wenig Arten für ein so großes Gewässer nachgewiesen. Das kann an der gewählten Entnahmestelle und -weise liegen. Entnommen wurde zwar an einem der beiden Abflüsse allerdings alle drei Proben im direkten Umfeld dieser. Dennoch verwundert es etwas, dass Arten wie Höckerschwan, Stockente oder Lachmöwe nicht detektiert wurden, da sie an der Entnahmestelle dominant auftreten.

### **Eremitage | Untere Grotte**

In der Unteren Grotte konnten 25 Arten sicher zugeordnet werden. Darunter sind auch beide dort bekannten Molcharten (Teich- und Bergmolch), allerdings nicht der dort mit Einzelfunden belegte Kammolch. Interessant sind sicherlich die Nachweise des Süßwasserschwamms und den Höhlenflohkrebs. Beides sind zwar keine bedrohten oder artenschutzrelevanten Arten, gerade aber das Vorkommen eines Höhlenflohkrebses ist von wissenschaftlicher Bedeutung. Über Tiere die Gruppe ist bisher kaum etwas bekannt und damit auch über die Ausbreitungswege dieser Höhlen- und Grundwassertiere. Insgesamt konnten im Vergleich relativ viele Arten nachgewiesen werden, vor allem wenn man bedenkt, dass das Gewässer regelmäßig trocken gelegt und gereinigt wird. Wahrscheinlich liegt der vergleichsweise hohe Nachweis an der geringen Größe des Gewässers.

### **LBV Lindenhof**

Im Tümpel konnten 46 Arten sicher zugeordnet werden. Bedeutsame Nachweise sind die artenschutzrelevanten Arten Kammolch und Teichfrosch, wobei die im Gewässer mit traditioneller Methode nachgewiesene Knoblauchkröte nicht nachgewiesen wurde. Dies kann in Kombination an der relativ späten Entnahme der Proben und einer geringen oder ausbleibenden Fortpflanzung der Art gelegen haben, denn über die traditionellen Methoden konnten in dem Gewässer nie Kaulquappen der Art nachgewiesen werden. Daneben konnten u.a. noch Teich- und Bergmolch, sowie die kleine Süßwassermuschel *Musculium lacustre* (Vorwarnstufe der Roten Liste) und der Süßwasserpolyptyp identifiziert werden. Insgesamt wurden vor allem Wirbellose und Pilze in dem kleinen Gewässer kartiert werden. Die insgesamt hohe Artenzahl scheint durch die geringe Größe des Tümpels begründet zu sein.

### **Ottenhof**

Am Weiher konnten 27 Arten sicher zugeordnet werden. Nicht detektiert wurden die Amphibienarten die im Gewässer mit der traditionellen Methode nachgewiesen werden konnten (Bergmolch, Wasserfrosch-Komplex). Auch hier wurden vor allem Wirbellose Arten identifiziert, was wahrscheinlich an der Größe des Gewässers und ggf. seiner Tiefe liegt.

### **Höhle bei Plech**

In der Höhle konnten 40 Arten sicher zugeordnet werden. Darunter sind die beiden Fischarten Rotfeder und Schleie sowie zahlreiche Wirbellose wie Muschelkrebse und der Süßwasserpolyptyp. Die in dem Gesamtkomplex aus Höhle und Regenrückhaltebecken nachgewiesenen Kammolche wurden nicht über die eDNA detektiert. Der ebenfalls in dem Gesamtkomplex nachgewiesene Blaubandbärbling wurde ebenfalls nicht detektiert, was daran liegen kann, dass die DNA Sequenz dieses Neozoen noch nicht in den Datenbanken hinterlegt ist.

### **Regenrückhaltebecken Nördlich Plech**

In der Sickerfläche konnten 57 Arten sicher zugeordnet werden. Neben dem kuriosen Nachweis des Rothirsches wurden der artenschutzrechtlich relevante Teichfrosch und die Häubchenmuschel *Musculium lacustre* (Vorwarnstufe der Roten Liste) identifiziert. Die mit traditionellen Methoden nachgewiesenen Arten Kammolch und Laubfrosch (beide auch reproduzierend) konnten über eDNA nicht gefunden werden. Mit insgesamt 57 nachgewiesenen Arten konnten aber vergleichsweise sehr viele Arten gefunden werden, was wahrscheinlich durch die geringe Größe und Wassertiefe dieser Sickerfläche begründet ist.

### **Aichaer Teich**

Im Weiher konnten 50 Arten sicher zugeordnet werden. Unter den vergleichsweise vielen Wirbeltieren auch der Zwergtaucher und der artenschutzrelevante Teichfrosch. Unter den Wirbellosen ist vor allem auf das Vorkommen der Häubchenmuschel *Musculium lacustre* (Vorwarnstufe der Roten Liste), mehrerer Muschelkrebsarten und zwei Polypenarten hinzuweisen. Auch der Süßwasserschwamm kommt in diesem Gewässer vor. Auch wurden anscheinend aufgrund der geringen Größe und Wassertiefe vergleichsweise viele Arten nachgewiesen.

### **Callenberger Forst**

Im Weiher konnten 83 Arten sicher zugeordnet werden. Darunter sind der stark gefährdete Bitterling, sowie der Süßwasserschwamm und beide Polypenarten. Die Bitterlinge stellen wahrscheinlich ein natürliches Vorkommen dar, da uns keine Besatzmaßnahmen bekannt sind. In keinem anderen Gewässer konnten so viele Arten klar identifiziert werden wie im Callenberger Teich.

### **Froschgrundsee**

Keine Nachweise, da die Wasserproben Probleme bereitet haben.

### **Goldbergsee**

Im See konnten 20 Arten sicher zugeordnet werden. Ähnlich wie beim Craimoosweiher sind dies im Vergleich sehr wenige Arten, was wahrscheinlich auf die Größe und die Tiefe des Gewässers zurückzuführen ist. Dies betrifft vor allem die Wirbeltiere, die mit nur zwei identifizierten Arten klar zu vernachlässigen sind. Unter den Wirbellosen wurden auch hier beide Polypenarten und der Süßwasserschwamm gefunden.

### **Muggendorfer Tongruben**

Im Weiher konnten 50 Arten sicher zugeordnet werden. Darunter der artenschutzrechtliche relevante Teichfrosch, die Häubchenmuschel *Musculium lacustre* (Vorwarnstufe der Roten Liste) und beide Polypenarten. Insgesamt konnte aber nur eine Wirbeltierart identifiziert werden die 49 anderen Arten (Wirbellose, Pilze, Kieselalgen) gegenüber steht.

### **Theisau 1 [bei Horb]**

Im Altarm konnten 62 Arten sicher zugeordnet werden. Darunter neben vielen anderen Fischen auch der stark gefährdete Bitterling, sowie beide Polypenarten und der Süßwasserschwamm. Ob die Bitterlinge auf ein natürliches Vorkommen zurückzuführen sind konnte nicht geklärt werden.

### **Theisau 2 [bei Burgkunstadt]**

Am Weiher konnten 71 Arten sicher zugeordnet werden. Neben dem stark gefährdeten Bitterling, konnte auch der Gründling (Vorwarnliste), die Häubchenmuschel *Musculium lacustre* (ebenfalls Vorwarnstufe), beide Polypenarten und der Süßwasserschwamm nachgewiesen werden.

### **Zielarten**

Die eigentlichen Zielarten Kammolch, Knoblauchkröte und Schlammpeitzger wurden größtenteils nicht gefunden. Nur im Tümpel am Lindenhof konnte der Kammolch mittels eDNA nachgewiesen werden. Auch in den Gewässern wo die Arten vorher mit traditionellen Methoden gefunden wurden (Lindenhof: Knoblauchkröte; RRB N Plech: Kammolch; Hühle Plech: Kammolch) wurden die Arten nicht genetisch identifiziert.

**TABELLE 5: GEWÄSSER MIT DEN JEWEILS IDENTIFIZIERTEN ARTEN**

Gruppe	Trivialname	Art	Landkreis Coburg				Landkreis Bayreuth						Landkreis Lichtenfels	
			Aichaer Teich	Callenberger Forst	Goldberg See	Muggendorfer Tongrube	Craimoos Weiher	Eremitage Untere Grotte	Höhle Ottenhof	LBV Lindenhof	RRB N Plech	Höhle Plech	Theisau 1	Theisau 2
Säugetiere	Rothirsch	<i>Cervus elaphus</i>									x			
Säugetiere	Bisamratte	<i>Ondatra zibethicus</i>								x				
Vögel	Stockente	<i>Anas platyrhynchos</i>	x	x				x	x	x			x	
Vögel	Reiherente	<i>Aythya fuligula</i>		x										
Vögel	Mauersegler	<i>Apus apus</i>										x		
Vögel	Taube	<i>Columba palumbus</i>										x	x	
Vögel	Zwergtaucher	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	x											
Vögel	Bläßhuhn	<i>Fulica atra</i>	x	x									x	
Amphibien	Teichfrosch	<i>Pelophylax kl. esculentus</i>	x			x	x			x	x			
Amphibien	Bergmolch	<i>Ichthyosaura alpestris</i>	x					x		x	x			
Amphibien	Teichmolch	<i>Lissotriton vulgaris</i>	x	x				x		x				
Amphibien	Kammolch	<i>Triturus cristatus</i>								x				
Fische	Brachse	<i>Abramis brama</i>		x									x	x
Fische	Ukelei	<i>Alburnus alburnus</i>		x									x	x
Fische	Giebel	<i>Carassius gibelio</i>							x					x
Fische	Gründling	<i>Gobio gobio</i>												x
Fische	Bitterling	<i>Rhodeus amarus</i>		x									x	x
Fische	Rotauge	<i>Rutilus rutilus</i>		x	x								x	x
Fische	Rotfeder	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>		x								x	x	x
Fische	Döbel	<i>Squalius cephalus</i>		x										x
Fische	Schleie	<i>Tinca tinca</i>		x					x			x	x	x
Fische	Hecht	<i>Esox lucius</i>		x									x	x
Fische	Flussbarch	<i>Perca fluviatilis</i>		x	x								x	x
Käfer	Blauer Erlenblattkäfer	<i>Agelastica alni</i>								x				

Gruppe	Trivialname	Art	Landkreis Coburg				Landkreis Bayreuth						Landkreis Lichtenfels	
			Aichaer Teich	Callenberger Forst	Goldberg See	Muggendorfer Tongrube	Craimoos Weiher	Eremitage Untere Grotte	Höhle Ottenhof	LBV Lindenhof	RRB N Plech	Höhle Plech	Theisau 1	Theisau 2
Käfer	19.marienkäfer	<i>Anisosticta novemdecimpunctata</i>					x					x		
Käfer	4.marienkäfer	<i>Harmonia quadripunctata</i>		x										
Käfer	Schwimmkäfer	<i>Coelambus impressopunctatus</i>										x		
Käfer	Schwimmkäfer	<i>Graptodytes granularis</i>										x		
Käfer	Schwimmkäfer	<i>Hydroglyphus geminus</i>												
Käfer	Schwimmkäfer	<i>Hygrotus inaequalis</i>										x		
Käfer	Glatter Kugelschwimmer	<i>Hyphydrus ovatus</i>	x	x										
Käfer	Wassertreter	<i>Halplus flavicollis</i>											x	
Käfer	Wasserkäfer	<i>Anacaena globulus</i>										x		
Käfer	Mattfarbener Teichkäfer	<i>Helochaeres obscurus</i>										x	x	
Käfer	Sumpffieberkäfer	<i>Scirtes hemisphaericus</i>	x			x			x				x	
Käfer	Spaltaugenkäfer	<i>Trixagus obtusus</i>		x					x			x		x
Dipteren	Kleine Kohlflyge	<i>Delia radicum</i>					x					x		
Dipteren	Gnitze	<i>Bezzia annulipes</i>		x						x			x	x
Dipteren	Zuckmücke	<i>Ablabesmyia monilis</i>				x			x					
Dipteren	Zuckmücke	<i>Acricotopus lucens</i>										x		
Dipteren	Zuckmücke	<i>Chironomus luridus</i>										x		
Dipteren	Zuckmücke	<i>Chironomus muratensis</i>		x						x	x	x	x	x
Dipteren	Zuckmücke	<i>Chironomus curabilis</i>		x						x	x		x	x
Dipteren	Zuckmücke	<i>Chironomus acutiventris</i>		x									x	x
Dipteren	Zuckmücke	<i>Chironomus riparius</i>												
Dipteren	Zuckmücken	<i>Coryneura scutellata</i>							x					x
Dipteren	Zuckmücken	<i>Cricotopus sylvestris</i>	x	x						x			x	x
Dipteren	Zuckmücke	<i>Endochironomus albipennis</i>	x			x			x	x	x	x		x
Dipteren	Zuckmücken	<i>Glyptotendipes lobiferus</i>	x			x					x	x		x
Dipteren	Zuckmücke	<i>Micropsectra apposita</i>								x				

Gruppe	Trivialname	Art	Landkreis Coburg				Landkreis Bayreuth						Landkreis Lichtenfels	
			Aichaer Teich	Callenberger Forst	Goldberg See	Muggendorfer Tongrube	Craimoos Weiher	Eremitage Untere Grotte	Höhle Ottenhof	LBV Lindenhof	RRB N Plech	Höhle Plech	Theisau 1	Theisau 2
Dipteren	Zuckmücke	<i>Monopelopia tenuicalcar</i>	x	x		x							x	x
Dipteren	Zuckmücke	<i>Paratanytarsus grimmii</i>		x					x			x		x
Dipteren	Zuckmücke	<i>Polypedilum arundineti</i>					x					x		
Dipteren	Zuckmücke	<i>Polypedilum sordens</i>	x										x	
Dipteren	Zuckmücke	<i>Polypedilum tritum</i>	x									x	x	
Dipteren	Zuckmücke	<i>Synendotendipes lepidus</i>	x	x			x		x			x	x	x
Dipteren	Zuckmücke	<i>Tanytarsus lactescens</i>				x								x
Dipteren	Zuckmücke	<i>Tanytarsus mendax</i>		x										x
Dipteren	Stechmücke	<i>Aedes cinereus</i>										x		
Dipteren	Stechmücke	<i>Culex territans</i>	x	x		x							x	x
Dipteren	Langbeinfliege	<i>Rhaphium zetterstedti</i>										x		
Dipteren	Stelzmücke	<i>Molophilus griseus</i>										x		
Dipteren	Schmetterlingsfliege	<i>Pneumia palustris</i>	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x
Dipteren	Schmetterlingsfliege	<i>Psychoda albipennis</i>								x				
Dipteren	Trauermücke	<i>Bradysia vagans</i>										x		x
Dipteren	Waffenfliege	<i>Oplpdontha viridula</i>		x								x		
Dipteren	Langbauchschwebfliege	<i>Sphaerophoria scripta</i>									x			
Eintagsfliege	Eintagsfliege	<i>Cloeon dipterum</i>	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Eintagsfliege	Eintagsfliege	<i>Habroleptoides confusa</i>		x										
Wanzen	Wasserläufer	<i>Gerris odontogaster</i>		x										
Wanzen	Hüftwasserläufer	<i>Mesovelia furcata</i>				x							x	
Wanzen	Schwimmwanze	<i>Ilyocoris cimicoides</i>	x											
Wanzen	Miniwasserwanze	<i>Microvelia reticulata</i>	x			x								
Neuflügler	Gemeine Florfliege	<i>Chrysoperla carnea</i>						x						
Neuflügler	Staubläuse	<i>Graphopsocus cruiatus</i>	x									x		
Lepidoptera	Rüsselzünsler	<i>Cataclysta lemnata</i>	x	x										

Gruppe	Trivialname	Art	Landkreis Coburg				Landkreis Bayreuth						Landkreis Lichtenfels	
			Aichaer Teich	Callenberger Forst	Goldberg See	Muggendorfer Tongrube	Craimoos Weiher	Eremitage Untere Grotte	Höhle Ottenhof	LBV Lindenhof	RRB N Plech	Höhle Plech	Theisau 1	Theisau 2
Netzflügler	Schwammhafte	<i>Sisyra nigra</i>		x									x	
Libellen	Pechlibelle	<i>Ischnura sp.</i>		x							x	x		
Libellen	Große Heideilbelle	<i>Sympetrum striolatum</i>						x			x			
Köcherfliegen	Wassergeistchen	<i>Hydropsyche pellucidula</i>		x		x								
Köcherfliegen	Köcherfliege	<i>Polycentropus flavomaculatus</i>		x										
Spinnentier	Baldachinspinne	<i>Gnathonarium dentatum</i>											x	
Krebstiere	Bachflohkrebse	<i>Gammarus fossarum</i>		x										
Krebstiere	Höhlenflohkrebse	<i>Niphargus sp.</i>						x						
Krebstiere	Kiemenfußkrebse	<i>Bosmina longirostris</i>			x									x
Krebstiere	Kiemenfußkrebse	<i>Alonopsis elongata</i>				x								x
Krebstiere	Kiemenfußkrebse	<i>Chydorus sp.</i>				x								
Krebstiere	Kiemenfußkrebse	<i>Chydorus sphaericus</i>		x		x		x		x	x	x		
Krebstiere	Kiemenfußkrebse	<i>Graptoleberis testudinaria</i>								x			x	
Krebstiere	Wasserfloh	<i>Ceriodaphnia dubia</i>		x			x						x	
Krebstiere	Wasserfloh	<i>Ceriodaphnia megops</i>	x	x		x							x	x
Krebstiere	Wasserfloh	<i>Ceriodaphnia quadrangula</i>												x
Krebstiere	Wasserfloh	<i>Daphnia galeata</i>	x										x	x
Krebstiere	Wasserfloh	<i>Daphnia longispina</i>	x	x		x	x	x		x	x	x	x	x
Krebstiere	Großer Wasserfloh	<i>Daphnia magna</i>		x										
Krebstiere	Wasserfloh	<i>Scapholeberis mucronata</i>	x	x		x				x		x	x	x
Krebstiere	Wasserfloh	<i>Simocephalus exspinosus</i>		x									x	x
Krebstiere	Plattkopf-Wasserfloh	<i>Simocephalus vetulus</i>	x	x		x				x	x		x	x
Krebstiere	Ruderfußkrebse	<i>Acanthocyclops robustus</i>		x	x	x	x		x		x	x	x	
Krebstiere	Ruderfußkrebse	<i>Cyclopoida sp.</i>		x	x	x	x	x		x		x	x	x
Krebstiere	Ruderfußkrebse	<i>Cyclops strenuus</i>									x	x		
Krebstiere	Ruderfußkrebse	<i>Eucyclops cf. Serrulatus</i>		x		x				x	x	x	x	x

Gruppe	Trivialname	Art	Landkreis Coburg				Landkreis Bayreuth						Landkreis Lichtenfels	
			Aichaer Teich	Callenberger Forst	Goldberg See	Muggendorfer Tongrube	Craimoos Weiher	Eremitage Untere Grotte	Höhle Ottenhof	LBV Lindenhof	RRB N Plech	Höhle Plech	Theisau 1	Theisau 2
Krebstiere	Ruderfußkrebse	<i>Eucyclops</i> sp.								x				
Krebstiere	Ruderfußkrebse	<i>Macrocyclops distinctus</i>				x								
Krebstiere	Ruderfußkrebse	<i>Macrocyclops fuscus</i>				x		x						
Krebstiere	Ruderfußkrebse	<i>Mesocyclops leuckarti</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Krebstiere	Ruderfußkrebse	<i>Mesocyclops</i> sp.	x	x	x				x		x		x	x
Krebstiere	Ruderfußkrebse	<i>Thermocyclops</i> cf. <i>Crassus</i>		x									x	
Krebstiere	Ruderfußkrebse	<i>Thermocyclops dybowskii</i>		x		x	x	x		x	x	x	x	x
Krebstiere	Ruderfußkrebse	<i>Thermocyclops</i> sp.				x								
Krebstiere	Wasserassel	<i>Asellus aquaticus</i>		x									x	x
Krebstiere	Assel	<i>Pseudomesus brevicornis</i>					x				x	x		
Krebstiere	Mauerassel	<i>Oniscus asellus</i>		x										x
Krebstiere	Muschelkrebse	<i>Cypridopsis</i> sp.		x		x								
Krebstiere	Zebra-Muschelkrebse	<i>Cypridopsis vidua</i>	x	x		x		x					x	
Krebstiere	Muschelkrebse	<i>Fabaeformiscandona fragilis</i>	x										x	
Krebstiere	Muschelkrebse	<i>Notodromas monacha</i>	x	x	x	x					x		x	x
Mollusken	Veneroida	<i>Musculium lacustre</i>	x			x				x	x			x
Mollusken	Schnauzenschnecke	<i>Bithynia</i> sp.		x									x	x
Mollusken	Gemeine Tellerschnecke	<i>Planorbis planorbis</i>								x				
Nesseltier	Brauner Süßwasserpolymp	<i>Hydra oligactis</i>	x	x	x	x							x	x
Nesseltier	Süßwasserpolymp	<i>Hydra vulgaris</i>	x	x	x	x				x	x	x	x	x
Gürtelwürmer	Plattegel	<i>Helobdella stagnalis</i>	x	x								x	x	x
Gürtelwürmer	Rolleegel	<i>Erpobdella octoculata</i>	x					x		x			x	x
Gürtelwürmer	Grauwurm	<i>Aporrectodea caliginosa</i>									x			
Gürtelwürmer	Brauner Laubfresser	<i>Lumbricus castaneus</i>									x			
Gürtelwürmer	Roter Waldregenwurm	<i>Lumbricus rubellus</i>											x	
Gürtelwürmer	Schwarzwurm	<i>Lumbriculus variegatus</i>	x			x				x	x		x	

Gruppe	Trivialname	Art	Landkreis Coburg				Landkreis Bayreuth						Landkreis Lichtenfels	
			Aichaer Teich	Callenberger Forst	Goldberg See	Muggendorfer Tongrube	Craimoos Weiher	Eremitage Untere Grotte	Höhle Ottenhof	LBV Lindenhof	RRB N Plech	Höhle Plech	Theisau 1	Theisau 2
Gürtelwürmer	Teichschlange	<i>Stylaria lacustris</i>	x	x									x	x
Schwämme	Süßwasserschwamm	<i>Ephydatia fluviatilis</i>	x	x	x			x					x	x
Rädertierchen	Drachen-Rädertierchen	<i>Synchaeta pectinata</i>	x		x	x							x	
Rädertierchen	Monogonata	<i>Brachionus angularis</i>			x	x						x		
Rädertierchen	Monogonata	<i>Brachionus quadridentatus</i>		x				x	x					
Rädertierchen	Monogonata	<i>Keratella cochlearis</i>		x	x	x	x			x			x	
Rädertierchen	Monogonata	<i>Polyarthra dolichoptera</i>	x	x	x	x				x			x	x
Einzeller	Amöbe	<i>Cochliopodium kieliense</i>	x			x		x	x	x		x	x	x
Einzeller	Amöbe	<i>Cochliopodium</i> sp.	x			x			x	x		x	x	x
Pilz	Hefepilz	<i>Rhodotorula taiwanensis</i>		x	x	x								
Pilze	Scheinpilze	<i>Achyla americana</i>												
Pilze	Scheinpilze	<i>Aphanomyces laevis</i>		x		x				x	x			x
Pilze	Scheinpilze	<i>Phytophthora bilobang</i>		x										
Pilze	Scheinpilze	<i>Phytophthora cryptogea</i>		x										
Pilze	Scheinpilze	<i>Phytophthora</i> sp.	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x
Pilze	Scheinpilze	<i>Protoachlya paradoxa</i>									x			
Pilze	Scheinpilze	<i>Pythiales</i> sp.								x	x	x		x
Pilze	Scheinpilze	<i>Pythiales</i> sp.		x				x		x	x		x	x
Pilze	Scheinpilze	<i>Pythiales</i> sp.		x				x	x	x	x		x	x
Pilze	Scheinpilze	<i>Pythium adhaerens</i>		x					x	x		x		
Pilze	Scheinpilze	<i>Pythium periplocum</i>		x										x
Pilze	Scheinpilze	<i>Pythium phragmitis</i>		x										
Pilze	Scheinpilze	<i>Pythium torulosum</i>	x	x		x	x		x	x	x	x		x
Pilze	Scheinpilze	<i>Pythium utonaiense</i>		x					x	x	x		x	x
Pilze	Scheinpilze	<i>Pythium utonaiense</i>	x	x					x	x			x	x
Pilze	Scheinpilze	<i>Saprolegnia parasitica</i>	x	x		x		x	x	x	x	x		

			Landkreis Coburg				Landkreis Bayreuth						Landkreis Lichtenfels	
Gruppe	Trivialname	Art	Aichaer Teich	Callenberger Forst	Goldberg See	Muggendorfer Tongrube	Crainmoos Weiher	Eremitage Untere Grotte	Höhle Ottenhof	LBV Lindenhof	RRB N Plech	Höhle Plech	Theisau 1	Theisau 2
Eukaryota	Eukaryoten	<i>Cryptomonas lucens</i>		x		x			x	x	x	x		
Eukaryota	Eukaryoten	<i>Nanchloropsis limnetica</i>						x						x
Goldalgen	Goldmonaden	<i>Dinobryon divergens</i>	x			x								x
Kieselalgen	Kieselalgen	<i>Nitzschia palea</i>	x	x	x	x		x	x		x	x	x	x
Kieselalgen	Kieselalgen	<i>Skeletonema potamos</i>		x	x									x
Kieselalgen	Kieselalgen	<i>Thalassiosira pseudonana</i>			x	x						x		x

## DISKUSSION

Insgesamt können die Ergebnisse nicht als zufriedenstellend bewertet werden, wenn man die Studie als Nachweis für die Zielarten interpretiert. Als Pilotstudie geben die Ergebnisse genügend Aufschlüsse um die Methoden im Feld weiter zu entwickeln. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Primer vorwiegend Wirbellose Arten identifiziert haben. Damit wird deutlich, dass „Multiprimer“, also Primer die sowohl bei Wirbellosen wie auch bei Wirbeltieren gut funktionieren, noch nicht so weit entwickelt sind, dass sie wirklich zufrieden stellende Ergebnisse erbringen. Dies zeigt vor allem der Vergleich zwischen den traditionellen Methoden und der eDNA, wo erstere die besseren Ergebnisse, auch wenn deutlich Zeit aufwendiger, geliefert haben. Auf der anderen Seite zeigt sich aber durch Nachweise von terrestrischen Arten wie Rothirsch oder Mauersegler, dass die Primer in der Lage sind feinste DNA Spuren zu identifizieren.

Insgesamt konnten 160 Arten nachgewiesen werden. Dies sind vor allem Wirbellose die mit traditionellen Methoden nur sehr aufwendig über Fang und Detailbestimmung kartiert werden. Hier zeigen sich die deutlichen Vorteile der Methode, gerade mit Hinblick auf kleine vollaquatische Arten. Gute Beispiele hierfür sind die nur schwer nachweisbare Häubchenmuschel oder der Höhlenflohkrebs. Mit Hilfe der eDNA bekommt man also in relativ kurzer Zeit ohne großen Aufwand ein sehr gutes Bild über das Artenspektrum der aquatischen Wirbellosen. Mit etwas mehr Aufwand, zum Beispiel getrennten Läufen mit jeweils unterschiedlichen Primern (Wirbeltierprimer vs. Wirbellosenprimer) einen sehr guten Überblick über das gesamte Artenspektrum.

Was sich in der Studie gezeigt hat ist auch, dass eine standardisierte Methode (3 Proben à 0.5l) nicht bei allen Gewässern zu denselben Ergebnissen kommt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass je kleiner und flacher ein Gewässer ist, desto mehr Arten identifiziert werden. Das zeigen zum Beispiel die Unterschiede zwischen der Sickerfläche bei Plech (57) gegenüber den beiden größeren Seen Craimmoosweiher (17) und Goldberg See (20). Ausreißer ist der mittelgroße Weiher im Callenberger Forst mit dem Rekordergebnis von 83 nachgewiesenen Arten. Entsprechend dieser Ergebnisse müsste man, wenn Studien entsprechend große Gewässer umfassen, die standardisierte Methode an den großen Gewässern ausrichten und entsprechend viele Proben pro Gewässer entnehmen.

Für Folgestudien bietet sich daher an:

- [A] Entweder im Studiendesign klar nur nach Wirbeltieren oder Wirbellosen suchen oder getrennte Primer verwenden.
- [B] gerade bei großen Gewässern sollten möglichst viele Proben an unterschiedlichen Orten und nach Möglichkeit gewässertiefen entnommen werden.
- [C] Studien wie diese stoßen schnell an ihre Grenze, wenn die entsprechenden Datenmengen noch nicht über die nötige Präsenz von Arten verfügen.
- [D] eDNA Studien lohnen sich vor allem für den Nachweis von komplexen Artengruppen innerhalb der Wirbellosen (Zuckmücken, Eintagsfliegen, etc.), bzw. nur schwer nachweisbaren Arten.

[E] eDNA Studien sind auch im Bereich der Wirbeltiere deutlich weniger aufwändig als traditionelle Methoden. Allerdings macht es derzeit noch keinen Sinn Wirbeltiere über Multiprimer nachzuweisen, sondern sollte hierfür gezielte Primer verwenden.

Obwohl die Ergebnisse also insgesamt nicht zufriedenstellend sind, ist die Studie dennoch ein Erfolg und ein wichtiger Schritt in die Richtung die Methode von der Theorie in die Praxis zu übersetzen.

## DANKSAGUNG

Wir danken den folgenden Personen für den Bau der Kammolch-Reusen und die Mitarbeit bei der Probennahme: Stefanie Braun, Lisa Jahnke, Jessica Jacobitz, Andrea Völkel und Eva Zahn. Folgenden Personen danken wir für die Mitarbeit bei den Laboruntersuchungen: Katharina Kurzrock, Jana Thormann, Laura von der Mark (alle ZFMK) und Vera Zizka, Vasco Elbrecht, Jan Macher, Bianca Peinert, Cristina Hartmann-Fatu (alle Universität Duisburg Essen AG Leese). Vor allem danken wir Florian Leese (Universität Duisburg) für die gute Beratung zur Probennahme und Laborarbeit. Alexander Ulmer und Frank Reißweber (LBV Coburg) danken wir für die regionale Beratung über lohnenswerte Gewässer. Wir danken der Regierung von Oberfranken für die Genehmigung zur Probennahme. Letztendlich gebührt unser Dank vor allem dem Bayerischen Naturschutzfond und der Glücksspirale die dieses Projekt durch ihre Finanzierung erst möglich gemacht haben.

## LITERATUR

- BIGGS, J., EWALD, N., VALENTINI, A., GABORIAUD, C., DEJEAN, T., GRIFFITHS, R.A., FOSTER, J., WILKINSON, J.W., ARNELL, A., BROTHERTON, P., WILLIAMS, P., & F. DUNN (2015): Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). – Biological Conservation 183: 19–28.
- BOHMANN, K., A. EVANS, M. T. P. GILBERT, G. R. CARVALHO, S. CREER, M. KNAPP, D. Y. YU & M. DE BRUYN (2014): Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring – Trends in Ecology and Evolution 29: 358–367.
- BRINKMAN, N. E., R. A. HAUGLAND, L. J. WYMER, M. BYAPPANAHALLI, R. L. WHITMAN & S. J. VESPER (2003): Evaluation of a rapid, quantitative real-time PCR method for enumeration of pathogenic *Candida* cells in water. – Applied and Environmental Microbiology 69: 1775–1782.
- DEINER, K. & F. ALTERMATT (2014): Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. – PLoS ONE 6: e88786, doi: 10.1371/journal.pone.0088786.
- DEJEAN, T., A. VALENTINI, C. MIQUEL, P. TABERLET, E. BELLEMAIN & C. MIAUD (2012): Improved detection of an invasive alien species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. – Journal of Applied Ecology 49: 953–959.
- DODD, C.K. (HRSG.) (2010): Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques. – University Press, Oxford.

- ELBRECHT, V. & F. LEESE (2015): Can DNA-based ecosystem assessments quantify species abundance? Testing primer bias and biomass - sequence relationships with an innovative metabarcoding protocol. – PLOS ONE 10: e0130324
- ELBRECHT, V. & F. LEESE (2016): Validation and development of freshwater invertebrate metabarcoding COI primers for Environmental Impact Assessment. No. e2044v3. PeerJ Preprints
- ELBRECHT, V., TABERLET, P., DEJEAN, T., VALENTINI, A., USSEGLIO-POLATERA, P., BEISEL, J., COISSAC, E., BOYER, F. & F. LEESE (2016a): Testing the potential of a ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects. – PeerJ 4: e1966.
- ELBRECHT, V., BEERMANN, A.J., GOESSLER, G., NEUMANN, J., TOLLRIAN, R., WAGNER, R., WLECKLIK, A., PIGGOTT, J.J., MATTHAEI, C.D. & F. LEESE (2016b): Multiple-stressor effects on stream invertebrates: a mesocosm experiment manipulating nutrients, fine sediment and flow velocity. – Freshwater Biology 61: 362–375.
- FICETOLA, G. F., C. MIAUD, F. POMPANON & P. TABERLET (2008): Species detection using environmental DNA from water samples. – Biology Letters 4: 423–425.
- JERDE, C. L., A. R. MAHON, W. L. CHADDERTON & D. M. LODGE (2014): „Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. – Conservation Letters 4: 150–157.
- KELLY, R. P., J. A. PORT, K. M. YAMAHARA, R. G. MARTONE, N. LOWELL, P. F. THOMSEN, M. E. MACH, M. BENNETT, E. PRAHLER, M. R. CALDWELL & L. B. CROWDER (2014): Harnessing DNA to improve environmental management. – Science 344: 1455–1456.
- KLEIN, H.P., PLEINES, S., THORMANN, J., RULIK, B. & T. TÖPFER (2015 [2016]): Erste Brut des Zwergsägers *Mergellus albellus* in Deutschland im NSG Krickenbecker See, Kreis Viersen. – Charadrius 51: 57–62.
- LEESE, F. et al. (...) DNAqua-Net consortium (2016): DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. – Research Ideas & Outcomes 2: e11321.
- MACHER, J.-N., SALIS, R. K., BLAKEMORE, K., TOLLRIAN, R., MATTHAEI, C. & F. LEESE (2015): Multiple-stressor effects on stream invertebrates: DNA barcoding reveals contrasting responses of cryptic mayfly species. – Ecological Indicators 61(2): 159–169.
- MACHER, J.-N., ZIZKA, V., WEIGAND, A.M. & F. LEESE (2017): A simple centrifugation protocol leads to a 55-fold mitochondrial DNA enrichment and paves the way for future mitogenomic research. – bioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/106583>
- MARUYAMA, A., K. NAKAMURA, H. YAMANAKA, M. KONDOH & T. MINAMOTO (2014): The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. – PLoS ONE 9: e114639. doi:10.1371/journal.pone.0114639.
- PAULS, S., ALP, M., BALINT, M., BERNABO, P., CIAMPOR, F., CIAMPOROVA-ZATOVICOVA, Z., FINN, D., KOHOUT, J., LEESE, F., LENCIONI, V., PAZ-VINAS, I. & M. MONAGHAN (2014): Integrating molecular tools into freshwater ecology: developments and opportunities. – Freshwater Biology 59: 1559–1576.
- PILLIOD, D. S., GOLDBERG, C.S., ARKLE, R.S. & L. P. WAITS (2013): Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. – Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 70: 1123–1130.

- REES, H. C., B. C. MADDISON, D. J. MIDDLEDITCH, J. R. M. PATMORE & K. C. GOUGH (2014): The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. – *Journal of Applied Ecology* 51: 1450–1459.
- SCHMIDT, R.S. & S. URSENBACHER (2015): Umwelt-DNA als neue Methode zum Artnachweis in Gewässern. – *Zeitschrift für Feldherpetologie* 22: 1–10.
- THOMSEN, P. F., J. KIELGAST, L. L. IVERSEN, C. WIUF, M. RASMUSSEN, M. T. P. GILBERT, L. ORLANDO & E. WILLERSLEV (2012a): Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. – *Molecular Ecology* 21: 2565–2573.
- THOMSEN, P. F., J. KIELGAST, L. L. IVERSEN, P. R. MØLLER, M. RASMUSSEN & E. WILLERSLEV (2012b) Detection of a diverse marine fish using environmental DNA from seawater samples. – *PLoS ONE* 7:e41732. doi: 10.1371/journal.pone.0041732.
- TURNER, C. R., K. L. UY & R. C. EVERHART (2015): Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. – *Biological Conservation* 183: 93–102, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.017.

## IMPRESSUM



<b>PROJEKTTITEL:</b>	Pilotstudie zum Nachweis des Kammmolches und anderer aquatischer oder semi-aquatischer Arten („multispecies approach“) in Oberfranken anhand von environmental DNA (eDNA).
<b>PROJEKTNUMMER:</b>	13/2016
<b>AUFTRAGGEBER:</b>	Bayerischer Naturschutzfonds
<b>AUFTRAGNEHMER:</b>	Landesbund für Vogelschutz in Bayern e.V.- Bezirksgeschäftsstelle (BGS) Oberfranken Karolinenreuther Str 58.   D95448 Bayreuth Tel. 0921   759420 <a href="mailto:oberfranken@lbv.de">oberfranken@lbv.de</a>
<b>KOOPERATIONSPARTNER:</b>	Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig (ZFMK), Bonn   German Barcoding of Life (GBOL), Bonn
<b>PROJEKTKOORDINATOREN:</b>	Dr. Philipp Wagner, Dr. Matthias Geiger
<b>MITARBEITENDE:</b>	Stefanie Braun (BGS Oberfranken   Kartierung, Probennahme), Dr. Matthias Geiger (ZFMK, GBOL   Probennahme, Analyse); Jessica Jacobitz (BGS Oberfranken   Probennahme); Dr. Philipp Wagner (BGS Oberfranken   Probennahme, Studiendesign, Koordination).
<b>AUTOR:</b>	Dr. Philipp Wagner, Dr. Matthias Geiger
<b>TITELBILD:</b>	Darina Schmidt
<b>BILDAUTOREN:</b>	Dr. Philipp Wagner, Dr. Matthias Geiger
<b>GEFÖRDERT DURCH:</b>	Bayerischer Naturschutzfonds, die Glücksspirale und den LBV