



## **Projektbericht**

Genetische Verfahren im biologischen Monitoring – Vergleich klassisches Bestimmungsverfahren vs. genetische Verfahren für die Bewertung von Makrozoobenthos in Fließgewässern

**Monitoring Biologie – Anpassung an neue Herausforderungen**

Projektlaufzeit: 09/2018 - 12/2022

Kristin Stolberg & Katharina Kätzel

UmweltProjekt

## Impressum

### Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU)  
Bürgermeister-Ulrich-Straße 160  
86179 Augsburg  
Tel.: 0821 9071-0  
Fax: 0821 9071-5556  
E-Mail: [poststelle@lfu.bayern.de](mailto:poststelle@lfu.bayern.de)  
Internet: [www.lfu.bayern.de/](http://www.lfu.bayern.de/)

### Im Falle der Bearbeitung am LfU:

LfU, Referat Nr. 83, Kristin Stolberg und Katharina Kätzel

### Stand:

Januar 2021

Diese Publikation wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlberatern oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Publikation nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Publikation zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden. Bei publizistischer Verwertung – auch von Teilen – wird um Angabe der Quelle und Übersendung eines Belegexemplars gebeten.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die Broschüre wird kostenlos abgegeben, jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt.

Diese Broschüre wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden.

Für die Inhalte fremder Internetangebote sind wir nicht verantwortlich.



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung. Unter Tel. 089 122220 oder per E-Mail unter [direkt@bayern.de](mailto:direkt@bayern.de) erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>Kurzfassung</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1. Genetische Verfahren – Potential für das biologische Monitoring?	9
<b>2. Methode</b>	<b>11</b>
2.1. Messstellenauswahl	11
2.2. Makrozoobenthos Probenahme und Probenkonservierung	12
2.3. Metabarcoding	14
2.3.1. Probenprozessierung und Sequenzierung	14
2.3.2. Bioinformatische Auswertung	16
2.4. Datenaufbereitung	16
2.4.1. DNA-Datensatz	16
2.4.2. Morphologisch bestimmte Taxa	17
2.5. Berechnungen mit der Bewertungssoftware Asterics 4.04	17
2.6. Statistische Auswertung	19
<b>3. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>20</b>
3.1. Vergleich der Taxalisten	20
3.2. Vergleich der Bewertungsergebnisse	23
<b>4. Fazit und Ausblick</b>	<b>30</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>32</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>
BOLD	Barcode Of Life Database
bp	Basenpaare
BQK	Biologische Qualitätskomponente
BTL	Bundestaxaliste
DFI	Deutscher Fauna Index
EPT	Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera
FG	Fließgewässer
MZB	Makrozoobenthos
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
WWA	Wasserwirtschaftsamt

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht des methodischen Vorgehens. Makrozoobenthos-Proben aus dem biologischen Monitoring gemäß WRRL wurden morphologisch bestimmt und nachfolgend mittels Metabarcoding genetisch analysiert. Die aus beiden Bewertungsverfahren resultierenden Taxalisten und Bewertungsergebnisse wurden anschließend miteinander verglichen.	11
Abbildung 2: Übersicht der beprobten Fließgewässer-Typen und der jeweiligen Anzahl der Makrozoobenthos Proben.	12
Abbildung 3: Prinzip der Illumina Sequenzierung (Yuan Lu et al. 2016).	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Berechnungsverfahren und Ergebnisgenerierung der morphologisch bestimmten und genetisch erstellten Taxalisten mittels der Bewertungssoftware Asterics (Version 4.04).	18
Abbildung 5: Übersicht der ausschließlich morphologisch (grün) und genetisch (blau) sowie gemeinsam identifizierten taxonomischen Level auf Ordnungs-, Familien-, Gattungs- und Artniveau.	21
Abbildung 6: Anteile der ausschließlich und gemeinsam morphologisch (grün) und genetisch (blau) identifizierten Taxa der Stämme Arthropoda, Mollusca und Annelida.	22
Abbildung 7: Anteile der ausschließlich morphologisch (grün) und genetisch (blau) sowie gemeinsam identifizierten Taxa der Insecta Ordnungen Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, Diptera und Coleoptera.	23
Abbildung 8: Anteile der gemeinsam und ausschließlich morphologisch bestimmten (grün) und genetisch detektierten (blau) Taxa mit DV-Nr. Zuordnung.	24

- Abbildung 9: Anteile der gemeinsam und ausschließlich morphologisch bestimmten (grün) und genetisch detektierten (blau) Taxa mit DV-Nr. Zuordnung und die jeweiligen Anzahlen der Taxa mit Saprobie-Index und DFI Einstufung. 24
- Abbildung 10: Anteile der gesicherten und ungesicherten Ergebnisse der berechneten Zustandsklassen der Biologischen Qualitätskomponente Makrozoobenthos und den MZB Teilmodulen „Allgemeine Degradation“ und „Saprobie“ für die jeweiligen Berechnungsverfahren (MA: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit morphologisch bestimmten Taxalisten mit Abundanzwerten, M01: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit morphologisch bestimmten Taxalisten mit An-/Abwesenheitsdaten, G: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit genetisch erstellten Taxalisten mit An-/Abwesenheitsdaten). 25
- Abbildung 11: Streudiagramme (unterhalb der Diagonale) und Spearman-Korrelationskoeffizienten (oberhalb der Diagonale) für jede Verfahrenskombination der berechneten Saprobie Indizes, allgemeine Degradation Scores und Deutsche Fauna Indizes der morphologisch und genetisch ermittelten Makrozoobenthos Befunde. Auf der Diagonale sind die jeweiligen Berechnungsverfahren dargestellt (MA: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit morphologisch bestimmten Taxalisten mit Abundanzwerten, M01: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit morphologisch bestimmten Taxalisten mit An-/Abwesenheitsdaten, G: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit genetisch erstellten Taxalisten mit An-/Abwesenheitsdaten) Statistisch hoch signifikante Spearman-Korrelationen ( $p < 2,2e-16$ ) sind durch \*\*\* gekennzeichnet. 26
- Abbildung 12: Verteilung der Bewertungsergebnisse (Zustandsklassen 1: sehr gut bis 5: schlecht) der unterschiedlichen Verfahren für die Gesamtbewertung der biologischen Qualitätskomponente Makrozoobenthos (MZB) und für die MZB Teilmodule "Allgemeine Degradation" und "Saprobie" (MA: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit morphologisch bestimmten Taxalisten mit Abundanzwerten, M01: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit morphologisch bestimmten Taxalisten mit An-/Abwesenheitsdaten, G: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit genetisch erstellten Taxalisten mit An-/Abwesenheitsdaten). 26
- Abbildung 13: Darstellung der Zustandsklassenänderungen, die sich durch die Transformation der Abundanzwerte in 0/1-Matrizen bei den Berechnungen basierend auf den morphologisch bestimmten Befunden für die Zustandsklassen der BQK Makrozoobenthos und für die Teilmodule „Allgemeine Degradation“ und „Saprobie“ ergeben. In den Säulen sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Ergebnisse dargestellt. 27
- Abbildung 14: Darstellung der Zustandsklassenänderungen, die sich durch Berechnungen basierend auf genetisch ermittelten statt morphologisch bestimmten Befunden für die Zustandsklassen der BQK Makrozoobenthos und für die Teilmodule „Allgemeine Degradation“ und „Saprobie“ ergeben. Die Berechnungen wurden mit An-/Abwesenheitsdaten (0/1 Matrix) durchgeführt. In den Säulen sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Ergebnisse dargestellt. 28
- Abbildung 15: Darstellung der Zustandsklassenänderungen, die sich durch den Ersatz des klassischen Bewertungsverfahrens (morphologisch bestimmte Befunde mit Abundanzen) durch genetische Verfahren (genetisch erstellte Taxaliste mit An-/Abwesenheitsdaten) für die BQK Makrozoobenthos und die Teilmodule „Allgemeine Degradation“ und „Saprobie“ ergeben. In den Säulen sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Ergebnisse dargestellt. 29

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1: Auflistung der Makrozoobenthos Proben für die genetischen Analysen. Insgesamt wurden 60 Makrozoobenthos Proben aus 13 unterschiedlichen Fließgewässertypen für genetische Analysen von der bayerischen Wasserwirtschaft (15 Wasserwirtschaftsämtern (WWA)) zur Verfügung gestellt.	13
---	----

## Kurzfassung

Die Anwendung von genetischen Verfahren zur Identifikation von Arten hat in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen. Durch die Entwicklung der Hochdurchsatz-Sequenzierung (Next Generation Sequencing) ist mittlerweile eine schnelle Analyse von Umweltproben möglich. Diese Fortschritte genetischer Verfahren könnten auch für die Bewertung von Oberflächengewässern nach Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) eine große Bereicherung darstellen, da sich genetischen Proben schnell und standardisiert analysieren lassen. Es bestehen allerdings noch Unsicherheiten, ob die Ergebnisse fachlich vergleichbar und zur Bewertung der Gewässer geeignet sind. Vor diesem Hintergrund wird in dieser Studie untersucht, ob genetische Verfahren das klassische Bewertungsverfahren gemäß WRRL in Hinblick auf die Makrozoobenthos-Bewertung optimieren bzw. ergänzen oder diese langfristig eventuell sogar ersetzen können. Im Rahmen des Projektes „Monitoring Biologie – Anpassung an neue Herausforderungen“ wurden dafür 60 von der bayerischen Wasserwirtschaft erhobene und morphologisch bestimmte Makrozoobenthos-Proben aus verschiedenen Fließgewässertypen mittels Metabarcoding analysiert. Die morphologisch bestimmten und genetisch erstellten Befunde sowie die jeweils resultierenden Bewertungsergebnisse der Module „Saprobie“ und „Allgemeine Degradation“ der biologischen Qualitätskomponente Makrozoobenthos wurden anschließend verglichen. In einem Vergleich der Taxalisten kann gezeigt werden, dass der Anteil an gemeinsam identifizierten Taxa besonders auf Gattungs- und Familienniveau sehr hoch ist (Art: 61 %, Gattung: 69 %, Familie 78 %). Von den morphologisch bestimmten Arten war die Wiederfindungsquote in den genetischen Befunden bei den Gliederfüßern (Arthropoda) am höchsten (70%), gefolgt von den Ringelwürmern (Annelida) (41 %). Bei den Weichtieren (Mollusca) wurde die geringste Übereinstimmung (24 %) zwischen beiden Verfahren erzielt. Plattwürmer (Plathelminthes) konnten mit dem genetischen Verfahren nicht abgebildet werden. Die Übereinstimmung der morphologisch bestimmten Arten mit den genetisch detektierten Taxa ist bei der Insecta-Ordnung Trichoptera mit 77 % am höchsten und bei Ephemeroptera mit 60 % am geringsten. Die genetische Artenvielfalt ist bei den Diptera (insbesondere bei morphologisch schwer zu bestimmenden Arten aus der Familie der *Chironomidae*) im Vergleich zur morphologischen Bestimmung deutlich am größten. Einige morphologisch bestimmte Taxa der Trichoptera (insbesondere der Familien *Leptoceridae* und *Limnephilidae*) und der Ephemeroptera (insbesondere der Familie *Heptageniidae*) wurden genetisch nicht nachgewiesen. Die Qualität der Artidentifizierung und Wiederfindung im genetischen Verfahren ist u.a. von dem gewählten Markergen, der Primer-Effizienz, aber auch von den hinterlegten Referenzen der verfügbaren Datenbanken abhängig und wird von Informationslücken und Fehlerquellen beeinträchtigt. So konnten zum Zeitpunkt dieser Studie wenige Arten nicht eindeutig zugeordnet werden, da der Artnamen in der Referenzdatenbank nicht hinterlegt war. Abgesehen von möglichen Fehlerquellen bei der morphologischen Bestimmung, besteht bei genetisch sehr ähnlichen Arten zudem eine hohe Verwechslungsgefahr bei der automatisierten taxonomischen Zuordnung. Durch genetische Verfahren können bislang keine Abundanzen (Anzahl der Individuen einer Art) der Taxa in der Probe ermittelt werden, so dass lediglich angegeben werden kann, ob ein bestimmtes Taxon in der Probe vorhanden ist. Folglich führten die Berechnungen basierend auf genetisch erstellten Taxalisten mit An-/Abwesenheitsdaten zu einem erheblich höheren Anteil an ungesicherten Ergebnissen, da die Sicherheitskriterien des klassischen Bewertungsverfahrens auf Abundanzsummen basieren. Die berechneten Metrics korrelierten statistisch hoch signifikant zwischen den Verfahren, wobei das Modul „Saprobie“ höhere Korrelationen als das Modul „Allgemeine Degradation“ aufwies. Insgesamt erzielten die genetischen Verfahren mehrheitlich mit dem klassischen Verfahren vergleichbare Bewertungsergebnisse für die biologische Qualitätskomponente Makrozoobenthos (63 %) und für die Teilmodule „Allgemeine Degradation“ (58 %) und „Saprobie“ (82 %). Änderungen in den Zustandsklassen beliefen sich mehrheitlich im Rahmen einer Zustandsklasse und nur in wenigen Fällen ergaben sich Abweichungen von zwei Zustandsklassen. Durch genetische Verfahren wurden für die biologische Qualitätskomponente Makrozoobenthos insgesamt geringfügig schlechtere (20 %) als bessere (17 %) Zustandsklassen und ein geringerer Anteil an gut und besseren Bewertungsergebnissen erzielt. In

den Teilmodulen „Allgemeine Degradation“ und besonders bei der „Saprobie“ kam es durch die genetischen Verfahren im Schnitt zu einer Verbesserung der Bewertungsergebnisse im Vergleich zum klassischen Verfahren. Diskrepanzen zwischen den Bewertungsergebnissen basieren unter anderem darauf, dass wichtige Indikatorarten der Strudelwürmer (Plathelminthes) nicht und einige wichtige Indikatorarten der Weichtiere (Mollusca) nur eingeschränkt genetisch nachgewiesen werden konnten. Die wesentlich höher genetisch detektierte Artauflösung für einige Artengruppen, die hoch signifikanten Korrelationen und die mehrheitliche Übereinstimmung der Bewertungsergebnisse zeigen das Potential genetischer Verfahren auf, das klassische Verfahren zu komplettieren bzw. zu ergänzen. Die deutlichen Abweichungen in den Taxalisten zeigen jedoch, dass genetische Verfahren das klassische Verfahren gegenwärtig nicht ersetzen können. Dies basiert auf einigen Schwächen im genetischen Verfahren, die zukünftig adressiert werden sollten, um die genetische Wiederfindung der Taxa in den Proben weiter zu verbessern. Ein für den Erfolg der Artwiederfindung essentieller und kritischer Arbeitsschritt ist die DNA-Konservierung. Hier besteht die Notwendigkeit einer standardisierten und hinsichtlich DNA-Konservierung optimierten Anleitung für die Probenahme und Handhabung. Um möglichst das gesamte Taxaspektrum der Probe genetisch abbilden zu können, muss die Wahl der entsprechenden Markergene und der Primer an die zu detektierenden Organismengruppen spezifisch angepasst werden. Die Integration von räumlichen Verbreitungsmustern der Taxa in die automatisierte taxonomische Zuordnung könnte die Genauigkeit der taxonomischen Zuordnung von genetisch sehr ähnlichen Taxa erhöhen. Eine hohe Qualität der genetischen Befunde sollte durch eine fortlaufende Optimierung und Aktualisierung der genetischen Referenzdatenbanken sichergestellt werden. Die durch genetische Verfahren erzielte höhere Artauflösung für spezifische Taxagruppen steigert zwar den Informationsgewinn, für die Gewässerbewertung ist diese höhere Artauflösung allerdings nur im Zusammenhang mit entsprechenden autökologischen Informationen gewinnbringend. Daher sind weitere Forschungsarbeiten hinsichtlich autökologischer Informationen und möglicher Indikatorpotentiale der genetisch detektierten Taxa, sowie die entsprechende Anpassung der Taxaliste der Gewässerorganismen Deutschlands und der operationellen Taxaliste notwendig. Für die Integration genetischer Verfahren in das bestehende Bewertungsverfahren bedarf es einigen Anpassungen oder der Entwicklung neuer Bewertungsansätze (z.B. Ableitung neuer Metrics und Indizes, Strategie zum Umgang mit fehlenden Abundanzen).



---

# 1. Einleitung

---

## 1.1. Genetische Verfahren im biologischen Monitoring

Die Artenvielfalt und Artzusammensetzung spielt für die Bewertung der Qualität von Fließgewässern eine zentrale Rolle. Im Bewertungsverfahren nach Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) wird die Bestimmungsarbeit klassisch durch die Erkennung artspezifischer morphologischer Merkmale vorgenommen. Morphologische Bestimmungsarbeiten erfordern eine intensive Einarbeitung und viel Erfahrung und können bei schwer bestimmbareren Arten sehr zeitaufwendig sein. Nicht immer ist für alle Entwicklungsstadien eine eindeutige Artbestimmung anhand morphologischer Merkmale möglich. Auch Beschädigungen von Taxon-spezifischen Merkmalen können die morphologische Bestimmung erschweren (Darling & Mahon 2011). Bei generell schwer differenzierbaren Merkmalen gemäß Bestimmungsschlüssel kann es zu Bestimmungsfehlern kommen und je nach Kenntnisstand werden unterschiedliche Bestimmungstiefen erreicht. Durch diese Unsicherheiten könnten Informationen verloren gehen, falls zugunsten der Sicherheit lediglich auf das nächst höhere taxonomische Niveau bestimmt wird (Haase et al. 2010, Sweeny et al. 2011). Diese Grenzen der morphologischen Bestimmung und der damit einhergehende Informationsverlust können direkte Konsequenzen für die Bewertung der Fließgewässer haben, wenn sich hinter den nicht bestimmbareren taxonomischen Leveln relevante Indikatorpotentiale hinsichtlich ökologischer Präferenzen oder Stresstoleranzen verbergen (Jones 2008, Haase et al. 2010, Stein et al. 2014, Macher et al. 2016, Pawlowski et al. 2018).

Genetische Verfahren ermöglichen es, Taxa anhand von Markergenen molekularbiologisch zu bestimmen. Das gängige Markergen für Makrozoobenthos ist das mitochondriale Genfragment der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase, auch CO1 Markergen genannt (Greyer et al. 2018, Hebert 2003). Im letzten Jahrzehnt haben sich die genetischen Verfahren rasant weiterentwickelt. Mit der äußerst zeit- und kostenaufwändigen Sequenziermethode nach Sanger (Sanger et al. 1977) konnten zunächst einzelne Arten identifiziert werden (Singlebarcoding). Durch Hochdurchsatz-Sequenzierung (Next Generation Sequencing) ist es zwischenzeitlich möglich, Arten aus Mischproben (Metabarcoding) zu identifizieren, wobei Millionen von DNA-Fragmente aus mehreren Proben während eines Sequenziervorgangs parallel sequenziert werden können (Hajibabaei et al. 2011, Hajibabaei 2019, Taberlet et al. 2012, Elbrecht & Leese 2015). Auch für die sogenannte Umwelt- oder environmental DNA (eDNA) wird diese Hochdurchsatz-Sequenzierung angewendet. Dieses Verfahren basiert auf der Analyse von DNA-Molekülen in einer Wasserprobe und hat sich besonders beim Nachweis von Fischen bewährt (Taberlet 2012, Valentini et al. 2016; Shaw et al. 2016, Stoeckle et al. 2017). Genetische Verfahren haben sich bereits in unterschiedlichsten Fachbereichen als erfolgreich erwiesen. So können durch genetische Nachweisverfahren beispielsweise fäkale Belastungen und deren Ursprung in Gewässern durch die Detektion von 16S rDNA-Markern von Fäkalbakterien ermitteln werden (LfU Ref. 73). Auch für die Untersuchung der Herkunft und Ausbreitung von Neobiota, wie z.B. des Höckerflohkrebses (*Dikerogammarus villosus*), werden genetische Verfahren angewendet (Bodenseestudie, LfU Ref. 73). Im biologischen Monitoring nach WRRL sind unterstützende genetische Analysen bisher nur bei sehr schwierig bestimmbareren oder schwer trennbaren Einzeltaxa zum Zwecke der biologischen Qualitätssicherung vorgesehen (HtGewA 2018, Kapitel 4.3 Genetische Analysen). Genetische Verfahren könnten im biologischen Monitoring aber auch für die taxonomische Bestimmung von gesamten biologischen Proben eingesetzt werden um diese objektiv, schnell, präzise und standardisiert zu analysieren (Greyer et al. 2018, Elbrecht & Steinke 2019). Ein großer Vorteil von biomolekularen Bestimmungsmethoden liegt in der Unabhängigkeit von Entwicklungsstadien, Geschlecht, Kenntnisstand und unklaren morphologischen Merkmalen, was zu einem enormen Informationsgewinn beitragen kann (Vivien et al. 2015, Beermann et al. 2018). Folglich könnte die Integration von genetischen Verfahren in das klassische biologische Bewertungsverfahren zu einer verbesserten taxonomischen Auflösung und zu einem robusteren Bewertungsergebnis führen.

Inzwischen gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Studien und Projekten die sich mit der Frage der Praxistauglichkeit genetischer Verfahren zum Zwecke des biologischen Monitorings im behördlichen Kontext befassen. Ein Projekt, an dem auch das LfU beteiligt ist, ist z.B. das Eco-Alps Water Projekt (Projektlaufzeit April 2018 bis April 2021). In diesem Projekt wird die Anwendung von Metabarcoding für die ökologische Bewertung der biologischen Qualitätskomponenten Phytoplankton, Phytobenthos, Fische sowie (Cyano)Bakterien und eukaryotischer Mikroben in alpinen Seen und Flüssen getestet ([www.lfu.bayern.de/wasser/eco\\_alpswater/index.htm](http://www.lfu.bayern.de/wasser/eco_alpswater/index.htm)). Auch im Rahmen der Joint Danube Survey (JDS 4 2019) wurden genetische Untersuchungen zu Monitoringzwecken der Oberflächengewässerqualität der Donau durchgeführt ([www.danubesurvey.org/jds4/](http://www.danubesurvey.org/jds4/)).

In diesem Projekt soll untersucht werden, inwieweit sich genetische Verfahren von dem klassischen Bewertungsverfahren für Fließgewässer nach WRRL hinsichtlich der biologischen Qualitätskomponente Makrozoobenthos unterscheiden und ob diese das Potential haben, das klassische Bestimmungsverfahren zu optimieren oder sogar zu ersetzen. Dafür wurden erstmalig bayerische Makrozoobenthos Monitoringdaten genetisch mittels Metabarcoding von der Universität Duisburg-Essen analysiert und ein Vergleich der genetisch erstellten und klassisch morphologisch bestimmten Taxalisten und den daraus resultierenden Bewertungsergebnissen erstellt.

## 2. Methode

Für diese Studie wurden insgesamt 60 Makrozoobenthos Proben aus dem Monitoringjahr 2019 morphologisch bestimmt und anschließend mittels Metabarcoding genetisch analysiert. Basierend auf den morphologisch bestimmten und genetisch erstellten Taxalisten wurden Bewertungsergebnisse mittels der Bewertungssoftware Asterics generiert. Sowohl die jeweiligen Taxalisten als auch die Bewertungsergebnisse wurden anschließend miteinander verglichen. Eine Übersicht der Methodik dieser Studie ist in Abbildung 1 dargestellt. Die einzelnen Arbeitsschritte werden nachfolgend genauer erläutert.

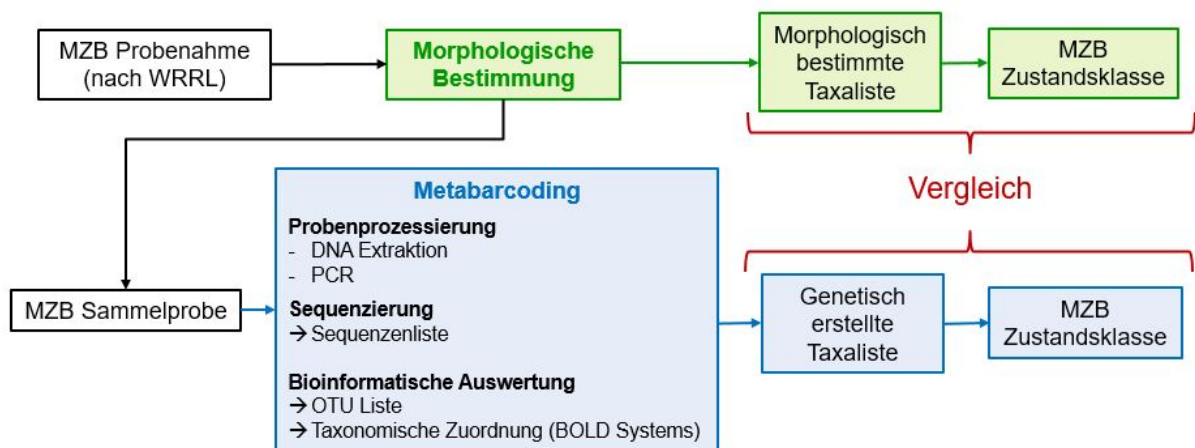


Abbildung 1: Übersicht des methodischen Vorgehens. Makrozoobenthos-Proben aus dem biologischen Monitoring gemäß WRRL wurden morphologisch bestimmt und nachfolgend mittels Metabarcoding genetisch analysiert. Die aus beiden Bewertungsverfahren resultierenden Taxalisten und Bewertungsergebnisse wurden anschließend miteinander verglichen.

### 2.1. Messstellenauswahl

Grundlage für die Auswahl der Makrozoobenthos Proben für die genetischen Untersuchungen waren Messstellen, die im Rahmen des planmäßigen biologischen Monitoringprogramms im Jahr 2019 untersucht wurden. Insgesamt wurden 60 Makrozoobenthos Proben an 13 unterschiedlichen Fließgewässertypen für die genetischen Analysen von der bayerischen Wasserwirtschaft zur Verfügung gestellt. Der größte Anteil der Proben stammte aus alpinen und voralpinen Gewässern, wobei der Fließgewässer-Typ 2.1 (Bach Alpenvorland) mehrheitlich vertreten ist (Abb. 2). Insgesamt haben sich 15 bayerische Wasserwirtschaftsämter an dieser Studie beteiligt.

Ökoregion/FG-Typ	Anzahl MZB Proben
<b>Alpen und Alpenvorland</b>	<b>35</b>
1.1. Bach der Alpen	5
1.2. Kleiner Fluss der Alpen	4
2.1. Bach der Alpenvorland	12
2.2. Kleiner Fluss Alpenvorland	3
3.1. Bach Jungmoräne Alpenvorland	4
4. Großer Fluss Alpenvorland	7
<b>Mittelgebirge</b>	<b>25</b>
5. Silikatischer Mittelgebirgsbach grob	3
5.1. Silikatischer Mittelgebirgsbach fein	8
6. Karbonatischer Mittelgebirgsbach fein	1
6_K Keuperbach	4
7. Karbonatischer Mittelgebirgsbach grob	1
9. Silikatischer Mittelgebirgsbach fein-grob	2
9.2. Großer Mittelgebirgsfluss	5
999 keine Typzuordnung	1
<b>MZB Proben gesamt</b>	<b>60</b>

Abbildung 2: Übersicht der beprobten Fließgewässer-Typen und der jeweiligen Anzahl der Makrozoobenthos Proben.

## 2.2. Makrozoobenthos Probenahme und Probenkonservierung

Die Makrozoobenthos-Probenahme erfolgte im Rahmen des planmäßigen Monitoringprogramms 2019 gemäß WRRL Protokoll mittels „Multi-Habitat-Sampling“. Um eine bestmögliche DNA Qualität des Probenmaterials für die genetischen Analysen erhalten zu können, wurden dem biologisch kartierendem Personal im Vorfeld der Probenahme Anleitungen für die Probenahme und Weiterbehandlung der MZB Proben zur Verfügung gestellt. Bei der Erstellung der Probenahme Anleitungen wurde gezielt darauf geachtet, so wenig bis keinen zusätzlichen Aufwand in der behördlichen Beprobungsroutine für die Metabarcoding-Proben zu generieren. In der Anleitung wurde darauf hingewiesen, den Kescher sorgfältig zwischen den Probenahmen zu reinigen, um das Risiko einer Verschleppung von genetischem Material zu minimieren. Des Weiteren sollte ausschließlich mind. 80 % unvergällter Alkohol für die Probenkonservierung verwendet und zusätzlich ein Ethanolwechsel 24 Stunden nach der Probenahme vorgenommen werden um eine bestmögliche DNA-Konservierung zu gewährleisten. Von Organismen, die zur Bestimmung mit Säure behandelt werden müssen (z.B. *Oligochaeta*) wurden vor der Säure-Behandlung nicht bestimmungsrelevante Körperteile abgetrennt und in die Sammelprobe integriert. Von den Köcherfliegenlarven sollten die Köcher aus mineralischen und pflanzlichen Material entfernt werden, da in pflanzlichem Material Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hemmende Stoffe enthalten sein könnten. Alle an einer Probestelle gefundenen Makrozoobenthos-Arten wurden mit Mindestindividuenzahlen gemäß dem „MZB-Lebensortierung“ Bogen (Handbuch tGWA, Teil B1, Anlage 3) zu einer Sammelprobe vereint (mit Ausnahme von geschützten Arten, wie z.B. Libellen). Nach der Probenahme und Konservierung sollten die Individuen lediglich nur kurzzeitig während der morphologischen Bestimmung ins Wasser gelegt werden und direkt nach der Bestimmung wieder in Ethanol konserviert und dunkel sowie kühl gelagert werden. Nach der Qualitätssicherung durch die taxonomischen Arbeitsgruppen (TAG) wurden die morphologisch bestimmten Makrozoobenthos Arten als Sammelprobe an das LfU versendet. Nach Erhalt der MZB Sammelproben am LfU wurden diese dunkel und kühl

bei 4°C bis zum Versand an die Universität Duisburg-Essen gelagert. In der nachfolgenden Tabelle 1 sind alle 60 MZB-Proben mit detaillierten Informationen zu Probenahme und Messstelle aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung der Makrozoobenthos Proben für die genetischen Analysen. Insgesamt wurden 60 Makrozoobenthos Proben aus 13 unterschiedlichen Fließgewässertypen für genetische Analysen von der bayerischen Wasserwirtschaft (15 Wasserwirtschaftsämtern (WWA)) zur Verfügung gestellt.

Nr.	WWA	Mst.-Nr.	Datum Probenahme	Probenr.	Gewässer	Ökoregion	Typ WRRL
1	Ansbach	2901	24.04.2019	402066	Rohrach	Mittelgebirge	6: Karbon. Mittelgebirgsbach fein
2	Ansbach	16392	07.05.2019	406713	Erlbach	Mittelgebirge	6_K: Keuperbach
3	Ansbach	206415	28.03.2019	406150	Muehlbach	Mittelgebirge	6_K: Keuperbach
4	Aschaffenburg	21138	16.05.2019	402977	Schondra	Mittelgebirge	5.1: Silikat. Mittelgebirgsbach fein
5	Aschaffenburg	21319	13.05.2019	402928	Lohr	Mittelgebirge	5.1: Silikat. Mittelgebirgsbach fein
6	Aschaffenburg	21436	02.05.2019	402855	Karbach	Mittelgebirge	7: Karbon. Mittelgebirgsbach grob
7	Aschaffenburg	122422	02.05.2019	402671	Aschaff	Mittelgebirge	9: Silikat. Mittelgebirgsfluss fein-grob
8	Aschaffenburg	176595	07.05.2019	402827	Seebach	Mittelgebirge	5: Silikat. Mittelgebirgsbach grob
9	Bad Kissingen	20715	02.04.2019	402850	Sulz	Mittelgebirge	5.1: Silikat. Mittelgebirgsbach fein
10	Deggendorf	11513	12.04.2019	401672	Kleine Ohe	Mittelgebirge	5: Silikat. Mittelgebirgsbach grob
11	Deggendorf	12614	27.02.2019	400249	Tannerbach	Alpenvorland	2.1: Bach Alpenvorland
12	Deggendorf	12876	27.02.2019	402791	Kirchberger Bach	Alpenvorland	2.1: Bach Alpenvorland
13	Deggendorf	111092	11.04.2019	402075	Hengersberger Ohe	Mittelgebirge	5: Silikat. Mittelgebirgsbach grob
14	Donauwörth	3043	24.04.2019	402886	Lech	Alpenvorland	4: Großer Fluss Alpenvorland
15	Donauwörth	3047	24.04.2019	402887	Lech	Alpenvorland	4: Großer Fluss Alpenvorland
16	Hof	13758	21.03.2019	402819	Schorgast	Mittelgebirge	5: Silikat. Mittelgebirgsbach grob
17	Hof	23847	24.04.2019	402934	Suedliche Regnitz	Mittelgebirge	5: Silikat. Mittelgebirgsbach grob
18	Hof	23965	23.05.2019	402835	Saechsische Saale	Mittelgebirge	9: Silikat. Mittelgebirgsfluss fein-grob
19	Ingolstadt	3309	04.04.2019	402831	Paar	Alpenvorland	2.2: Kleiner Fluss Alpenvorland
20	Ingolstadt	103416	21.03.2019	402862	Lindacher Bach	Alpenvorland	2.1: Bach Alpenvorland
21	Kempten	3056	16.04.2019	402927	Wertach	Alpen	1.1: Bach der Alpen
22	Kempten	114514	17.04.2019	402925	Obere Argen	Alpenvorland	1.2:kleiner Fluss der Alpen
23	München	10932	04.04.2019	402067	Goldach	Alpenvorland	2.2: Kleiner Fluss Alpenvorland
24	München	10949	01.04.2019	401813	Moosach	Alpenvorland	2.2: Kleiner Fluss Alpenvorland
25	München	10988	08.02.2019	402091	Isar	Alpenvorland	4: Großer Fluss Alpenvorland
26	München	96710	16.04.2019	402115	Abfanggraben	Alpenvorland	999: keine Typzuordnung
27	München	96722	04.03.2019	402084	Sietenbach	Alpenvorland	2.1: Bach Alpenvorland
28	München	105582	28.03.2019	401864	Glonn	Alpenvorland	2.1: Bach Alpenvorland
29	München	10910	22.02.2019	400239	Isar	Alpenvorland	4: Großer Fluss Alpenvorland
30	Nürnberg	3982	27.03.2019	402947	Schwarzach	Mittelgebirge	6_K: Keuperbach
31	Nürnberg	103713	14.03.2019	402969	Roth	Mittelgebirge	9.1_K: Keuperfluss
32	Regensburg	6807	01.04.2019	402852	Bayerische Schwarzach	Mittelgebirge	5: Silikat. Mittelgebirgsbach grob
33	Regensburg	9327	26.03.2019	402863	Hilttenbach	Mittelgebirge	5: Silikat. Mittelgebirgsbach grob
34	Regensburg	22833	24.04.2019	402861	Chodenangl-Bach	Mittelgebirge	5: Silikat. Mittelgebirgsbach grob
35	Rosenheim	96769	23.04.2019	402851	Aidenbach	Alpenvorland	2.1: Bach Alpenvorland
36	Rosenheim	128652	18.04.2019	402074	Walkerseicher Muehlbach	Alpenvorland	2.1: Bach Alpenvorland

Nr.	WWA	Mst.-Nr.	Datum Probenahme	Probenr.	Gewässer	Ökoregion	Typ WRRL
37	Rosenheim	142541	02.04.2019	402670	Feldkirchner Bach	Alpenvorland	3.1: Bach Jungmoräne Alpenvorland
38	Rosenheim	198551	29.03.2019	402089	Inn	Alpenvorland	4: Großer Fluss Alpenvorland
39	Traunstein	12133	26.03.2019	402816	Inn	Alpenvorland	4: Großer Fluss Alpenvorland
40	Traunstein	12165	14.03.2019	402441	Frauendorfer Bach	Alpenvorland	2.1: Bach Alpenvorland
41	Traunstein	12301	28.03.2019	402495	Mittlinger Bach	Alpenvorland	2.1: Bach Alpenvorland
42	Traunstein	12396	16.04.2019	401814	Buchbach	Alpenvorland	3.1: Bach Jungmoräne Alpenvorland
43	Traunstein	12532	18.03.2019	402788	Rettenbach	Alpenvorland	3.1: Bach Jungmoräne Alpenvorland
44	Traunstein	12678	17.04.2019	401671	Steinbach	Alpen	1.1: Bach der Alpen
45	Traunstein	12732	11.04.2019	401993	Oberteisendorfer Ache	Alpen	1.1: Bach der Alpen
46	Traunstein	96548	18.04.2019	402086	Berchtesgadener Ache	Alpen	1.2:kleiner Fluss der Alpen
47	Traunstein	105495	21.03.2019	402475	Mittlinger Bach	Alpenvorland	2.1: Bach Alpenvorland
48	Traunstein	124243	13.03.2019	402442	Frauendorfer Bach	Alpenvorland	2.1: Bach Alpenvorland
49	Traunstein	132791	27.03.2019	401667	Weissbach	Alpen	1.2:kleiner Fluss der Alpen
50	Traunstein	198989	28.03.2019	402476	Mittlinger Bach	Alpenvorland	2.1: Bach Alpenvorland
51	Weiden	4761	23.04.2019	402903	Tirschenreuther Waldnaab	Mittelgebirge	9: Silikat. Mittelgebirgsfluss fein-grob
52	Weiden	6237	20.05.2019	402906	Naab	Mittelgebirge	9.2: Großer Mittelgebirgsfluss
53	Weiden	8049	17.05.2019	402905	Vils	Mittelgebirge	9.2: Großer Mittelgebirgsfluss
54	Weiden	23482	17.04.2019	402902	Wondreb	Mittelgebirge	9: Silikat. Mittelgebirgsfluss fein-grob
55	Weiden	121143	15.05.2019	402904	Schwarzach	Mittelgebirge	9: Silikat. Mittelgebirgsfluss fein-grob
56	Weilheim	3041	19.02.2019	402828	Lech	Alpenvorland	4: Großer Fluss Alpenvorland
57	Weilheim	10754	16.04.2019	401532	Isar	Alpenvorland	1.2:kleiner Fluss der Alpen
58	Weilheim	10782	21.03.2019	400842	Jachen	Alpenvorland	1.1: Bach der Alpen
59	Weilheim	10830	28.03.2019	400884	Kankerbach	Alpenvorland	1.1: Bach der Alpen
60	Weilheim	95737	09.05.2019	401665	Lech	Alpenvorland	4: Großer Fluss Alpenvorland

## 2.3. Metabarcoding

### 2.3.1. Probenprozessierung und Sequenzierung

Die MZB Sammelproben wurden im Labor der Genomics Core Facility der Universität Duisburg-Essen bis zur Aufbereitung für das DNA-Metabarcoding bei 4°C gelagert. Für die Probenaufbereitung wurden die Makrozoobenthos-Proben nach Größe der Individuen vorsortiert (Größenklassen S, M, L) und anhand eines Turrax-Grinders in gefriergetrocknetem Zustand zerkleinert und zu einem Pulver homogenisiert. Aus diesem homogenisierten Pulver wurde anschließend die DNA des Zielgens für Makrozoobenthos (mitochondriales Genfragment der Cytochrom Oxidase I, auch CO1 Markergen genannt) extrahiert und aufgereinigt (NucleoMag Tissue Kit von MACHEREY-NAGEL). Dieser CO1 Marker ist ein universeller Marker für die Analyse tierischer Proben, insbesondere Insekten (Greyer et al. 2018). Die extrahierte Zielgen-DNA wurde anschließend durch eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* (PCR)) mit dem Einsatz spezifischer Primer vervielfältigt. Der Erfolg der Anreicherung des Zielgens bzw. des PCR-Produkts wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dabei zeigte sich, dass die DNA in einigen Proben stark degradiert war, so dass im Vergleich des längeren Standard-Primers (421bp Fragment) kürzere (178bp Fragment), speziell für degradierte DNA entwickelte Primer (Forward Primer „fwhF2“ und Reverse Primer „fwhR2n\_rev“,

178 bp) für die nachfolgende PCR verwendet wurden (Vamos et al. 2017). Neben 9 Negativkontrollen wurde für jede Probe ein unabhängiges technisches Replikat für die DNA Extraktion und die PCR erstellt. Nach erfolgreicher Vervielfältigung der DNA wurden die Basensequenzen des Zielgens mittels Hochdurchsatz Illumina Sequenzierung von einem externen Labor sequenziert.

Die Illumina-Sequenzierung zählt zum Next Generation Sequencing, die sich durch einen hohen Durchsatz auszeichnet. Bei dieser Methode wird die DNA zunächst fragmentiert (ca. 300 Basenpaare) und die Fragmente durch Adapter auf eine Platte gebunden. Auf dieser Platte befinden sich zu den Adaptern komplementäre Primer, so dass sich die Adapter zu den jeweiligen Primern beugen und somit die Synthese eines komplementären DNA Strangs durch Polymerasen erfolgen kann. Diese Stränge werden anschließend getrennt („Brücken PCR“). Somit entstehen zwei komplementäre Einzelstränge, ein Forward-Strang und ein Reverse-Strang. Die Erstellung zweier Stränge ermöglicht eine leichte Detektion von Artefakten, da der Gegenstrang als Kontrolle herangezogen werden kann. Dieser Beugungs- und Synthesevorgang wird mehrfach wiederholt, so dass auf der Platte einzelne Cluster mit identischer Basensequenz entstehen, die zur Signalverstärkung bei dem nachfolgendem Sequenziervorgang dienen. Für die eigentliche Sequenzierung werden anschließend Primer, Polymerasen und Fluoreszenz-gelabelte dNTPs (desoxy- Nucleosidtriphosphate) hinzugefügt, die eine Verfolgung der Sequenzierung in Echtzeit ermöglichen. Die dNTPs sind reversible Terminatoren die dafür sorgen, dass ein einzelnes Nukleotid eingebaut wird, dessen Fluoreszenz durch eine Kamera erfasst wird. Erst nachdem anschließend das Fluoreszenz-Label enzymatisch abgespalten wurde, kann das nächste Nukleotid eingebaut werden. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis das entsprechende DNA-Fragment komplett synthetisiert ist (Prinzip der Illumina Sequenzierung, siehe Abbildung 3). Da die Proben teilweise stark degradiert waren, wurden für diese Proben kürzere Primer (250 Basenpaare, V2 Illumina MiSeq) verwendet. Es wurden zwei unabhängige Sequenzierläufe durchgeführt und zwei Illumina-Libraries erstellt (je eine für ein technisches Replikat der 60 Proben). Alle Proben wurden mit einer Sequenziertiefe von ca. 50.000 reads je Replikat (insgesamt 100.000 reads) sequenziert.

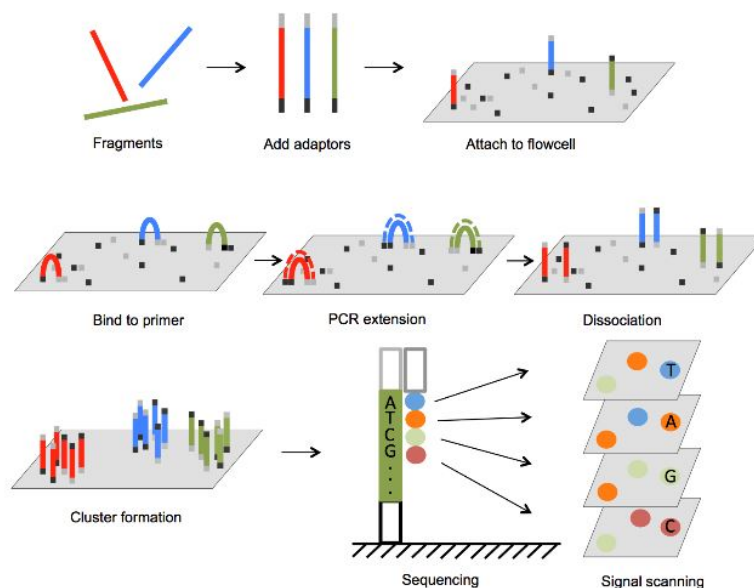


Abbildung 3: Prinzip der Illumina Sequenzierung (Yuan Lu et al. 2016).



### 2.3.2. Bioinformatische Auswertung

Die bioinformatische Auswertung hat zum Ziel, den rohen Datensatz der sequenzierten DNA-Abschnitte so zu bearbeiten, dass am Ende ein belastbarer DNA Datensatz zur Verfügung steht, der biologisch aussagekräftige Informationen enthält. Die nach der Sequenzierung erhaltenen Basensequenzen wurden mit Hilfe der JAMP-Pipeline automatisch an der Universität Duisburg-Essen ausgewertet (gemäß Elbrecht & Steinke 2018). Die generierten Sequenzen wurden im Zuge der bioinformatischen Auswertung zunächst einer Qualitätskontrolle unterzogen, in der die Sequenzen nach Basenqualität gefiltert und die Primer abgeschnitten wurden. Anschließend wurden die „reads“ nach Probestelle sortiert und die „forward & reverse reads“ zusammengeführt. Nachfolgend wurden die Gensequenzen zu sogenannten OTUs (Operational taxonomic units) entsprechend ihrer DNA Sequenz Ähnlichkeit des spezifischen taxonomischen Markers gruppiert („OTU clustering“). Gensequenzen mit einer Gensequenzähnlichkeit von mindestens 97 % werden dabei einem OTU zugeordnet, so dass der Gensequenz Unterschied eines OTU-clusters gleich oder weniger 3 % beträgt. Dieser Unähnlichkeitsschwellenwert von 3 % wurde empirisch abgeleitet und wird standardgemäß verwendet (Konstantinidis & Tiedje J. M. 2005). Für jedes OTU wurde die Anzahl dieser jeweils zugeordneten sequenzierten DNA-Abschnitte („reads“) als Mittelwert der 2 Sequenzierläufe für die entsprechenden Proben angegeben. OTUs mit einer Sequenzhäufigkeit kleiner als 0,01 % von der Gesamtreadanzahl der Probe wurden im Zuge der automatisierten bioinformatischen Prozessierung aus dem Datensatz aussortiert, um mögliche Artefakte durch Sequenzierungsfehler auszuschließen. Zudem wurden ausschließlich OTUs in der Liste belassen, die in der Probe als auch im technischen Replikate vorhanden waren.

Die Basensequenzen der einzelnen OTUs wurden anschließend mit Gensequenzen, die in der Barcode Of Life Database (BOLD) ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)) hinterlegt sind, verglichen und entsprechend dem „best hit“ (höchste prozentuale Übereinstimmung der Basensequenz mit der in BOLD hinterlegten Sequenz „similarity“ und häufigster Treffer) taxonomisch zugeordnet. Die taxonomische Zuordnung erfolgte dabei anhand der prozentualen Übereinstimmung der Probensequenz mit der in BOLD hinterlegten DNA Sequenz. Bei einer Übereinstimmung von >98 % erfolgte eine Zuordnung auf Artlevel, bei einer Übereinstimmung zwischen 95 und 98 % auf Gattungslevel und OTUs mit Übereinstimmungen von 85-90 % wurden auf Familienniveau eingestuft. Bei Übereinstimmungen unter 90 % wurden die OTUs lediglich Klassen zugeordnet, wobei Ähnlichkeiten unter 80 % auch auf zufälligen Ähnlichkeiten basieren können. Aufgrund einer insgesamt guten Übereinstimmung der technischen Replikate wurde der Mittelwert der Read-Anzahlen über beide technischen Replikate als Ergebniswert angegeben. Die Negativkontrollen wiesen keine oder maximal „singletons“ (1 read) auf, wodurch belegt ist, dass keine Kontamination im Labor erfolgte. Für weitere Auswertungen der Daten wurde die von der UDE erstellte Ergebnistabelle der OTUs mit den entsprechenden taxonomischen Zuordnungen dem LfU zur Verfügung gestellt.

## 2.4. Datenaufbereitung

Für den Vergleich und die Zustandsklassenberechnungen der morphologisch bestimmten und genetisch erstellen Befundlisten wurden die Datensätze zunächst aufbereitet und taxonomisch angeglichen. Die genauen Arbeitsschritte der Aufbereitung und Anpassung werden nachfolgend beschrieben.

### 2.4.1. DNA-Datensatz

Der von der Universität Duisburg-Essen erstellte genetische Datensatz umfasste insgesamt 946 OTUs mit Angabe der entsprechenden Mittelwerte der „reads“ der zwei Replikate für die jeweiligen Proben. Für die Analyse wurden lediglich OTUs mit einer „similarity“ (prozentuale Übereinstimmung der Basensequenz des



OTUs mit der in BOLD hinterlegten Sequenz) von mindestens 80 % verwendet. Neben der „similarity“ wurde auch die Anzahl der „reads“ als Qualitätskriterium der Ergebnisse herangezogen. OTUs mit „reads“ bis zu 10 wurden für die nachfolgenden Analysen nicht berücksichtigt, da diese auch auf Rauschen der Sequenziermethode basieren können. Nach dieser Datensatzbereinigung wurden die taxonomischen Level der insgesamt 926 verbliebenen OTUs an die morphologisch erstellten Taxalisten angeglichen, um eine einheitliche Schreibweise zu erzielen. Dabei wurden unterschiedliche Schreibweisen gleicher Taxa an die morphologische Befundliste und die Taxaliste der Gewässerorganismen Deutschlands (Bundestaxaliste, BTL) entsprechend angeglichen (z.B. wurde *Simulium balcanicum* in *Simulium (Wilhelmia) balcanicum* (Bezeichnung in BTL 2017) geändert). Auch Synonyme wurden entsprechend an die morphologische Taxaliste angepasst (z.B. wurde *Stenophylax sequax* in *Micropterna sequax* und *Cricotopus osellai* in *Paratrichocladius osellai* umbenannt). Die DV-Nummer Zuordnung der genetisch ermittelten Taxa erfolgte basierend auf der Bundestaxaliste (Stand 2017). Insgesamt konnte bei 50 OTUs keine DV-Nummer Zuordnung erfolgen, was mehrheitlich aufgrund einer zu hohen taxonomischen Einstufung dieser OTUs (auf Ordnungs- oder Klassenlevel) bedingt war. Bei wenigen OTUs handelte es sich um terrestrische Taxa, z.B. Rapsglanzkäfer (*Arpedium quadrum*) oder gemeiner Ohrwurm (*Forficula auricularia*), die nicht in der BTL 2017 gelistet sind. Unklare DV-Nr. Zuordnungen wurden von den bayerischen taxonomischen Arbeitsgruppen (TAG) überprüft. Insgesamt konnten bei 895 OTUs DV-Nr. Zuordnungen (davon 527 eindeutige DV-Nr. Zuordnungen) erfolgen.

#### 2.4.2. Morphologisch bestimmte Taxa

Insgesamt wurden 3407 morphologisch bestimmte Taxa der auch genetisch untersuchten Proben aus der Limno Fachanwendung exportiert. Aus diesem Datensatz wurden nicht MZB Taxa, die nicht in der Sammelprobe enthalten waren, wie z.B. Fische (*Pisces*) und Signalkrebse (*Pacifastacus leniusculus*) entfernt und die Taxa entsprechend taxonomisch in Stamm, Klasse, Ordnung, Familie, Gattung und Art eingeteilt.

Für den direkten Vergleich der Identifikation von Taxa der jeweiligen taxonomischen Level (ohne DV-Nummer Zuordnung) wurden Mehrfachnennungen, Doppeltaxa oder Gruppierungen entsprechend auf das höhere taxonomische Level zurückgestuft (z.B. „*Athripsodes albifrons / bilineatus / commutatus*“ wurde zur Gattung *Athripsodes* zurückgestuft).

### 2.5. Berechnungen mit der Bewertungssoftware Asterics 4.04

Für die Berechnungen in Asterics (Version 4.04) wurden die genetisch erstellten Datensätze in ein importfähiges Format überführt. Die Ergebnisse der genetischen Analysen lassen bislang keine Rückschlüsse auf die Abundanzwerte der Taxa zu, so dass für die Bewertung lediglich die An- bzw. Abwesenheit der Taxa herangezogen werden konnte. Für den Datenimport wurden die Angaben der „reads“ in der genetisch erstellten Taxaliste in An- bzw. Abwesenheitsdaten, in eine sogenannte 0/1-Matrix (0: Taxon nicht anwesend, 1: Taxon anwesend), überführt. Für die Berechnungen des MZB Moduls „Allgemeine Degradation“ wird die morphologisch bestimmte Taxaliste standardgemäß gefiltert („gefilterte Taxaliste“), um diese auf eine standardisierte Mindestanforderung an die Bestimmung von Makrozoobenthos auf Basis der operationellen Taxaliste zu harmonisieren. Diese Filteroption gilt ausschließlich für die Berechnung des Moduls „Allgemeine Degradation“, die Berechnung der MZB Module „Saprobie“ und „Versauerung“ erfolgt mit den ungefilterten, originalen Taxalisten (Software-Handbuch ASTERICS, Version 4). Da bei genetisch ermittelten Befunden keine Fehler durch unterschiedliche Bestimmungskennnisse entstehen können, wurden für die Berechnungen die originalen Taxalisten verwendet. Auch die Abundanzwerte in den morphologisch bestimmten Taxalisten wurden in An- bzw. Abwesenheitsdaten (0/1-Matrix) transformiert, um sowohl

Abundanz basierte als auch 0/1 Matrix basierte Bewertungsergebnisse für einen direkten Vergleich zu generieren. Eine schematische Übersicht der Berechnungsverfahren und der daraus resultierenden Ergebnisse der morphologisch bestimmten und genetisch erstellten Taxalisten ist in Abbildung 4 dargestellt.

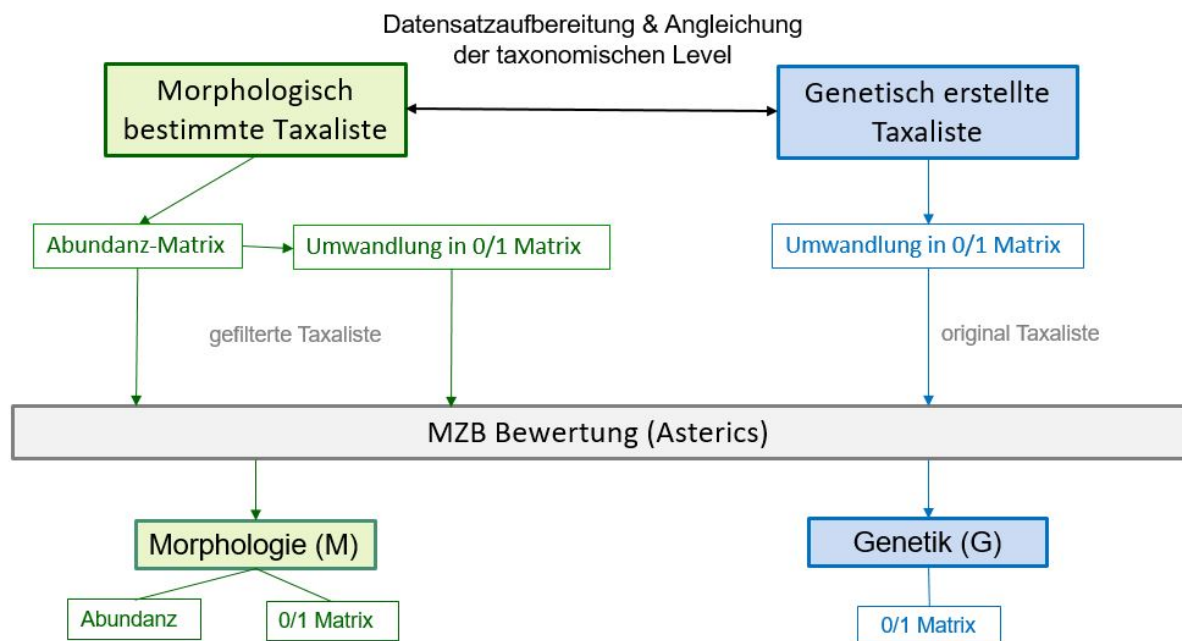


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Berechnungsverfahren und Ergebnisgenerierung der morphologisch bestimmten und genetisch erstellten Taxalisten mittels der Bewertungssoftware Asterics (Version 4.04).

Die MZB Zustandsklasse ergibt sich aus einem worst-case Verschnitt der drei MZB Teilmodule „Saprobie“, „Allgemeine Degradation“ und „Versauerung“. Die nachfolgende Auswertung stützt sich hauptsächlich auf die MZB Teilmodule „Saprobie“ und „allgemeine Degradation“, da der Datenumfang für versauerungsrelevante Fließgewässer für belastbare Aussagen zu klein ist. Die Bewertung des Moduls „Saprobie“ erfolgt durch den Deutschen Saprobieindex, der auf Abundanzklassen von eingestufteten Arten basiert. Der Saprobie-Index kann Werte zwischen 1 und 5 annehmen, wobei ein Saprobie-Wert von 1 indiziert, dass das untersuchte Gewässer nicht oder lediglich vernachlässigbar durch organische Belastung beeinflusst ist. Ein Wert von 5 hingegen weist auf einen erheblichen Einfluss durch organische Belastungen hin. Das Bewertungsergebnis des Moduls „Allgemeine Degradation“ basiert auf dem „allgemeine Degradation Score“, ein multimetrischer Index, der durch die gewichtete Mittelwertbildung aus den Ergebnissen (Scores) von Einzelmetrics („Core Metrics“) berechnet wird. Der Score kann Werte zwischen 1 und 0 annehmen, wobei 1 den Referenzzustand repräsentiert und 0 den schlechtesten theoretisch auftretenden Zustand. Ein Score-Wert im Bereich von 1 bis 0,6 wird in eine sehr gute bis gute Qualitätsklasse überführt. Da die Proben für diese Studie aus unterschiedlichen Fließgewässertypen stammen, werden in der nachfolgenden Auswertung nur die Metrics betrachtet, die für die Berechnungen all dieser Fließgewässertypen relevant sind. Dies ist unter anderem der Deutsche Fauna Index (DFI), der unabhängig vom Fließgewässertyp, mit einer Gewichtung von 50 % in die Berechnung des allgemeinen Degradation Scores eingeht. Die restlichen 50 % basieren auf weiteren Core Metrics, deren Auswahl und Anzahl (zwischen 3 und 5) gewässertypspezifisch festgelegt ist (Software-Handbuch ASTERICS, Version 4, 2013).

## 2.6. Statistische Auswertung

Für visuelle Datensatz-Analysen hinsichtlich Datenverteilung, Varianz und Abhängigkeitsstruktur, wurden Scatterplots und Boxplots erstellt. Zusätzlich wurde der Shapiro-Wilk-Test als statistischer Signifikanztest auf Normalverteilung auf die Datensätze angewendet. Dabei wird die Null-Hypothese, dass eine Normalverteilung der Grundgesamtheit der Stichprobe vorliegt, überprüft. Diese Hypothese wird angenommen, wenn der berechnete p-Wert größer als das Signifikanzniveau von 0,05 ist. Der Shapiro-Wilk-Test wurde ausgewählt, da sich dieser durch eine hohe Teststärke, besonders bei kleineren Stichproben ( $n < 50$ ), auszeichnet. Zusätzlich wurden Korrelationstests durchgeführt, die Auskunft über die Stärke des Zusammenhangs zwischen den unterschiedlichen Bewertungsergebnissen geben (Zustandsklassenergebnisse und zugrundeliegende Metrics, basierend auf Abundanzdaten und Präsenz-/Absenzdaten (0/1 Matrices) sowie basierend auf morphologisch bestimmten und genetisch erstellten Taxalisten). Da in einigen Fällen keine Normalverteilung der Daten vorlag, wurde für den Test auf Korrelation der Spearman-Korrelationskoeffizient ( $r_s$ ) herangezogen. Dieser Rangkorrelationskoeffizient prüft, ob ein monotoner Zusammenhang der rangbasierten Daten vorliegt.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1. Vergleich der Taxalisten

Insgesamt wurden auf Familien-, Gattungs- und Artniveau mehr Taxa durch genetische Verfahren identifiziert im Vergleich zur morphologischen Bestimmung, wobei der ausschließlich genetisch detektierte Anteil besonders auf Artniveau hoch ist (Abb. 5). Zu diesem Ergebnis kamen auch andere Studien, in denen mittels DNA Metabarcoding von Makroinvertebraten-Proben wesentlich mehr Taxa und höhere taxonomische Auflösungen im Vergleich zur klassischen Bestimmung erzielt wurden (Sweeny et al 2011, Gibson et al. 2015, Elbrecht et al. 2017). Durch genetische Verfahren werden alle in der Mischprobe vorhandenen DNA-Moleküle erfasst, die beispielsweise auch von erbeuteten Taxa aus dem Verdauungstrakt des Makrozoobenthos oder von verschleppten Arten stammen können (Buchner et al. 2019, Flynn 2015). Folglich repräsentiert ein marginaler Teil der ausschließlich genetisch detektierten Arten in dieser Studie morphologisch nicht bestimmte Arten, wie zum Beispiel Kleinstlebewesen der Stämme Rotifera und Tardigrada und parasitäre Nematoden oder terrestrische Arten (z.B. Rapsglanzkäfer (*Brassicogethes aeneus*), gemeiner Ohrwurm (*Forficula auricularia*)). Die höhere taxonomische Auflösung durch die genetische Analyse liegt auch darin begründet, dass morphologisch schwer differenzierbare Taxa, die morphologisch nicht eindeutig und mit Sicherheit einer Art zugewiesen werden können, von den Experten vorsorglich auf höhere taxonomische Level zurückgestuft werden. Das könnte auch zum Teil erklären, dass der Anteil an gemeinsam identifizierter Taxa besonders auf Gattungs- (69 %) und Familienniveau (78 %) hoch ist, während der Anteil an gemeinsam detektierten Arten bei 61 % liegt (Abb. 5). Zudem ist es möglich, dass die höhere genetisch detektierte Artenvielfalt teilweise auf Artefakten basiert, die auf Amplifikations- und Sequenzierungsfehlern in Kombination mit unzureichenden Datenverarbeitungsverfahren (z.B. unzureichende Filterung der Rohsequenzen) beruhen (Kunin et al. 2010; Behnke et al. 2011; Bachy et al. 2013). Von den morphologisch bestimmten Arten wurden 39 % genetisch nicht detektiert. Trotz gut ausgebildeter Experten und zusätzlicher Qualitätssicherung der bestimmten Befunde durch die taxonomischen Arbeitsgruppen ist es möglich, dass die morphologische Bestimmung mancher Arten fehlerhaft sein kann und dies somit zu Diskrepanzen zwischen morphologischen und genetischen Befundlisten führt. Bei der Qualitätskontrolle der DNA-Ausbeute hat sich herausgestellt, dass die DNA in einigen Proben durch mangelnde Konservierung teilweise stark degradiert war, so dass kürzere Primer als standardgemäß verwendet wurden. In der Studie von Vamos et al. 2017 wurde vermerkt, dass die Effizienz der Detektion von Taxa für diese kurzen Primer etwas geringer ist als für längere Primer Fragmente (Vamos et al. 2017), was die Artwiederfindung in dieser Studie eingeschränkt haben könnte. Auch unterschiedliche Biomassen der Arten in einer Sammelprobe können ein Problem für die genetische Detektion der einzelnen Taxa in der Probe darstellen, da sehr kleine Arten mit vergleichsweise geringeren Biomassen bei der genetischen Analyse „übersehen“ werden können (Elbrecht et al. 2017). Aufgrund der unterschiedlichen Eignung der Primer für verschiedene Artgruppen kann auch die Primerwahl die genetisch detektierbare Artenvielfalt und Wiederfindung der Taxa in den Sammelproben beeinflussen (Hajibabaei et al. 2019). Eine eindeutige genetische Artzuweisung ist bei polymorphen und nahe verwandten Arten generell schwierig, da diese Arten fast identische Basensequenzen aufweisen. Als Konsequenz können einem OTU mehrere Arten zugewiesen werden (Flynn et al. 2015). In dieser Studie hat sich gezeigt, dass in solchen Fällen eine falsche, genetisch aber sehr ähnliche Art durch die automatisierte „best hit“ Auswahl in der BOLD Referenzdatenbank ausgewählt wurde. So wurde beispielsweise ein OTU der Art *Simulium kiritshenkoi* zugeordnet, welche in der Türkei, im Iran und in Armenien verbreitet ist und ihr Vorkommen im deutschen Raum unwahrscheinlich ist. Diese Art weist eine fast identische COI-Sequenz wie die morphologisch bestimmte Art *Simulium ornatum* auf, die trotz gleicher „similarity“ auf-

grund einer geringeren Trefferquote nicht selektiert wurde. Diese Problematik der Unterscheidung von genetisch sehr ähnlichen Arten führt zu einer Reduktion des Anteils an gemeinsam detektierten Arten des klassischen und genetischen Verfahrens. Obwohl in der Referenzdatenbank BOLD im Jahr 2019 bereits für schätzungsweise 90 % der Arten aus der operationellen Taxaliste Deutschlands Barcodes vorliegen sind Lücken vorhanden, die die Detektion von morphologisch bestimmten Arten einschränken können (Buchner et al. 2019). Zum Zeitpunkt dieser Studie, war für einige in BOLD hinterlegten Referenzsequenzen der entsprechenden OTUs anstatt eines Artnamens eine Art-Kennziffer hinterlegt. Dies betraf zum Beispiel manche Eintagsfliegen-Arten der Gattung *Rhithrogena* (z.B. „*Rhithrogena* sp. 19 LV“). Zudem konnte für ein OTU keine taxonomische Zuordnung erfolgen, was auf eine Informationslücke in der BOLD Referenzdatenbank oder auf Fehler im genetischen Verfahren hinweisen könnte.

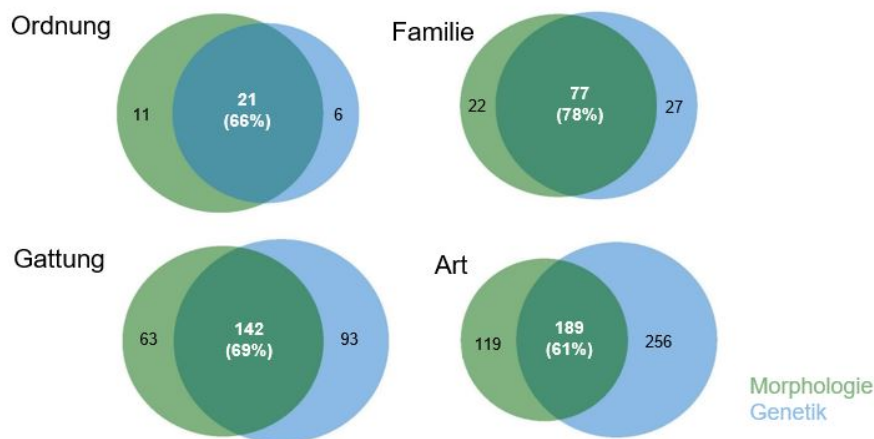


Abbildung 5: Übersicht der ausschließlich morphologisch (grün) und genetisch (blau) sowie gemeinsam identifizierten taxonomischen Level auf Ordnungs-, Familien-, Gattungs- und Artniveau.

Bei dem Vergleich der Makrozoobenthos Stämme Arthropoda (Gliederfüßer), Mollusca (Weichtiere) und Annelida (Ringelwürmer) ist ersichtlich, dass der Anteil an gemeinsam detektierten Taxa bei den Gliederfüßern (Arthropoda) am höchsten ist (70 %), gefolgt von den Ringelwürmern (Annelida) (41%) (Abb. 6). Die morphologisch bestimmten Hirudinea Arten *Glossiphonia complanata*, *Erpobdella octolculata* und *Dina punctata* der Annelida wurden genetisch nicht nachgewiesen. Bei den Weichtieren (Mollusca) wurde die geringste Übereinstimmung (24 %) erzielt. Von den Mollusca wurde eine deutlich höhere Artenvielfalt morphologisch bestimmt und die morphologisch bestimmte Gattung *Pisidium* und die Art *Potamopyrgus antipodarum* wurden genetisch nicht nachgewiesen. Der Stamm der Plathelminthes, zu dem die Klasse der Turbellaria gehört, war mit Vertretern wie *Dugesia gonocephala* oder *Polycelis nigra/tenuis* in der morphologisch bestimmten Taxaliste vertreten, wurde genetisch aber nicht abgebildet. Da die DNA-Sequenzen der morphologisch bestimmten Taxa der Turbellaria, Hirudinea und der Mollusca in der Referenzdatenbank BOLD hinterlegt sind, ist davon auszugehen, dass das verwendete Markergen in Kombination mit den Primern, für Turbellaria nicht und für Mollusca sowie Annelida nur eingeschränkt geeignet ist. Bei den Arthropoda hingegen, ist die genetisch ermittelte Taxavielfalt deutlich größer als die Anzahl der morphologisch bestimmten Taxa (Abb. 6). Es ist bekannt, dass manche Taxa aufgrund von Primer- bzw. Template-Fehlpassungen durch PCR nicht amplifiziert werden und dass die Primer-Effizienz artspezifisch ist, was zu qualitativen und quantitativen Verzerrungen der Ergebnisse führen kann („primer bias“) (Suzuki & Giovannoni 1996, Polz & Cavanaugh 1998, Clarke et al. 2014, Sharma & Kobayashi 2014, Deagle et al. 2014, Piñol et al. 2014, Elbrecht & Leese 2015, Flynn et al. 2015, Elbrecht et al. 2017). Diese Effekte können auch in dieser

Studie nicht ausgeschlossen werden. Zudem ist es auch möglich, dass Fehler bei der automatisierten Taxazusordnung aufgetreten sind, oder dass falsch bestimmte DNA-Sequenzen in BOLD hinterlegt sind, die das Ergebnis verfälschen.

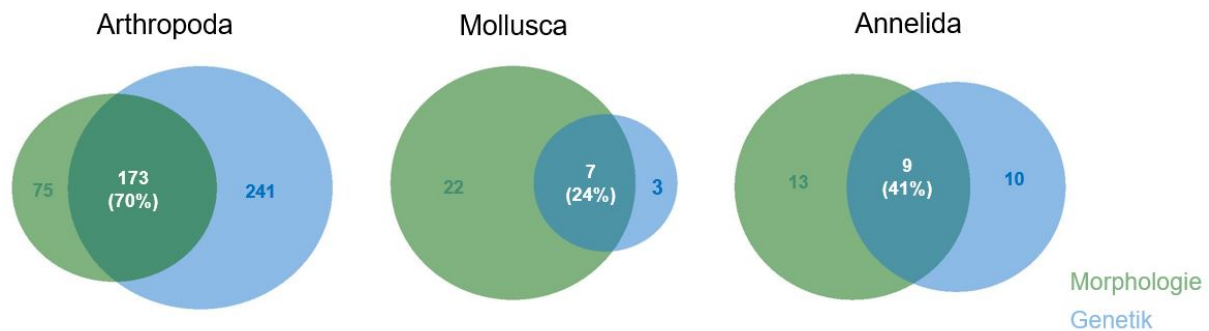


Abbildung 6: Anteile der ausschließlich und gemeinsam morphologisch (grün) und genetisch (blau) identifizierten Taxa der Stämme Arthropoda, Mollusca und Annelida.

Da Insekten (Klasse Insecta) sowohl qualitativ als auch quantitativ bedeutende Vertreter in den Makrozoobenthos Proben sind, wird diese Klasse der Arthropoda für den Vergleich der Bewertungsverfahren genauer beleuchtet. Die Übereinstimmung der morphologisch bestimmten Arten mit den genetisch detektierten Taxa ist bei der Insecta Ordnung Trichoptera mit 77% am höchsten, gefolgt von Plecoptera (73%), Coleoptera (67%) und Diptera (66%). Die geringste Übereinstimmung liegt bei den Ephemeroptera vor (60%) (Abb. 7). Von den Insecta Ordnungen Plecoptera (Steinfliegen), Trichoptera (Köcherfliegen), Diptera (Zweiflügler) und Coleoptera (Käfer) wurden insgesamt mehr Arten durch das genetische Verfahren nachgewiesen (Abb. 7). Die genetische Artenvielfalt ist dabei bei Plecoptera, aber vor allem bei den Diptera im Vergleich zur morphologischen Bestimmung deutlich am größten. Dies liegt daran, dass einige Arten dieser Ordnungen als Larve morphologisch nicht sicher differenziert werden können und daher nur bis zur Gattung bestimmt werden, wie zum Beispiel die Plecoptera Gattungen *Isoperla*, *Nemoura* und *Protonemura*. Der größte Teil der ausschließlich genetisch detektierten Diptera Taxa gehört zu der Familie der *Chironomidae* (68 %). Auch einige Arten der Diptera Familie *Simuliidae* wurden ausschließlich genetisch erfasst, wie zum Beispiel *Simulium balcanicum*, *Simulium cryophilum* oder *Simulium kiritshenkoi*, welche in der Türkei, im Iran und in Armenien verbreitet ist und ihr Vorkommen im deutschen Raum unwahrscheinlich ist. Auch in der Studie von Elbrecht et al. 2017 wurden durch Metabarcoding vor allem für *Chironomidae* und *Simulidae* eine höhere taxonomische Diversität erzielt (Elbrecht et al. 2017). Bei den *Chironomidae* ist die Bestimmbarkeit anhand morphologischer Merkmale nur schwer oder nicht auf Gattungs- bzw. Artniveau möglich, so dass die morphologische Bestimmung meist nicht über die Bestimmung auf Familienniveau hinausgeht (Haase & Sundermann 2004). Besonders Taxa der Trichoptera (insbesondere der Familien *Leptoceridae* und *Limnephilidae*) und der Ephemeroptera (insbesondere der Familie *Heptageniidae*) wurden größtenteils ausschließlich morphologisch detektiert, wobei von den Ephemeroptera mehr Taxa morphologisch als genetisch detektiert wurden. Beispiele für ausschließlich morphologisch bestimmte Trichoptera Arten sind *Brachycentrus subnubilus*, *Mystacides azureus*, *Ithytrichia lamellaris* oder Arten der Gattung *Ceraclea*. Beispiele für ausschließlich morphologisch bestimmte Ephemeroptera Arten sind *Ephemera lineata*, *Baetis fuscatu*s, *Centroptilum luteolum* oder die Gattungen *Heptagenia* und *Leptophlebia*. Eine höhere morphologisch bestimmte Artenvielfalt könnte ein Indiz dafür sein, dass in der Bestimmungsliteratur unterschiedliche morphologische Merkmale als Artdifferenzierung interpretiert werden, diese Artdifferenzierung auf genetischer Ebene aber nicht gegeben ist. Auch Schwächen des genetischen Verfahrens, wie z.B. Primer Ineffizienz, könnten ein Grund dafür sein, dass morphologisch bestimmte Arten durch genetische Analysen nicht



erfasst wurden. Zudem ist noch anzumerken, dass einige der genetisch differenzierten Rhitrogena Taxa als Zahl und ohne Angabe eines Artnamens in der Taxaliste hinterlegt waren und diese daher auf Gattungsniveau zurückgestuft wurden. Folglich können Unstimmigkeiten zwischen morphologisch bestimmten und genetisch detektierten Arten nicht nur auf Schwächen in der morphologischen Bestimmung, sondern auch auf Schwächen im genetischen Verfahren, wie Markergen/Primer-Ineffizienz, Unvollständigkeits in der Datenbank oder auf automatisierten Fehlzuweisungen beruhen.

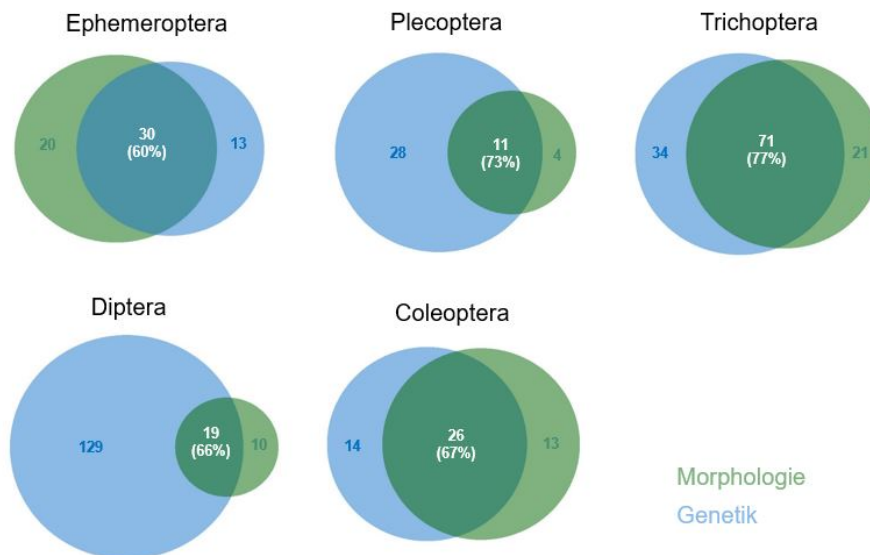


Abbildung 7: Anteile der ausschließlich morphologisch (grün) und genetisch (blau) sowie gemeinsam identifizierten Taxa der Insecta Ordnungen Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, Diptera und Coleoptera.

### 3.2. Vergleich der Bewertungsergebnisse

Der Vergleich der morphologisch bestimmten und genetisch erstellten Taxalisten auf DV-Nummer Ebene zeigt, dass geringfügig mehr genetisch identifizierte Taxa einer DV-Nummer zugeordnet werden konnten (526) im Vergleich zu den morphologisch bestimmten Taxa (521). Der Anteil an gemeinsam identifizierten Taxa mit DV-Nummer Zuordnung liegt bei 49 % (Abb. 8). Unter den ausschließlich morphologisch bestimmten Taxa mit DV-Nr. Zuordnung weisen deutlich mehr Taxa Saprobie-Index und DFI Einstufungen auf (Abb. 9). Demzufolge konnten von den morphologisch bestimmten Taxalisten überwiegend mehr DFI und Saprobie-Index eingestufte Taxa für die Asterics Bewertung herangezogen werden im Vergleich zu den genetischen Befunden. Dies verdeutlicht, dass für viele der ausschließlich genetisch detektierten Arten, wie Arten der *Chironomidae*, keine bewertungsrelevanten autökologischen Informationen in der operationellen Taxaliste vorliegen, die für die Makrozoobenthos Bewertung genutzt werden können.

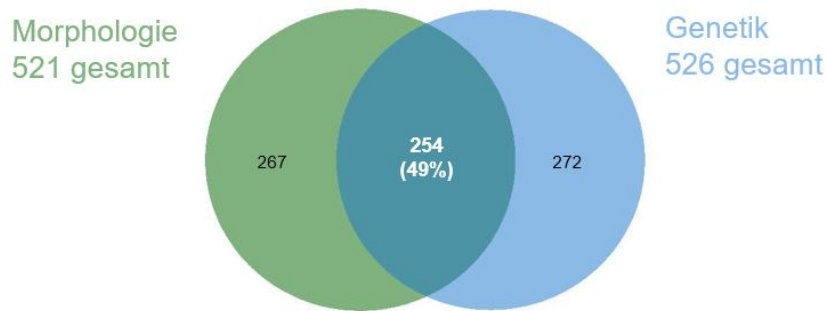


Abbildung 8: Anteile der gemeinsam und ausschließlich morphologisch bestimmten (grün) und genetisch detektierten (blau) Taxa mit DV-Nr. Zuordnung.

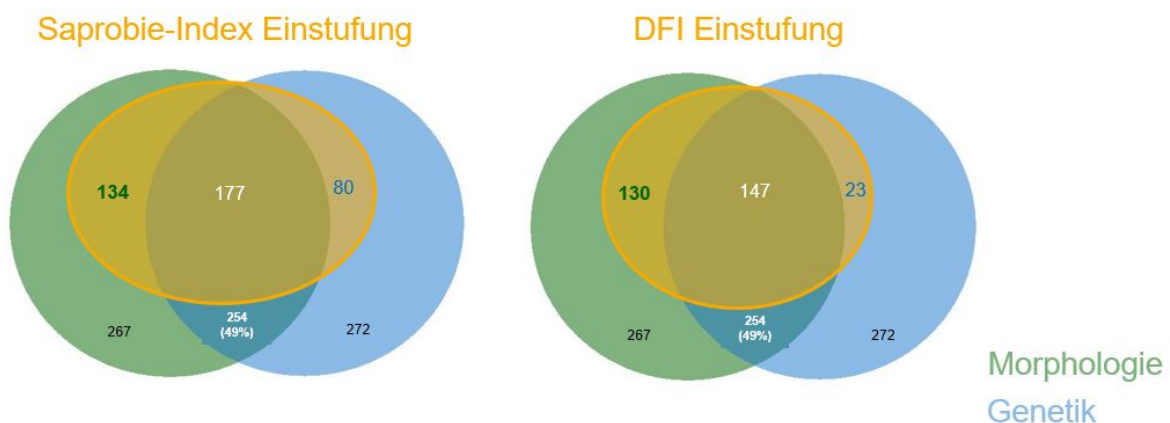


Abbildung 9: Anteile der gemeinsam und ausschließlich morphologisch bestimmten (grün) und genetisch detektierten (blau) Taxa mit DV-Nr. Zuordnung und die jeweiligen Anzahlen der Taxa mit Saprobie-Index und DFI Einstufung.

Da genetische Analysen keine Abundanzwerte der Arten liefern können, müssen für die Bewertungen An- bzw. Abwesenheiten der Taxa in Form von 0/1-Matrizes (0: Taxon nicht anwesend, 1: Taxon anwesend) herangezogen werden. Der Anteil an ungesicherten Ergebnissen hat sich, sowohl durch die Transformation der Abundanz der morphologischen Befunde in 0/1 Matrizen als auch durch die Verwendung von genetischen anstatt morphologischen Befunden in dem MZB Modul „Saprobie“ und vor allem in dem Modul „Allgemeine Degradation“ deutlich erhöht (Abb. 10). Dies liegt daran, dass die Sicherheitskriterien der Ergebnisse dieser Teilmodule im klassischen Bewertungsverfahren auf bestimmten Schwellenwerten von Häufigkeitsklassen der Taxa basieren. Das Saprobie Ergebnis gilt als gesichert, wenn die Summe der Häufigkeitsklassen (ökoregionunabhängig) einen Wert von mindestens 20 erreicht. Das Ergebnis der allgemeinen Degradation gilt als gesichert, wenn die wenn die Summe der Häufigkeitsklassen der Indikator taxa des Fauna-Index einen Schwellenwert von 15 oder 20 (abhängig von der sich ergebenden Qualitätsklasse im Modul „Allgemeine Degradation“) übersteigt (Software-Handbuch ASTERICS, Version 4, 2013). Da genetische Verfahren keine Informationen zu der Anzahl der Individuen einer Art, sondern lediglich An-/Abwesenheitsdaten für die Berechnungen liefern können, werden die im klassischen Verfahren definierten Schwellenwerte durch die drastische Datenreduktion in den meisten Fällen nicht erreicht. Da die Anzahl der gesicherten Ergebnisse demzufolge sehr gering ist, wurden für die Berechnungen auch die ungesicherten Ergebnisse berücksichtigt.



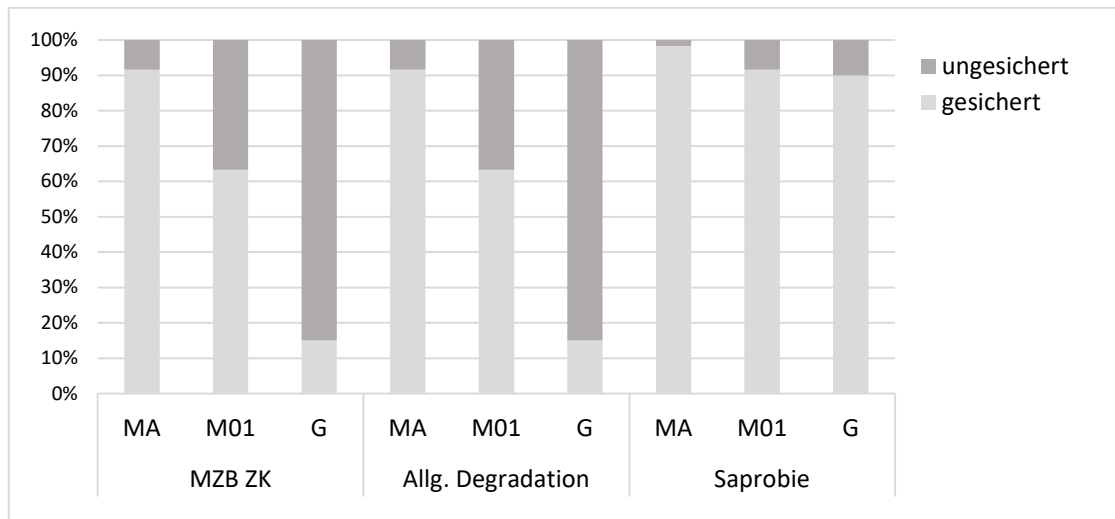


Abbildung 10: Anteile der gesicherten und ungesicherten Ergebnisse der berechneten Zustandsklassen der Biologischen Qualitätskomponente Makrozoobenthos und den MZB Teilmodulen „Allgemeine Degradation“ und „Saprobie“ für die jeweiligen Berechnungsverfahren (MA: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit morphologisch bestimmten Taxalisten mit Abundanzwerten, M01: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit morphologisch bestimmten Taxalisten mit An-/Abwesenheitsdaten, G: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit genetisch erstellten Taxalisten mit An-/Abwesenheitsdaten).

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Korrelationsanalysen nach Spearman für den Saprobie-Index, den allgemeine Degradation Score und den Deutschen Fauna Index Score dargestellt (Abb.11). Für alle berechneten Metrics ergaben sich statistisch hoch signifikante Korrelationen ( $p$ -Wert  $< 2.2e-16$  \*\*\*,  $n=60$ ). Dabei sind die Korrelationen zwischen den Berechnungen basierend auf Abundanzwerten und 0/1 Matrizen bei allen Metrics höher als die Korrelationen zwischen den Berechnungen mit morphologisch bestimmten und genetisch erstellten Taxalisten. Dies indiziert, dass Änderungen in den Bewertungsergebnissen im Vergleich zum klassischen Verfahren zu einem höheren Anteil durch die Verwendung genetischer Befunde als durch die Transformation der Abundanzwerte in An-/Abwesenheitsdaten verursacht werden. Der Score des Moduls „Allgemeine Degradation“ weist etwas geringere Spearman rank Korrelationen zwischen dem klassischen und dem genetischen Verfahren auf ( $r_s = 0,90$ ,  $p < 2.2e-16$ ,  $n=60$ ) als der Saprobie-Index ( $r_s = 0,95$ ,  $p < 2.2e-16$ ,  $n=60$ ). Das Modul „Saprobie“ basiert ausschließlich auf dem Saprobie-Index, welcher sich aus Abundanzklassen sowie der Gewichtung der Arten mit Saprobie-Einstufung berechnet. Das Modul „Allgemeine Degradation“ ist ein multimetrischer Index, der sich fließgewässertypspezifisch aus mehreren (bis zu 5) Core Metrics zusammensetzt. Diese Core-Metrics werden unterschiedlich berechnet und können auf Abundanzwerte, Abundanzklassen oder auf Artzahlen basieren. Der Einfluss einer Transformation von Abundanzwerte in 0/1-Matrizen auf die Bewertungsergebnisse kann somit fließgewässertypspezifisch variieren. Da Abundanzklassen (Werte 1-7) kleinere Werte als Abundanzwerte annehmen, führt die Transformation von Abundanzklassen in 0/1-Matrizen zu geringeren Abweichungen im Vergleich zum klassischen Verfahren, als die Transformation von Abundanzwerten in 0/1-Matrizen. Auch in anderen Studien wurde festgestellt, dass Abundanz-basierte MZB Metrics schlecht korrelieren, während die Bewertungsergebnisse des Moduls „Saprobie“ gut zwischen klassischem und genetischem Verfahren korrelieren. Zudem zeigten die Korrelationen deutliche Unterschiede in den jeweiligen Fließgewässertypen (Buchner et al. 2019). Der Deutsche Fauna Index wird auf Grundlage von Abundanzklassen berechnet und für die Bewertung der allgemeinen Degradation aller Fließgewässertypen herangezogen. Dieser Core Metric weist die geringsten Korrelationen der berechneten Deutschen Fauna Index Scores zwischen dem klassischen und genetischen Verfahren auf ( $r_s = 0,84$ ,  $p < 2.2e-16$ ,  $n=60$ ).

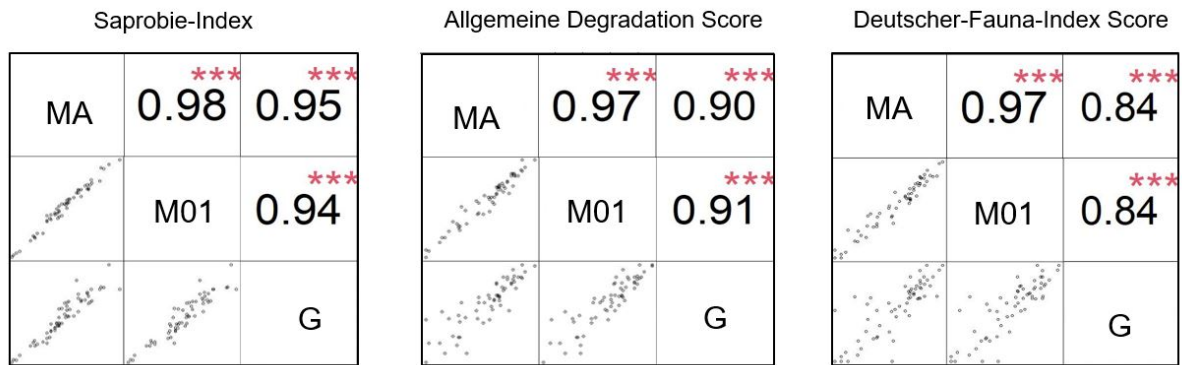


Abbildung 11: Streudiagramme (unterhalb der Diagonale) und Spearman-Korrelationskoeffizienten (oberhalb der Diagonale) für jede Verfahrenskombination der berechneten Saprobie Indizes, allgemeine Degradation Scores und Deutsche Fauna Indizes der morphologisch und genetisch ermittelten Makrozoobenthos Befunde. Auf der Diagonale sind die jeweiligen Berechnungsverfahren dargestellt (MA: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit morphologisch bestimmten Taxalisten mit Abundanzwerten, M01: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit morphologisch bestimmten Taxalisten mit An-/Abwesenheitsdaten, G: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit genetisch erstellten Taxalisten mit An-/Abwesenheitsdaten) Statistisch hoch signifikante Spearman-Korrelationen ( $p < 2,2e-16$ ) sind durch \*\*\* gekennzeichnet.

Die Verteilung der berechneten Zustandsklassen der jeweiligen Verfahren in der Gesamtbewertung des Makrozoobenthos zeigt, dass der Anteil an gut und besseren Zustandsklassen (Zustandsklassen 1 und 2) im klassischen Verfahren höher (62 %) als bei den genetischen Verfahren ist (53 %). Auf Ebene der Teilmodule wird ersichtlich, dass sich der Anteil an gut und besseren Zustandsklassen in dem Teilmodul „Allgemeine Degradation“ reduziert, während sich der Anteil der gut und besseren Zustandsklassen in dem Modul „Saprobie“ marginal erhöht (Abb. 12).

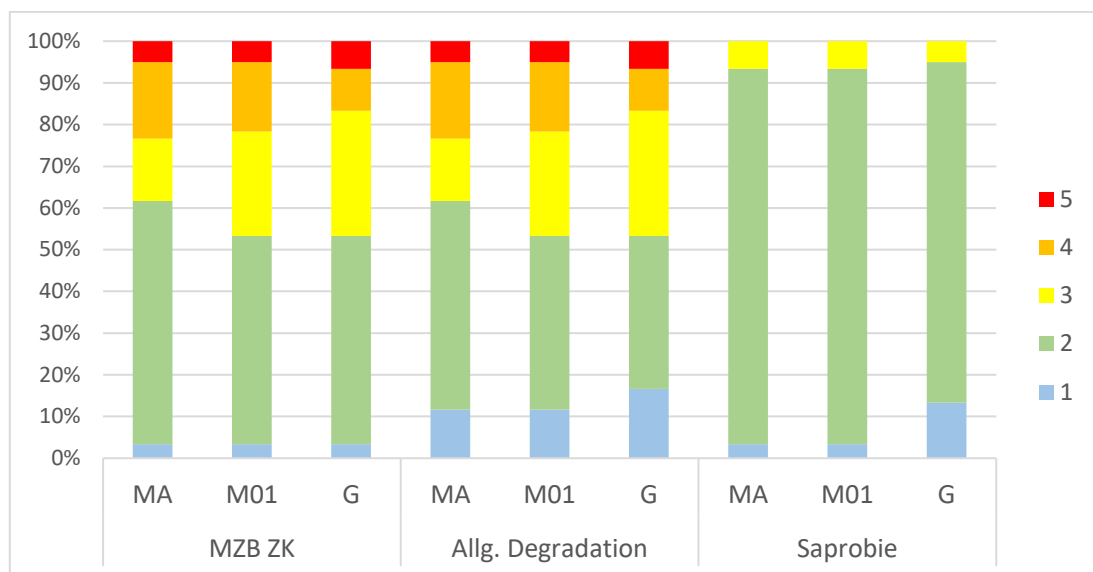


Abbildung 12: Verteilung der Bewertungsergebnisse (Zustandsklassen 1: sehr gut bis 5: schlecht) der unterschiedlichen Verfahren für die Gesamtbewertung der biologischen Qualitätskomponente Makrozoobenthos (MZB) und für die MZB Teilmodule "Allgemeine Degradation" und "Saprobie" (MA: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit

morphologisch bestimmten Taxalisten mit Abundanzwerten, M01: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit morphologisch bestimmten Taxalisten mit An-/Abwesenheitsdaten, G: Ergebnisse basieren auf Berechnung mit genetisch erstellten Taxalisten mit An-/Abwesenheitsdaten).

Änderungen in den Bewertungsergebnissen des genetischen Verfahrens im Vergleich zum klassischen Verfahren entstehen sowohl durch die Transformation der Abundanzwerten in An-/Abwesenheitsdaten, als auch durch den Ersatz der morphologischen durch genetische Befunde. Um die Auswirkungen der Verfahrensänderungen auf die Bewertungsergebnisse besser differenzieren zu können, erfolgt vor der Gesamtbeurteilung der Zustandsklassenänderungen zunächst eine Einzelbetrachtung der Verfahrensänderungen. Bei 85 % der klassisch berechneten MZB Bewertungsergebnisse ergeben sich keine Änderungen durch die Transformation von Abundanzwerten zu 0/1-Werten. In den Fällen, in denen sich Änderungen in den MZB Zustandsklassen ergeben, ist der Anteil an Verschlechterungen größer (12 %) als der Anteil an Verbesserungen (3 %) (Abb. 13). Die Änderungen in den MZB Bewertungsergebnissen im Rahmen einer Zustandsklassenänderung resultieren hauptsächlich von dem Modul „Allgemeine Degradation“. In dem Modul „Saprobie“ haben sich keine Änderungen durch die Transformation der Abundanzwerten ergeben. Die Zustandsklassenänderungen werden durch den Proportionalitätsverlust der Indikatorarten, der mit der Transformation der Abundanzwerten zu An- und Abwesenheitsdaten einhergeht, verursacht (Buchner et al. 2019). Die Ergebnisse dieser Studie werden auch von der Studie von Buchner et al. in 2019 bestätigt, in welcher Bewertungsergebnisse von über 13.000 Makrozoobenthos Proben aus verschiedenen Fließgewässertypen verglichen wurden. In dieser Studie von Buchner et al. konnte gezeigt werden, dass die Berechnungen mit An- und Abwesenheitsdaten mehrheitlich (bei 77 %) zu ähnlichen Bewertungsergebnissen führten wie die Berechnungen basierend auf Abundanzwerten und dass es sich bei Abweichungen geringfügig mehr um Verschlechterungen (12 %) als um Verbesserungen (11 %) handelte. Zudem zeichnete sich auch in dieser Studie von Buchner et al. ein höheres Ausmaß an Änderungen in dem MZB Modul „Allgemeine Degradation“ (keine Änderung bei 75 %) als in dem Modul „Saprobie“ (keine Änderungen bei 92 %) ab. Darüber hinaus konnten deutliche Unterschiede zwischen den Fließgewässertypen aufgezeigt werden, wobei besonders Tieflandflüsse von Änderungen in den Bewertungsergebnissen betroffen waren (Buchner et al. 2019).

#### Berechnungen basierend auf 0/1 Matrizen bewerten besser/schlechter als Berechnungen mit Abundanz

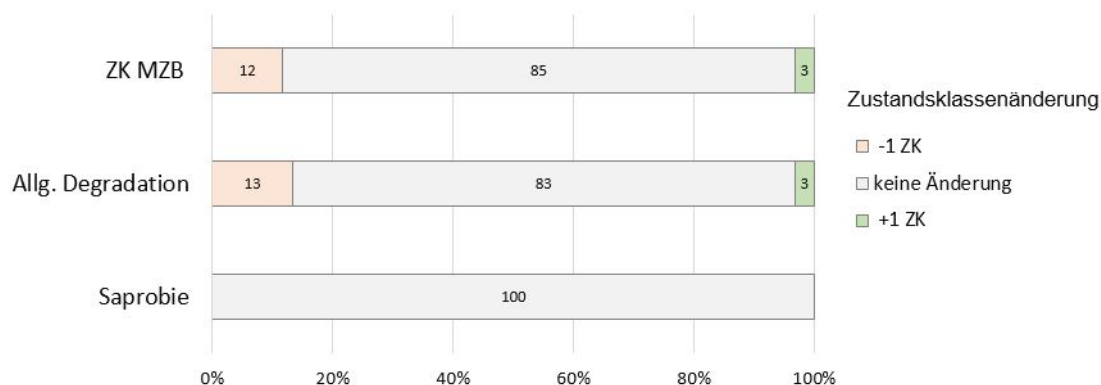


Abbildung 13: Darstellung der Zustandsklassenänderungen, die sich durch die Transformation der Abundanzwerte in 0/1-Matrizen bei den Berechnungen basierend auf den morphologisch bestimmten Befunden für die Zustandsklassen der BQK Makrozoobenthos und für die Teilmodule „Allgemeine Degradation“ und „Saprobie“ ergeben. In den Säulen sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Ergebnisse dargestellt.

Bei der Mehrheit der Makrozoobenthos Bewertungsergebnisse (67 %) haben sich keine Zustandsklassenänderungen durch den Ersatz morphologischer Befunde durch genetische Befunde für die Berechnungen mit An-/Abwesenheitsdaten (0/1 Matrix) ergeben. Die durch genetische Befunde erzielten Ergebnisse haben sich im Vergleich zu den Berechnungen basierend auf morphologisch bestimmten Befunden zu etwa gleichen Anteilen verbessert (18 %) als auch verschlechtert (15 %) (Abb. 14). Auch in diesem Fall ist das MZB Teilmodul „Allgemeine Degradation“ stärker von Änderungen betroffen als das Modul „Saprobie“, wobei das genetische Verfahren um bis zu zwei Zustandsklassen besser bewertet als das klassische Verfahren. In beiden MZB Teilmodulen wurden durch die Verwendung genetischer Befunde sowohl schlechtere aber mehrheitlich bessere Zustandsklassen berechnet. Ein entscheidender Grund für die besseren Bewertungsergebnisse in den Teilmodulen ist das Fehlen von Indikatorarten mit schlechten DFI oder Saprobie-Index Einstufungen, die genetisch nicht nachgewiesen werden konnten. Zu den Arten mit schlechten DFI Einstufungen, die genetisch nicht detektiert wurden, gehören z.B. der Strudelwurm *Dugesia gonocephala*, (DFI von -1 für die FG-Typen 2.2, 3.1, und 4, DFI von -2 für die FG-Typen 1.1. und 1.2). und *Polycelis tenuis/nigra* (DFI von -2 für die FG-Typen 1.2, 2.1, 3.1, 4 und 9, DFI von -1 für die FG-Typen 2.2 und 9.2). Analog fallen die Bewertungsergebnisse des MZB Moduls „Saprobie“ besser bei den Berechnungen mit den genetischen Taxalisten aus, da viele Arten mit einer schlechten Saprobie-Index Einstufung genetisch nicht nachgewiesen wurden. So werden beispielsweise der Plattwurm *Dendrocoelum lacteum* (Saprobie-Index Einstufung von 2,4) und die gemeine Tellerschnecke *Planorbis planorbis* (Saprobie-Index Einstufung von 2,4) für die Berechnungen basierend auf genetischen Befunden im Vergleich zur morphologisch basierten Bewertung nicht berücksichtigt, was insgesamt zu besseren Ergebnissen führt.

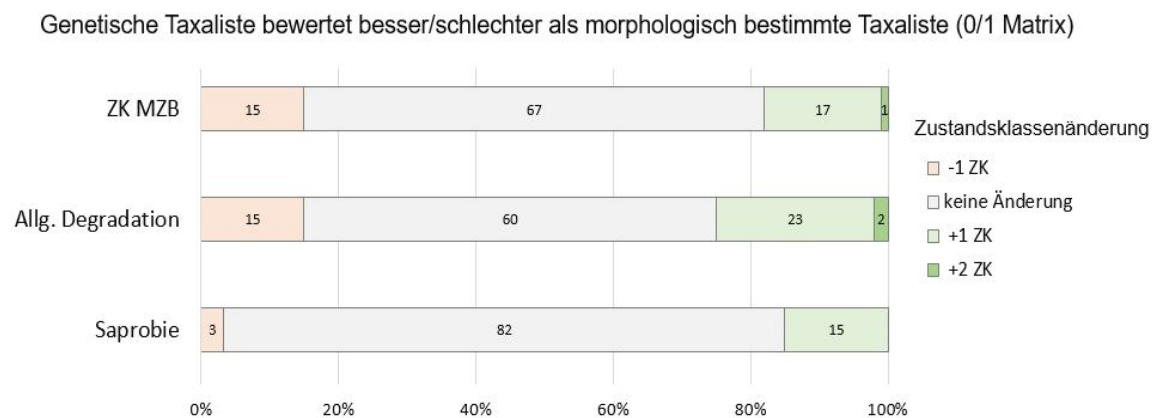


Abbildung 14: Darstellung der Zustandsklassenänderungen, die sich durch Berechnungen basierend auf genetisch ermittelten statt morphologisch bestimmten Befunden für die Zustandsklassen der BQK Makrozoobenthos und für die Teilmodule „Allgemeine Degradation“ und „Saprobie“ ergeben. Die Berechnungen wurden mit An-/Abwesenheitsdaten (0/1 Matrix) durchgeführt. In den Säulen sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Ergebnisse dargestellt.

In einem direkten Vergleich der MZB Bewertungsergebnisse basierend auf dem klassischen Verfahren (morphologisch bestimmte Taxa mit Abundanzen) und genetischen Bewertungsverfahren (genetisch erstellte Taxaliste mit An-/Abwesenheitsdaten) ist ersichtlich, dass sich bei der Mehrheit der berechneten Bewertungsergebnisse (63 %) keine Änderungen ergeben (Abb.15). Auch in der Studie von Elbrecht et al. konnte aufgezeigt werden, dass mehrheitlich ähnliche Makrozoobenthos Bewertungsergebnisse mittels Metabarcoding wie mit dem klassischen Verfahren erzielt werden können (Elbrecht et al. 2017). Im Schnitt führten die Verfahrensänderungen geringfügig zu schlechteren (20 %) als zu besseren (17 %) MZB Zustandsklassen und die Zustandsklassenänderungen belaufen sich mehrheitlich auf Änderungen um eine Zustandsklasse.

In beiden Teilmodulen „Allgemeine Degradation“ und „Saprobie“ resultierten die Verfahrensänderungen im Schnitt in eine Verbesserung der Ergebnisse. In dem Teilmodul „Allgemeine Degradation“ führte die Anwendung von genetischen Verfahren zu einem höheren Anteil an Ergebnisänderungen (keine Änderung bei 58 % der Ergebnisse) als in dem Teilmodul „Saprobie“ (keine Änderung bei 82 % der Ergebnisse). Während sich die Zustandsklassenänderungen in dem Teilmodul „Saprobie“ ausschließlich im Rahmen einer Zustandsklasse belaufen, kam es in dem Modul „Allgemeine Degradation“ bei wenigen Proben zu Änderungen von zwei Zustandsklassen (Abb.15).

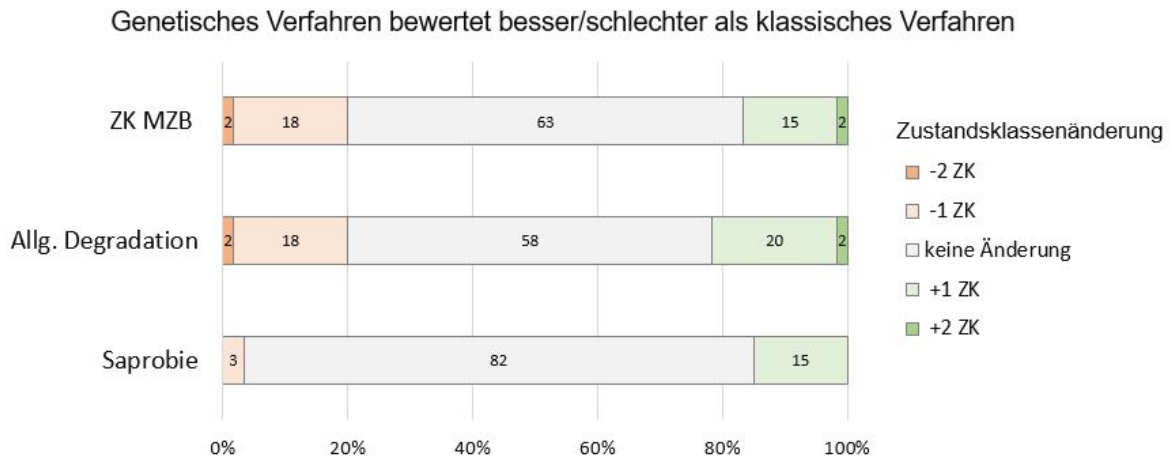


Abbildung 15: Darstellung der Zustandsklassenänderungen, die sich durch den Ersatz des klassischen Bewertungsverfahrens (morphologisch bestimmte Befunde mit Abundanzen) durch genetische Verfahren (genetisch erstellte Taxaliste mit An-/Abwesenheitsdaten) für die BQK Makrozoobenthos und die Teilmodule „Allgemeine Degradation“ und „Saprobie“ ergeben. In den Säulen sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Ergebnisse dargestellt.

## 4. Fazit und Ausblick

---

Diese Studie hat gezeigt, dass genetische Verfahren das Potential haben, das klassische Verfahren basierend auf morphologischer Bestimmung für die biologische Qualitätskomponente Makrozoobenthos zu kompletieren bzw. zu ergänzen. Dies wird durch die wesentlich höher genetisch detektierte Artauflösung für einige morphologisch schwer bestimmbare Artgruppen, die hoch signifikanten Korrelationen der Bewertungsergebnisse und die mehrheitlich übereinstimmenden Zustandsklassenergebnisse deutlich. Dennoch hat diese Studie auch gezeigt, dass genetische Verfahren das klassische Verfahren aufgrund deutlicher Abweichungen in den Taxalisten gegenwärtig nicht ersetzen können. Diese Abweichungen basieren auf einigen methodischen Schwächen der genetischen Verfahren, die zukünftig adressiert werden sollten, um die genetische Wiederfindung der Taxa in den Proben weiter zu verbessern. Ein für den Erfolg der Artwiederfindung essentieller und kritischer Arbeitsschritt ist die DNA-Konservierung. Die Voraussetzung für die Generierung einer belastbaren und vergleichbaren Datengrundlage ist eine optimierte Probenahme und DNA-Konservierung (Verhältnis Probe zu Ethanol mindestens 1:3), die durch ein standardisiertes Protokoll sichergestellt werden sollte. Um möglichst das gesamte Taxaspektrum der Probe genetisch abbilden zu können, muss die Wahl der entsprechenden Markergene und der Primer an die zu detektierenden Organismengruppen spezifisch angepasst werden (Elbrecht & Leese 2017). Eventuell wäre die Verwendung von ribosomalen Genmarkern, z.B. 18s rRNA oder 16s rRNA, eine Lösung, um auch die relevanten Taxagruppe Turbellaria und weitere wichtige Indikatorarten der Mollusca und Annelida künftig genetisch abbilden zu können (Carranza et al. 1996, Clarke et al 2014, Elbrecht et al. 2016, Flynn et al. 2015). Zudem könnten mehrere Primer-Sets verwendet werden, um die Abbildung der Biodiversität in den biologischen Proben mittels Metabarcoding weiter zu verbessern (Gibson et al. 2014, Hajibabaei et al. 2019). Bei einigen hybridisierenden Arten besteht jedoch generell das Problem, dass diese molekularbiologisch nur schwer von anderen Arten abgrenzbar sind, so dass es für diese Arten schwierig ist, spezifische Marker zu finden (Greyer et al. 2018). Ein wesentlicher Nachteil der Methode des OTU Clusterings besteht darin, dass der standardgemäß verwendete Unähnlichkeitsschwellenwert von 3 % für die Abgrenzung eines OTUs nicht für alle Taxagruppen geeignet ist und OTUs nicht direkt vergleichbar zwischen unterschiedlichen Proben sind (Callahan et al. 2017). Bei Anwendung unterschiedlicher Clustering-Algorithmen können die Ergebnisse stark voneinander abweichen (Flynn 2015). Im Kontext einer potentiellen Integration in ein europaweit möglichst einheitliches Monitoring verdeutlicht dies die Notwendigkeit einer Standardisierung der bioinformatischen Prozessierung. Zukünftig könnten eventuell sogenannte ASVs (amplicon sequence variants) eingesetzt werden, die im Vergleich zu OTUs höher aufgelöste taxonomische Informationen liefern und konsistente, reproduzierbare und vergleichbare Daten generieren (Eren et al. 2015, Callahan et al. 2016a, Callahan et al. 2017, Thompson et al. 2017). Der Vorteil von ASVs ist, dass diese von realen biologischen Sequenzen, noch vor Einführung möglicher Sequenzierfehler, abgeleitet werden und somit die biologische Realität besser repräsentieren (Callahan et al. 2017). Die Qualität der Artidentifizierung und Wiederfindung ist zudem auch von den hinterlegten Referenzen der verfügbaren Datenbanken abhängig und wird von Informationslücken und möglichen Fehlerquellen beeinträchtigt. Strikte Standards sowie regelmäßige Aktualisierungen und Qualitätskontrollen sollten eine hohe Qualität der Referenzdatenbank sicherstellen (Elbrecht et al. 2017). Auch die automatisierte Artzuweisung in BOLD erwies sich bei genetisch sehr ähnlichen Arten als nicht optimal, so dass eine Überprüfung durch einen Fachexperten für eine korrekte Artzuweisung bislang noch erforderlich ist. Die Integration von regionalen Verbreitungsmustern der Taxa in die automatisierte taxonomische Zuordnung könnte die taxonomische Zuordnung von genetisch sehr ähnlichen Taxa verbessern. Zudem muss auf die Verwendung einer einheitlichen und aktualisierten Taxonomie zwischen den Verfahren geachtet werden, um die genetische Befundliste mit möglichst geringem Arbeitsaufwand für das Bewertungsverfahren nutzen zu können. Ein grundsätzliches Problem genetischer Analysen besteht darin, dass

keine belastbaren Informationen zu ökologisch relevanten Abundanzen der Taxa abgeleitet werden können. Allerdings konnten positive Korrelationen zwischen der Anzahl der „reads“ und der Biomasse belegt werden (Elbrecht & Leese 2015, Hänfling et al. 2016, Elbrecht et al. 2017, Bista et al. 2018). Analog zu anderen Studien (Wright & Winterborn 2003, Beentjes et al. 2018, Aylagas et al. 2014) konnte jedoch auch in dieser Studie gezeigt werden, dass Zustandsbewertungen basierend auf An- und Abwesenheitsdaten mit den herkömmlichen Bewertungen mittels Abundanzen generell vergleichbar sind. Die Verfahrensänderungen haben sich in dieser Studie unterschiedlich auf die MZB Teilmodule ausgewirkt, wobei sich auch Unterschiede in den Bewertungsergebnissen zwischen den jeweiligen Fließgewässertypen ergeben können (Buchner et al. 2019). Um ein möglichst genaues und differenziertes Bild der Konsequenzen der Verfahrensänderung auf die Bewertungsergebnisse zu erhalten, sollten daher weitere, fließgewässertypspezifische Analysen der Teilmodule durchgeführt werden. Der Informationsgewinn durch genetische Verfahren in Form einer höheren Artauflösung ist für die Gewässerbewertung nur im Zusammenhang mit entsprechenden autökologischen Informationen nutzbar. Daher ist die Ermittlung von autökologischen Informationen und möglicher Indikatorpotentiale der genetisch detektierten Taxa sowie entsprechende Anpassungen in den Taxalisten (Gewässerorganismen Deutschlands und operationelle Taxaliste) notwendig. Eine enge Verzahnung mit bereits existierenden Datenbanken zu ökologischen Angaben der Taxa (z.B. [freshwaterecology.info](http://freshwaterecology.info)) wäre dabei von Vorteil (Schmidt-Kloiber & Hering 2015). Für die Integration genetischer Verfahren in das bestehende Bewertungsverfahren bedarf es einigen Anpassungen oder der Entwicklung neuer Bewertungsansätze (z.B. Anpassung der Sicherungskriterien, Ableitung neuer Metrics und Indizes, Strategie zum Umgang mit fehlenden Abundanzen) die entsprechend validiert, plausibilisiert und kalibriert werden müssen (Buchner et al. 2019, Mondy et al. 2012). Zudem sollte die Praxistauglichkeit genetischer Verfahren auch für die anderen bewertungsrelevanten biologischen Qualitätskomponenten (Fische, Makrophyten & Phytobenthos, Phytoplankton) überprüft werden. Neben der Entwicklung von validierten, standardisierten Protokollen und der Optimierung der molekularbiologischen Verfahren und Referenzdatenbanken spielen zudem Kosten und die Infrastruktur eine große Rolle für die Anwendbarkeit genetischer Verfahren im behördlichen Umfeld. Aufgrund der hohen Aktualität der genetischen Verfahren gibt es mittlerweile eine Vielzahl an unterschiedlichen Studien, die sich mit genetischen Verfahren im Bereich Fließgewässerbewertung und deren Praxistauglichkeit im behördlichen Kontext auseinandersetzen (z.B. Eco-AlpsWater, GeDNA-Projekt). So ist beispielsweise bereits eine Software in Entwicklung, die es ermöglicht, Metabarcoding-Daten auch ohne bioinformatische Kenntnisse schnell und reproduzierbar zu analysieren und zu visualisieren (Macher et al. 2021, [www.github.com/TillMacher/TaxonTableTools](https://www.github.com/TillMacher/TaxonTableTools)). Eine gute Vernetzung, Transparenz und ein steter Informationsaustausch zwischen Wissenschaftlern und Behörden ist eine wichtige Basis für eine optimale Weiterentwicklung der genetischen Verfahren im Kontext einer möglichen Integration in das biologische Bewertungsverfahren (Beispiel: [www.dnaqua.net](http://www.dnaqua.net)).



## Literaturverzeichnis

- Aylagas E., Borja A., Rodriguez-Ezpeleta N. (2014). Environmental status assessment using DNA metabarcoding: towards a genetics based Marine Biotic Index (gAMBI). *PLoS One*. 2014; 9: e90529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090529> PMID: 24603433.
- Bachy C., Dolan J. R., Lopez-Garcia P., Deschamps P., Moreira D. (2013). Accuracy of protist diversity assessments: morphology compared with cloning and direct pyrosequencing of 18S rRNA genes and ITS regions using the conspicuous tintinnid ciliates as a case study. *ISME J*. 7:244–255.
- Beentjes K.K., Speksnijder A.G.C.L., Schilthuisen M., Schaub B.E.M., van der Hoorn B.B. (2018). The influence of macroinvertebrate abundance on the assessment of freshwater quality in The Netherlands. *Metabarcoding Metagenomics*. 2018; 2. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.26744>.
- Beermann A.J., Zizka V.M.A., Elbrecht V., Baranov V., Leese F. (2018). DNA metabarcoding reveals the complex and hidden responses of chironomids to multiple stressors. *Environ Sci Eur.*, 30. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0157-x>.
- Behnke A., Engel M., Christen R., Nebel M., Klein R. R., Stoeck T. (2011). Depicting more accurate pictures of protistan community complexity using pyrosequencing of hypervariable SSU rRNA gene regions. *Environ. Microbiol.*13:340–349.
- Bista I., Carvalho G., Tang M., Walsh K., Zhou X., Hajibabaei M., et al. (2018). Performance of amplicon and shotgun sequencing for accurate biomass estimation in invertebrate community samples. *Mol Ecol Resour.* 2018; online early. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12888> PMID: 29667329.
- Buchner D., Beermann A.J., Laini A., Rolaufts P., Vitecek S., Hering D., Leese F. (2019). Analysis of 13,312 benthic invertebrate samples from German streams reveals minor deviations in ecological status class between abundance and presence/absence data. *PLoS One*. 2019; 14(12): e0226547. doi: 10.1371/journal.pone.0226547.
- Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J., Holmes S.P. (2016a). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13: 581–583.
- Callahan B., McMurdie P., Holmes S. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J* 11, 2639–2643 (2017). <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>.
- Carranza S., Giribet G., Ribera C., Baguña, Riutort M. (1996). Evidence that two types of 18S rDNA coexist in the genome of *Dugesia (Schmidtea) mediterranea* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). *Molecular Biology and Evolution*, Volume 13, Issue 6, July 1996, Pages 824–832, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025643>.
- Clarke L.J., Soubrier J., Weyrich L.S. (2014). Cooper A. Environmental metabarcodes for insects: in silico PCR reveals potential for taxonomic bias. *Molecular Ecology Resources*. 2014; 14: 1160–1170. pmid: 24751203.
- Darling, J.A., Mahon, A.R., 2011. From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environ. Res.* 111:978–988.
- Deagle B.E., Jarman S.N., Coissac E., Pompanon F., Taberlet P. (2014). DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biology Letters* 10 (9): 20140562–20140562. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0562>.
- Edgar R.C. (2010), Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, *Bioinformatics* 26(19) 2460–2461.
- Elbrecht V., Steinke D. (2018). Scaling up DNA metabarcoding for freshwater macrozoobenthos monitoring. *Freshwater Biology*. 64:380–387. doi: 10.1111/fwb.13220. 7.



- Elbrecht V., Leese F. (2015). Can DNA-based ecosystem assessments quantify species abundance? Testing primer bias and biomass—sequence relationships with an innovative metabarcoding protocol. *PLoS One*; 10: e0130324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130324> PMID: 26154168.
- Elbrecht V. & Leese F. (2017). Validation and development of freshwater invertebrate metabarcoding COI primers for environmental impact assessment. *Frontiers in Environmental Science*, 5, 1–11.
- Elbrecht V., Taberlet P., Dejean T., Valentini A., Usseglio-Polatera P., Beisel J.N., Coissac E., Boyer F., Leese F. (2016). Testing the potential of a ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects. *PeerJ* 4:e1966–12. DOI: 10.7717/peerj.1966.
- Elbrecht V., Peinert B., Leese F. (2017). Sorting things out: Assessing effects of unequal specimen biomass on DNA metabarcoding. *Ecology and evolution*, 7(17):6918–6926. doi:10.1002/ece3.3192.
- Elbrecht V., Vamos E. E., Steinke D. & Leese F. (2018). Estimating intraspecific genetic diversity from community DNA metabarcoding data. *PeerJ*, 6, e4644. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.3269v3Emerson>.
- Elbrecht V., Vamos E.E., Meissner K., Aroviita J., Leese F. (2017). Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods Ecol Evol.*; 8: 1265–1275. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12789>.
- Eren A.M., Morrison H.G., Lescault P.J., Reveillaud J., Vineis J.H., Sogin M.L. (2015). Minimum entropy decomposition: unsupervised oligotyping for sensitive partitioning of high-throughput marker gene sequences. *ISME J* 9: 968–979.
- Flynn J. M., Brown E. A., Chain F. J. J., MacIsaac H. J., Cristescu M. E. (2015). Toward accurate molecular identification of species in complex environmental samples: Testing the performance of sequence filtering and clustering methods. *Ecology and Evolution*, 5, 2252– 2266.
- Gibson J., Shokralla S., Porter T.M., King I., van Konyenburg S., Janzen D.H., et al. (2014). Simultaneous assessment of the macrobiome and microbiome in a bulk sample of tropical arthropods through DNA meta-systematics. *PNAS*. 2014; 111: 8007–8012. pmid: 24808136.
- Gibson, J.F., Shokralla, S., Curry, C., Baird, D.J., Monk, W.A., King, I. & Hajibabaei, M. (2015) Large-scale biomonitoring of remote and threatened ecosystems via high-throughput sequencing. *PLoS ONE*, 10, e0138432– 15.
- Greyer M., Rother A., Klung R., Frieß R., Doege A. (2018). Integrative Taxonomie mit DNA-Barcoding. Einsatzmöglichkeiten molekularbiologischer Verfahren zur Ermittlung des ökologischen Zustandes nach EG-Wasserrahmenrichtlinie: Erste Erfahrungen aus der Praxis. Bericht 2018. Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, Freistaat Sachsen.
- Haase P, Sundermann A. (2004). Standardisierung der Erfassungs- und Auswertungsmethoden von Makrozoobenthos-untersuchungen in Fließgewässern. Abschlussbericht 2. Projektjahr. Forschungsinstitut Senckenberg.
- Haase P., Pauls S.U., Schindehütte K., Sundermann A. (2010). First audit of macroinvertebrate samples from an EU Water Framework Directive monitoring program: human error greatly lowers precision of assessment results. *J North Am Benthol Soc.* 2010; 29: 1279–1291.
- Hajibabaei M., Porter T.M., Wright M., Rudar J. (2019). COI metabarcoding primer choice affects richness and recovery of indicator taxa in freshwater systems. *PLOS ONE* 14(9): e0220953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220953>.

- Hajibabaei M., Shokralla S., Zhou X., Singer G.A.C., Baird D.J. (2011). Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos. *PLOS ONE*. 2011; 6: e17497. pmid: 21533287.
- Hänfling B., Handley .L.L., Read D.S., Hahn C., Li J.L., Nichols P. et al. (2016). Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Mol Ecol*. 2016; 25: 3101–3119. <https://doi.org/10.1111/mec.13660> PMID: 27095076.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., de Waard J.R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 2003; 270: S96–S99.
- Jones F.C. (2008). Taxonomic sufficiency: The influence of taxonomic resolution on freshwater bioassessments using benthic macroinvertebrates. *Environ Rev*. 2008; 16: 45–69.
- Konstantinidis K. T., Tiedje J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2005, 102: 2567–2572.
- Kunin V., Engelbrekton A., Ochman H., Hugenholtz P. (2010). Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ. Microbiol*. 12:118–123.
- Leese F., Altermatt F., Bouchez A. et al. (2016). DNAqua-Net: developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Research Ideas and Outcomes*, 2, e11321.
- Macher J.N., Salis R.K., Blakemore K.S., Tollrian R. (2016) Multiple-stressor effects on stream invertebrates: DNA barcoding reveals contrasting responses of cryptic mayfly species. *Ecological Indicators*, 61, 159– 169.
- Macher, T.-H., Beermann, A. J., & Leese, F. (2021). TaxonTableTools—A comprehensive, platform-independent graphical user interface software to explore and visualise DNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources*. doi: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13358>
- Martin M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 17(1):10-12. doi: 10.14806/ej.17.1.200.
- Mondy C.P., Villeneuve B., Archaimbault V. & Usseglio-Polatera P.(2012). A new macroinvertebrate-based multimetric index (I 2 M 2) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: a taxonomical and trait approach. *Ecological Indicators*, 18, 452–467.
- Piñol J., Mir G., Gomez-Polo P., Agusti N. (2014). Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1–12.
- Pawlowski J., Kelly-Quinn M., Altermatt F. *et al.* (2018). The future of biotic indices in the ecogenomic era: integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.*, 637–638 (2018), pp. 1295-1310.
- Polz M.F., Cavanaugh C.M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and environmental Microbiology*. 1998; 64: 3724–3730. pmid:9758791.
- Sanger F., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Coulson A. R., Fiddes C. A., Hutchison C. A., Slocombe P. M., Smith M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265(1977), S. 687-695.
- Schmidt-Kloiber, A. & Hering, D. (2015) [www.freshwaterecology.info](http://www.freshwaterecology.info) – An online tool that unifies, standardises and codifies more than 20,000 European freshwater organisms and their ecological preferences. *Ecological Indicators*, 53, 271–282.
- Sharma P., Kobayashi T. (2014). Are “universal” DNA primers really universal? *Journal of Applied Genetics* 55 (4): 485-496.

- Shaw J.L.A., Clarke L.J., Wedderburn S.D., Barnes T.C., Weyrich L.S., Cooper A. (2016). Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biol. Conserv.*, 197 (2016), pp. 131-138, 10.1016/j.biocon.2016.03.010.
- Stein E.D., Martinez M.C., Stiles S., Miller P.E., Zakharov E.V. (2014). Is DNA Barcoding Actually Cheaper and Faster than Traditional Morphological Methods: Results from a Survey of Freshwater Bioassessment Efforts in the United States? Casiraghi M, editor. *PLoS ONE*; 9: e95525. pmid: 24755838.
- Stoeckle M.Y., Soboleva L., Charlop-Powers Z. (2017). Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary. *PLoS One*, 12 (2017), 10.1371/journal.pone.0175186.
- Suzuki M.T., Giovannoni S.J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and environmental microbiology*. 1996; 62: 625–630. pmid: 8593063.
- Sweeney B.W., Battle J.M., Jackson J.K., Dapkey T. (2011). Can DNA barcodes of stream macroinvertebrates improve descriptions of community structure and water quality? *Journal of the North American Benthological Society*, 30, 195–216.
- Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Brochmann C., Willerslev E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular ecology*. 2012; 21: 2045–2050. pmid:22486824.
- Thompson L., Sanders J., McDonald D. et al. (2017). A communal catalogue reveals Earth’s multiscale microbial diversity. *Nature* 551, 457–463 (2017). <https://doi.org/10.1038/nature24621>.
- Valentini A., Taberlet P., Miaud C., Civade R., Herder J., Thomsen P.F., Bellemain E., Besnard A., Coissac E., Boyer F., Gaboriaud C., Jean P., Poulet N., Roset N., Copp G.H., Geniez P., Pont D., Argillier C., Baudoin J.M., Peroux T., Crivelli A.J., Olivier A., Acqueberge M., Le Brun M., Møller P.R., Willerslev E., Dejean T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.*, 25 (2016), pp. 929-942, 10.1111/mec.13428.
- Vamos E., Elbrecht V., Leese F. (2017). Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics* 1, e14625. doi:10.3897/mbmg.1.14625.
- Vivien R., Wyler S., Lafont M., Pawlowski J. (2015). Molecular barcoding of aquatic oligochaetes: implications for biomonitoring. *PloS One*.10: e0125485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125485> PMID: 25856230.
- Wright-Stow A.E., Winterbourn M.J. (2003). How well do New Zealand’s stream-monitoring indicators, the macroinvertebrate community index and its quantitative variant, correspond? *N Z J Mar Freshw Res.* 2003; 37: 461–470. <https://doi.org/10.1080/00288330.2003.9517180>.
- Yuan Lu Y. S., Wesley Warren and Ronald Walter (2016). Next Generation Sequencing in Aquatic Models, Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges. Available from: <https://www.intechopen.com/books/next-generation-sequencing-advances-applications-and-challenges/next-generation-sequencing-in-aquatic-models> (abgerufen am 14.05.2020).

#### Internetquellen:

National Center for Biotechnology Information (NCBI):  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, aufgerufen am 13.06.2020.

Referenz-Barcode Datenbank Barcode of Life (BOLD):  
<http://boldsystems.org/>, aufgerufen am 13.06.2020.

German Barcode of Life (GBOL):  
<https://www.bolgermany.de/gbol1/>, aufgerufen am 13.06.2020.

Freshwaterecology:

[freshwaterecology.info](http://freshwaterecology.info), aufgerufen am 12.08.2020

Eco-AlpsWater:

[https://www.lfu.bayern.de/wasser/eco\\_alpswater/index.htm](https://www.lfu.bayern.de/wasser/eco_alpswater/index.htm), aufgerufen am 20.07.2020.

GedNA Projekt:

<https://gednaprojekt.wordpress.com/>, aufgerufen am 20.07.2020.

TaxonTableTools:

<https://github.com/TillMacher/TaxonTableTools>, aufgerufen am 03.01.2021.

DNAqua-Net:

<https://dnaqua.net>, aufgerufen am 05.12.2020.