

Identifizierung von Amphibien und Fischen in aquatischen Systemen anhand von eDNA

Anne Findeisen, Patricia Holm & Richard Pabst

1. Einleitung

Die Detektion von verschiedenen aquatischen Arten, insbesondere von gesetzlich geschützten Spezies, kann sich oftmals schwierig gestalten. Wird die Anwesenheit solcher Arten zu spät bemerkt, kann das im Rahmen von Bauprojekten für Verzögerungen sorgen oder sogar die vollständige Einstellung der Vorhaben bewirken. Dass sich die Überprüfung von manchen Arten problematisch gestaltet, kann verschiedene Gründe haben: zum einen können die gesuchten Arten selten sein, eine versteckte Lebensweise führen, morphologisch kaum von verwandten Arten zu unterscheiden sein oder es sind zum Zeitpunkt der Überprüfung nur schwer zu identifizierende Lebensstadien wie Eier oder Larven vorhanden. Daher hat sich das Team um Anne Findeisen, Patricia Holm und Richard Pabst in dem Gründungsprojekt IdentMe mit der Lösung dieser Probleme beschäftigt (Abb. 1). Das Gründungsprojekt mit dem Ziel der Entwicklung von molekularbiologischen Testverfahren zur Identifizierung von bestimmten Arten konnte von 2018 bis 2020 mithilfe einer Förderung durch den Europäischen Fonds für regionale Entwicklung und das Land Sachsen-Anhalt an der Hochschule Anhalt realisiert werden.



Abb. 1: Das Team IdentMe bei der Probenahme. Foto: A. Bindseil.

2. Lösungsansatz

Unter Verwendung von verschiedenen Labormethoden können die zu Beginn beschriebenen Probleme gelöst werden, indem mithilfe einer kleinen Wasserprobe die gesuchten Arten detektiert und eindeutig bestimmt werden können.

2.1. Molekularbiologische Analyse

Bei diesem Verfahren wird die im Wasser enthaltene eDNA (Umwelt-DNA) untersucht (Abb. 2). eDNA besteht aus dem genetischen Material, das Tiere und Pflanzen konstant durch z.B. Hautzellen, Schleimzellen, Ausscheidungen oder auch bei der Fortpflanzung an ihre Umgebung abgeben (HARPER et al. 2019). Die eDNA wird aus den Wasserproben extrahiert und anschließend mithilfe verschiedener Geräte und molekularbiologischer Methoden im Labor analysiert (FINDEISEN et al. 2020). Solche Methoden sind z.B. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Diese Methode ermöglicht das gezielte Suchen und Finden von spezifischen DNA-Stücken in der Probe. Während die PCR abläuft, werden die gesuchten DNA-Stücke vervielfältigt, damit sie in ausreichender Menge vorhanden sind, um nachgewiesen werden zu können. Zum Schluss können diese DNA-Stücke eindeutig bestimmten Arten zugeordnet werden, sodass Aussagen über die An- oder Abwesenheit der gesuchten Art in dem jeweiligen Gewässer getroffen werden können.

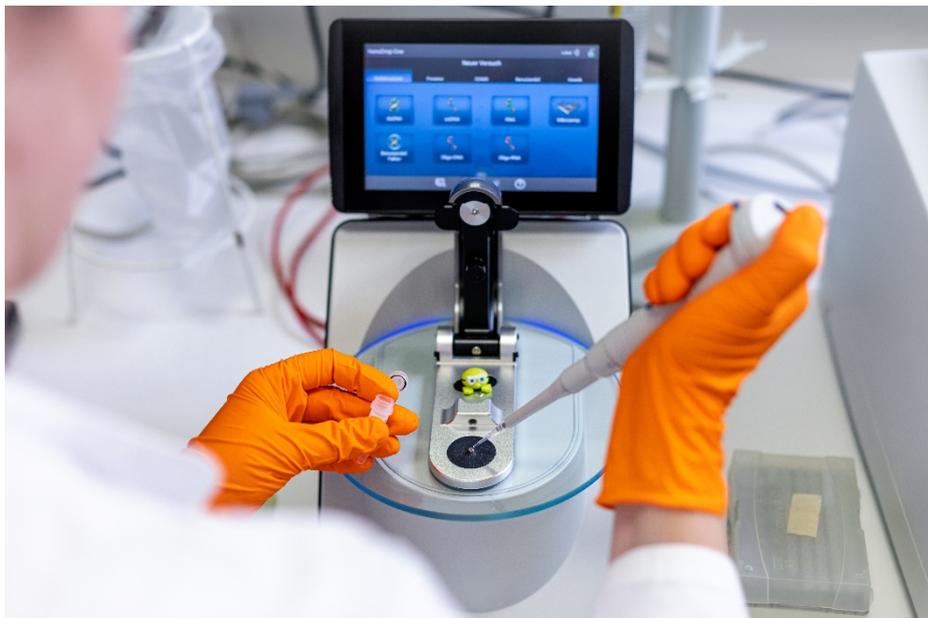


Abb. 2: DNA-Analyse im Labor. Foto: PMU Photography, P. Mundil.

2.2. Probenahme

Für eine verlässliche Artenidentifizierung ist die korrekte Entnahme der Umweltproben von Bedeutung. Das Team IdentMe hat für die Entnahme von Wasserproben ein spezielles Probenahme-kit zusammengestellt und im Rahmen des Gründungsprojektes mit verschiedenen Pilotkunden wie Naturschutzverbänden, Planungsbüros und einem Umweltamt getestet und optimiert. Das Kit besteht aus verschiedenen Komponenten wie z.B. Handschuhen für eine saubere Probenentnahme, einer Schöpfkelle für das Sammeln des Wassers, einem Probenahmebeutel sowie einer Spritze, einem Filter und einer Konservierungslösung. Damit der Artbestand vollständig abgebildet werden kann, werden die Wasserproben, je nach Größe und

Zugänglichkeit, in möglichst gleichen Abständen rund um das Gewässer herum entnommen (FINDEISEN et al. 2020). Die Wasserproben werden im Probenahmebeutel gesammelt und gut durchmischt. Danach wird das Wasser filtriert und die darin enthaltene eDNA sowie Zellen bzw. Zellbruchstück in einem speziellen Filter gebunden. Zum Schluss wird die so gewonnene eDNA durch Zugabe einer Konservierungslösung vor enzymatischem Abbau geschützt und der Filter ins Labor transportiert.

3. Artenportfolio

Im Rahmen des Gründungsprojektes konnten Verfahren zum Nachweis von verschiedenen Arten entwickelt und validiert werden. Hierfür wurden die meisten Tests eigenständig designt oder alternativ Daten aus der Literatur entnommen. Nach der Überprüfung am Computer wurden die einzelnen Methoden anschließend mit genetischen Proben der entsprechenden Arten im Labor getestet und optimiert (Abb. 3). Die Referenz-DNA für diese Tests wurde von Fachleuten zur Verfügung gestellt. Zum Schluss wurden die Tests im Freiland unter Verwendung von Umweltproben validiert. Das Portfolio von IdentMe beinhaltet bisher verschiedene geschützte Arten der Fauna-Flora-Habitatrichtlinie (FFH) wie z.B. Nördlicher Kammolch, Knoblauchkröte, Kreuzkröte, Springfrosch, Laubfrosch, Rotbauchunke und Moorfrosch. Aber auch zu anderen Gruppen gehörende Arten wie Fischotter, Schlammpeitzger und Medizinischer Blutegel kann das Team IdentMe anhand von eDNA nachweisen. Des Weiteren sind auch äußerst relevante Krankheitserreger wie der Salamanderfresser und der Chytridpilz Teil des Nachweisrepertoires. Testverfahren für alle heimischen sowie invasiven Flusskrebsarten und der für diese Artengruppe relevante Krankheitserreger der Krebspest befinden sich derzeit in der Entwicklung.



Abb. 3: Ergebnisauswertung im Labor. Foto: PMU Photography, P. Mundil.

4. Chancen und Risiken

Der größte Vorteil der eDNA-Analyse liegt darin, dass bestimmte gesuchte Tier- oder Pflanzenarten ohne einen direkten Fund schnell und eindeutig detektiert werden können. D.h. der molekularbiologische Nachweis ist unabhängig von einem visuellen Nachweis und nicht invasiv für die zu untersuchenden Lebensräume oder ihre Bewohner (HARPER et al. 2019). Außerdem ist der Artennachweis durch eDNA-Analyse unabhängig von der Tageszeit und den Witterungsverhältnissen und kann mit einer einzigen Begehung des Untersuchungsraumes realisiert werden. Überdies ist der spezifische Artennachweis besonders sensitiv, kann also auch geringste DNA-Mengen eindeutig detektieren, z.B. wenn nur wenige Individuen vorhanden sind. Nach den experimentellen Ergebnissen von IdentMe sind Nachweisgrenzen erreichbar, wofür das Vorhandensein von einer einzigen Zelle des gesuchten Zielorganismus in der Probe ausreichend ist, um diesen korrekt nachweisen zu können. Daher ist diese Methode besonders für die Überprüfung von seltenen oder schwierig zu identifizierenden Arten geeignet. Darüber hinaus bietet sie sich aber auch sehr gut für den Nachweis von invasiven Arten und Krankheitserregern in frühen Stadien an, um rechtzeitig Gegenmaßnahmen einleiten zu können (DEJEAN et al. 2012; GOLDBERG et al. 2013).

Wie jedes menschlich gesteuerte Verfahren bietet auch die eDNA-Analyse nicht nur Chancen, sondern auch Risiken. Während der Probenahme sowie der Bearbeitung der Proben im Labor können Kreuzkontaminationen oder DNA-Verschleppungen auftreten. Daher gibt es im Probenahmeprotokoll entsprechende Vorschriften zur Vermeidung solcher Komplikationen und auch im Labor werden verschiedene Kontrollen in allen Stufen des Analyseprozesses mitgeführt, sodass Kontaminationen erkannt und zurückverfolgt werden können. Bei der Entnahme der Wasserproben sollte beachtet werden, dass sich eDNA nicht unbedingt gleichmäßig im Gewässer verteilt. Zwar ist eine sehr geringe DNA-Menge für die richtige Identifizierung ausreichend, aber trotzdem sollten die Proben möglichst gleichmäßig um das Gewässer herum entnommen werden. Da das aufgrund von landschaftlichen Gegebenheiten und limitierter Zugänglichkeit der Gewässer oftmals nicht uneingeschränkt möglich ist, sollte das fehlende Wasservolumen an anderen Stellen entnommen werden, die als Habitate für die gesuchten Arten besonders geeignet sein könnten. Das können z.B. krautige Ansammlungen für bestimmte Amphibien sein. Abhängig von mehreren biotischen und abiotischen Faktoren ist eDNA zwischen wenigen Tagen und mehreren Wochen in wässriger Umgebung detektierbar, bevor sie abgebaut wird (DEJEAN et al. 2011; BARNES et al. 2014). Dadurch wird eine Momentaufnahme der im Gewässer tatsächlich vorhandenen Spezies ermöglicht. Teilweise wird eDNA aber auch im Sediment konserviert, weshalb die Aufwirbelung des Gewässerbodens bei der Probenahme vermieden werden sollte, um nicht unbeabsichtigt historische eDNA in die Probe mit aufzunehmen. Mithilfe des molekularbiologischen Nachweises können zwar ansonsten schwierig

zu identifizierende Spezies einwandfrei nachgewiesen werden, allerdings kann das Verfahren bisher noch keine Metainformationen z.B. über Vitalität, Alters- oder Geschlechterverteilung liefern.

5. Zusammenfassung

Die eDNA-Analytik stellt ein hilfreiches Instrument dar, um zeitsparend eindeutige Daten über das Vorhandensein der gesuchten Arten zu gewinnen (HARPER et al. 2019). Unabhängig von den vielen Vorteilen, die die eDNA-Analyse liefert, muss die Auswertung der Ergebnisse trotzdem stets kritisch und – wie bei allen Untersuchungen – unter Abschätzung der Vertrauenswürdigkeit der Resultate erfolgen. Nichtsdestotrotz können unter Beachtung der Grenzen der Methode, der genannten Empfehlungen und der Einhaltung maximaler Sterilität sichere und verlässliche Daten über das Vorkommen von Arten generiert werden, die mit herkömmlichen Methoden nur schwierig zu detektieren wären. Durch die Flexibilität des molekularbiologischen Verfahrens können eDNA-Tests, in Abhängigkeit des Probenmaterials, auch für viele weitere Artengruppen und Spezies entwickelt werden. Neben dem gezielten Artennachweis mithilfe diagnostischer PCR hat sich in den letzten Jahren auch die Methode des Metabarcodings für verschiedene Anwendungen etabliert. Bei diesem Verfahren können mithilfe von eDNA-Analyse und bioinformatischen Methoden ganze Artengruppen in einer Probe nachgewiesen werden. Das Metabarcoding ist daher für die Untersuchung der Biodiversität in Mischproben geeignet. Da sich der zielgerichtete Artennachweis sehr gut für die Detektion geringer DNA-Mengen eignet, hat sich das Gründungsprojekt IdentMe vorerst auf die Methode der diagnostischen PCR fokussiert, um auch seltene Arten bzw. geschützte FFH-Arten eindeutig nachweisen und identifizieren zu können. Die Etablierung des Metabarcodings soll aber in den kommenden Monaten folgen.

Literaturverzeichnis

BARNES, M. A., TURNER, C. R., JERDE, C. L., RENSHAW, M. A., CHADDERTON, W. L. & D. M. LODGE (2014): Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. – Environ. Sci. Technol., 48: 1819-1827. <https://doi.org/10.1021/es404734p>

DEJEAN, T., VALENTINI, A., DUPARC, A., PELLIER-CUIT, S., POMPANON, F., TABERLET, P. & C. MIAUD (2011): Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. – PLoS One, 6: e23398

DEJEAN, T., VALENTINI, A., MIQUEL, C., TABERLET, P., BELLEMAIN, E. & C. MIAUD (2012): Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the

example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*: Alien invasive species detection using eDNA. – J. Appl. Ecol., 49: 953–959. [https:// doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x)

FINDEISEN, A., HOLM, P. & R. PABST (2020): Wie forensische Methoden einen Beitrag zum Erhalt der Biodiversität leisten können – Gründungsprojekt IdentMe unterstützt FFH-Monitoring durch eDNA-Analyse. – *amphibia*, 19: 26-33.

GOLDBERG, C.S., SEPULVEDA, A., RAY, A., BAUMGARDT, J. & L.P.WAITS (2013): Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). – *Freshw. Sci.*, 32: 792–800. <https://doi.org/10.1899/13-046.1>

HARPER, L.R., BUXTON, A.S., REES, H.C., BRUCE, K., BRYN, R., HALFMAERTEN, D., READ, D.S., WATSON, H.V., SAYER, C.D., JONES, E.P., PRIESTLEY, V., MÄCHLER, E., MÚRRIA, C., GARCÉS-PASTOR, S., MEDUPIN, C., BURGESS, K., BENSON, G., BOONHAM, N., GRIFFITHS, R.A., LAWSON HANDLEY, L. & B. HÄNFLING (2019): Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. – *Hydrobiol.*, 826: 25–41. [https:// doi.org/10.1007/s10750-018-3750-5](https://doi.org/10.1007/s10750-018-3750-5)

Autoren



IdentMe

E-Mail: info@ident-me.com

Telefon: +49 (0) 176 9636 7183

Homepage: www.ident-me.com

Das Team IdentMe steht für Fragen, Anregungen, neue Projekte oder auch Analyseaufträge gerne per E-Mail oder auch telefonisch zur Verfügung.



EUROPÄISCHE UNION

ESF

Europäischer
Sozialfonds