

# NATUR





# DER EINSATZ VON UMWELT-DNA BEI FISCHEREIBIOLOGISCHEN ARTERFASSUNGEN

Die DNA (genetische Erbinformation) von im Wasser lebenden Tieren kann aus Gewässerproben extrahiert und in Laboranalysen den jeweiligen Arten zugeordnet werden. Mit dieser neuen Methode brauchen keine Tiere gefangen und gestört zu werden. Zudem können bestimmte Tierarten nachgewiesen werden, die sich mit klassischen Methoden nur schwer fangen lassen.

In Rheinland-Pfalz wurden erstmals 2021 an insgesamt 75 Messstellen Gewässerproben genommen, die auf Nachweise von DNA von Fischen und Flusskrebsen analysiert wurden. Es gelangen neue Nachweise von exotischen Fischarten, zu Artenkomplexen und zu sehr seltenen und fischereilich schwer nachweisbaren Arten.

## Was ist Umwelt-DNA?

Die DNA von Wasserorganismen gelangt auf verschiedenen Wegen ins Gewässer, z. B. durch Schleim, Schuppen oder Zellreste. Diese Umwelt-DNA wird allgemein als eDNA bezeichnet, aus dem Englischen von „environmental DNA“. Die in einer Wasserprobe enthaltene eDNA kann anhand spezifischer molekularbiologischer Methoden vervielfacht, isoliert und dargestellt werden. Da die DNA artspezifisch ist, können die jeweiligen Arten nachgewiesen werden. In Umweltproben werden je nach Methode bestimmte Arten gezielt oder das gesamte Artenspektrum erfasst (Metabarcoding).

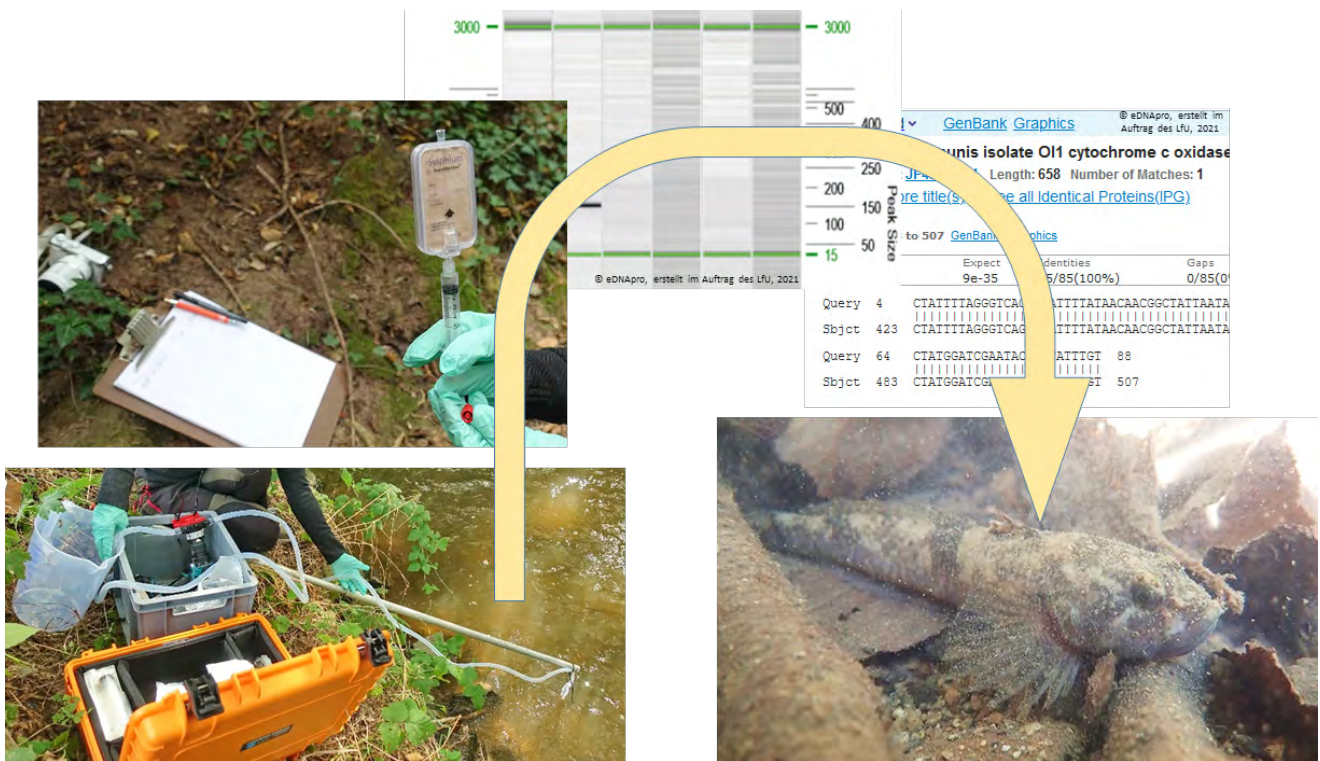
## Aufgaben und Ziele

Mit der Untersuchung wurden mehrere Ziele verfolgt und Aufgaben bedient. Ganz allgemein handelt es sich um eine neue Methode in der Umweltbeobachtung, die es gilt in der Praxis zu erproben, zu interpretieren und deren Beitrag zum zielgerichteten Einsatz, zur Ergänzung etablierter Methoden und zukünftigen Kostenersparnis zu nutzen. Im Speziellen soll die Methode dazu beitragen, das Fischartenkataster – insbesondere bei Standgewässern – zu aktualisieren, das Vorkommen von Artenkomplexen zu identifizieren, seltene Arten, Wanderfischarten und fischerei-

lich schwierig erfassbare Arten nachzuweisen, das Vorkommen und die Ausbreitungsdynamik von exotischen und hier insbesondere invasiven Arten aufzuzeigen und eine informationsbasierte Gewässerauswahl für naturschutzfachlich zu überwachende, äußerst seltene Arten zu ermöglichen. Die Beauftragung zu den Flusskrebsen erfolgte gemeinsam mit der Abteilung Naturschutz des LfU.

## Methoden im Freiland und Labor

Bis zu 10 Liter einer Wasserprobe werden vor Ort durch einen gekapselten Filter gesaugt. Der Filter hat eine Retention von 0,8 µm Porenweite und eine effektive Filterfläche von 69 cm<sup>2</sup>. In der Praxis wird das filtrierte Volumen durch die Feinpartikel-Retention im Filter limitiert. In Fließgewässern wurden einzelne Proben genommen, in Standgewässern Ufermischproben und bei tiefen Seen zusätzlich Tiefenmischproben. Unmittelbar nach Probenahme wurde das überschüssige Wasser aus dem Filter entfernt, die auf der Filtermatrix zurückgehaltene eDNA mit einem Lyse-Puffer fixiert und kühl gelagert ins Labor transportiert. Im Freiland wie auch im Labor wird ein strenges Arbeitsprotokoll umgesetzt, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.



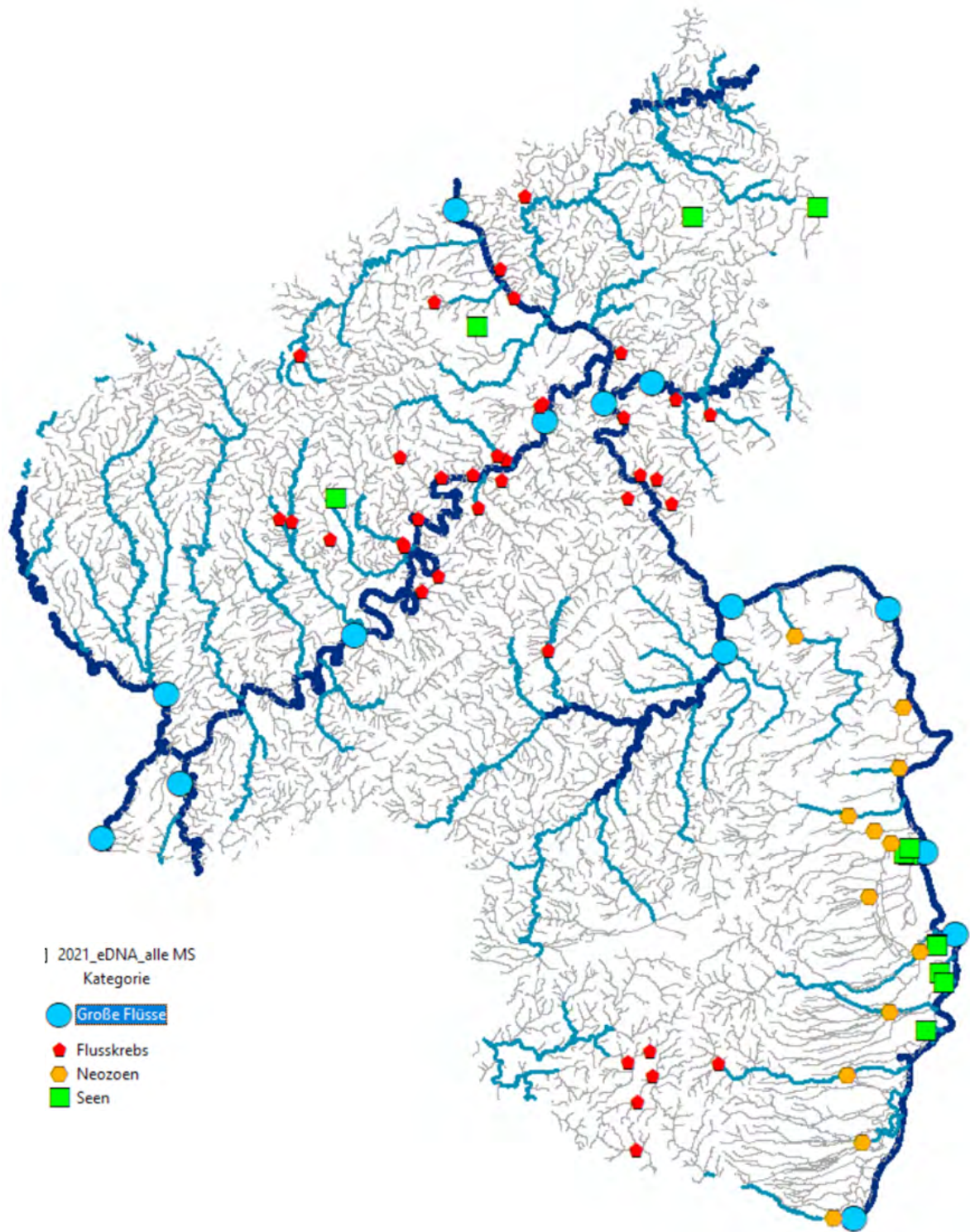
### Von der Wasserprobe über die Laboranalyse und Bioinformatik zur Artbestimmung mittels Umwelt-DNA.

Die Laboranalyse besteht aus drei – auch räumlich – getrennten Schritten:

1. DNA Extraktion (DNA wird gelöst, über Silika-Säulchen gereinigt, in hochreinem Wasser eluiert);
2. DNA Amplifikation (Einsatz von spezifischen Primern zur Vervielfältigung der gesuchten mitochondrialen DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion);
3. Sequenzierung und Gelelektrophorese (zur Bestimmung der Basenabfolgen). Es wurden dabei drei verschiedene Methoden verwendet: Sangersequenzierung nach PCR mit spezifischen Primern (für den Schlammpeitzger), qPCR mit spezifischen Primern mit Taqman-Sonde (für Flusskrebse) und Next Generation Sequencing beim Metabarcoding (für alle anderen Fischarten). Zur Qualitätsbeurteilung wurden verschiedene analytische Kenngrößen herangezogen.

Im Anschluss erfolgt die bioinformatische Datenanalyse, um die taxonomische Zusammensetzung der Umweltprobe zu ermitteln. Dabei werden die Sequenzen mit solchen aus Referenzdatenbanken abgeglichen. In diesen internationalen Datenbanken werden die Sequenzen von Arten geführt, die aus Forschungsprojekten dort hinterlegt wurden. Das ist ein noch fortlaufender Prozess, insbesondere da die evolutive Dynamik von Fischen weitaus höher ist als noch vor kurzem angenommen.

Auf genetischer Ebene werden noch neue Arten beschrieben und zudem können Fischarten produktive Hybridbestände ausbilden, die sich weiter entwickeln. In Deutschland laufen mehrere Projekte, um weitere Sequenzen von Arten qualitätsgesichert in Datenbanken hochzuladen.



Lage der für die eDNA Untersuchungen ausgewählten Messstellen mit Zuordnung zu Gewässerkategorien bzw. Zweck. © LfU auf Basis GeoBasis-DE / LVerGeoRP.



## Messstellen und Messfrequenz

Aufgrund der vorab definierten Ziele wurden die Lage jeder Messstelle und die zu analysierenden Arten spezifisch ausgewählt. Die Untersuchungs-gewässer lassen sich in große Flüsse, Standge-wässer, kleine Mittelgebirgsbäche und Flachland-bäche der Oberrheinebene unterscheiden. Die fischdurchgängigen großen Flüsse wurden im Frühjahr, Sommer und Herbst beprobt, die an-deren Gewässer einmalig im Sommer. Die klei-nen Mittelgebirgsbäche wurden spezifisch aus-gewählt, um sie auf potenzielle Vorkommen von Edelkrebs und Steinkrebs zu untersuchen. Die Bä-che der Oberrheinebene wurde ausgewählt, weil dort eine Einwanderung verschiedener Fisch- und Flusskrebsarten stattfindet. Insgesamt wurden 75 Messstellen ausgewählt.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchung lieferte detaillierte Ergebnisse zum Vorkommen der vorab definierten Zielarten in den jeweiligen Gewässern. Bei Standgewässern gelangen einige besondere Nachweise, so z. B. zum Stör, zu invasiven Grundelarten, zum Wels sowie zu Gras- und Marmorkarpfen. Hervorzuhe-ben ist, dass die eDNA Untersuchungen Hinweise zum Vorkommen von Groppenarten lieferten. Bislang wurden alle Groppen der Art *Cottus gobio* zugeordnet. Nun bestehen Hinweise, dass zudem auch die Rheingruppe (*C. rhenanus*) und ggf. die

Stachelgroppe (*C. perifretum*) in Rheinland-Pfalz vorkommen könnten. Aufgrund der hohen ge-netischen Ähnlichkeit sind hier weitere Untersu-chungen erforderlich, auch weil die Arten in mit-einander verbundenen Gewässern vorkommen können und im Übergangsbereich zur Hybridisie-rung neigen. Es gelangen in Gewässern der Ober-rheinebene neue Nachweise zum Vorkommen des Schlammpeitzgers und das dortige bisher einzige Vorkommen des Zwergstichlings in Rheinland-Pfalz wurde bestätigt.

Für den Rhein wurden Wanderfischarten und mit fischereilichen Methoden schwierig zu fan-gende Arten nachgewiesen, wie Meerneunauge, Schnäpel, Lachs, Zobel, Steinbeißer und Weißflos-sengründling. Es wurden nordamerikanische und afrikanische Welsarten nachgewiesen, von denen sich der Schwarze Katzenwels in Mosel und Saar wahrscheinlich etabliert hat. Die geschützten einheimischen Flusskrebse konnten jedoch kaum nachgewiesen werden. Aus den 26 für den Stein-krebs und 24 für den Edelkrebs ausgewählten Bä-chen gelangen nur 3 bzw. 5 positive Nachweise, wobei der Nachweis von Flusskrebsen bei gerin-gen Bestandsdichten grundsätzlich schwierig ist.

Der Einsatz einer neuen und innovativen Methode, wie der Analyse der Umwelt-DNA, unterstützt das bisherige Monitoring gewinnbringend, um über das Vorkommen bedrohter Tierarten, das Vordringen exotischer, invasiver Arten und über die grundlegende Benennung von Arten aussage-fähig zu bleiben.



Eine Wanderfischart, die nach Rheinland-Pfalz zurückkehrt: der Lachs.