

TEXTE

135/2026

**Abschlussbericht**

# **Umweltprobenbank des Bundes: Untersuchung der biologischen Vielfalt mit der Umweltprobenbank**

**Das TrendDNA-Projekt**

**von:**

Florian Leese, Arne J. Beermann, Robin Schütz

Universität Duisburg-Essen, Essen

Henrik Krehenwinkel, Marie Brasseur, Nico Fuhrmann, Julian Hans, Isabelle Junk, Susan Kennedy

Universität Trier, Trier

Miklos Bálint, Steffen Pauls, Markus Pfenninger, María Esther Nieto Blázquez

Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, Frankfurt am Main

Cecilia Andrea Díaz Navarette, Elke Eilebrecht

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Schmallenberg

**Herausgeber:**

Umweltbundesamt



TEXTE 135/2026

Projektnummer 153606

Abschlussbericht

# **Umweltprobenbank des Bundes: Untersuchung der biologischen Vielfalt mit der Umweltprobenbank**

Das TrendDNA-Projekt

von

Florian Leese, Arne J. Beermann, Robin Schütz  
Universität Duisburg-Essen, Essen

Henrik Krehenwinkel, Marie Brasseur, Nico Fuhrmann,  
Julian Hans, Isabelle Junk, Susan Kennedy  
Universität Trier, Trier

Miklos Bálint, Steffen Pauls, Markus Pfenninger, María  
Esther Nieto Blázquez  
Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, Frankfurt am  
Main

Cecilia Andrea Díaz Navarette, Elke Eilebrecht  
Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte  
Ökologie, Schmallenberg

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

## **Impressum**

### **Herausgeber**

Umweltbundesamt  
Wörlitzer Platz 1  
06844 Dessau-Roßlau  
Tel: +49 340-2103-0  
Fax: +49 340-2103-2285  
[buergerservice@uba.de](mailto:buergerservice@uba.de)  
Internet: [www.umweltbundesamt.de](http://www.umweltbundesamt.de)

### **Durchführung der Studie:**

Universität Duisburg-Essen  
Universitätsstr. 5  
45141 Essen

### **Abschlussdatum:**

April 2026

### **Redaktion:**

Fachgebiet II 2.4 Binnengewässer  
Jan Koschorreck

### **Lektorat:**

Dr. Martina Weiss  
Fachlektorat Plus

### **DOI:**

<https://doi.org/10.60810/openumwelt-8585>

ISSN 1862-4804

Dessau-Roßlau, August 2026

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.



### **Kurzbeschreibung: Genetische Untersuchungen zur biologischen Vielfalt mit der Umweltprobenbank**

Das TrendDNA-Projekt (2021–2025) wurde vom Umweltbundesamt (UBA) als Pilotstudie beauftragt, um das Potenzial der Umweltprobenbank des Bundes (UPB) für genetische Biodiversitätsanalysen zu untersuchen. Die UPB archiviert seit 40 Jahren biologische und abiotische Umweltproben aus Meeres-, Süßwasser- und Landökosystemen bei ultratiefen Temperaturen (unter  $-150\text{ °C}$ ), wodurch Moleküle in den Proben keinen Abbau erfahren. Dies wird für das chemische Trendmonitoring genutzt. Da DNA und RNA auch Moleküle sind, können die Proben mithilfe genetischer Verfahren analysiert werden. Das Potenzial solcher Analysen war bislang jedoch kaum systematisch untersucht worden und bildete daher den Gegenstand des TrendDNA-Projekts.

Ein multi-institutionelles Konsortium aus der Universität Duisburg-Essen, der Universität Trier, dem Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie sowie der Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung bearbeitete drei zentrale Leitfragen: Welche Probenarten der UPB eignen sich für genetische Untersuchungen? An welchen aktuellen Forschungsfragen zur biologischen Vielfalt kann die UPB mitwirken? Wie kann die UPB den behördlichen Umweltschutz mit genetischen Daten unterstützen?

Die systematische Evaluation der Probenotypen ergab, dass grundsätzlich alle archivierten Proben für genetische Analysen geeignet sind – von der Ebene der innerartlichen genetischen Diversität bis zur Ökosystemdiversität. Im Mittelpunkt der Analysen stand das Umwelt-DNA-Metabarcoding (eDNA-Metabarcoding), das für limnische, marine und terrestrische Proben erfolgreich angewendet wurde. Diese Methode erlaubt es, Zeitreihen von bis zu 30 Jahren rückblickend auf Veränderungen in Artengemeinschaften zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen deutlich nachweisbare Biodiversitätstrends: In Gewässern und an Land wurden Einwanderung und Ausbreitung invasiver Arten dokumentiert, darunter neue Muschel- und Fischarten, insbesondere zahlreiche Grundelarten, und veränderte Fischgemeinschaften in den Flüssen. Besonders auffällig war ein starker Arten-Turnover, der in vielen Ökosystemen schneller verläuft als bisher erwartet. Die Daten zur Verbreitung und Veränderung von Fischgemeinschaften erwiesen sich als hochplausibel im Vergleich zu Daten aus unabhängigen Monitoringprogrammen. Direkte Treiber der beobachteten Veränderungen konnten in vielen Fällen nicht eindeutig identifiziert werden; hier besteht weiterer Bedarf an umweltstatistischen Methoden und der Integration von Umweltdaten anderer Monitoringprogramme. Alle im Projekt generierten Datensätze sind gemäß den FAIR-Prinzipien (*Findable, Accessible, Interoperable, Reusable*) in offenen Repositorien frei verfügbar.

Das Projekt förderte ebenfalls intensiv den wissenschaftlichen Nachwuchs: 25 Nachwuchswissenschaftlerinnen und Nachwuchswissenschaftler waren beteiligt, darunter Studierende auf Bachelor- und Masterniveau, 3 Promovierende, die ihre Dissertationen auf Basis von TrendDNA-Daten abgeschlossen haben bzw. abschließen, und 3 PostDocs. Die Ergebnisse belegen das große Potenzial der Umweltprobenbank als genetisches Langzeitarchiv für ein integriertes, rückblickendes Biodiversitätsmonitoring in Deutschland und liefern wichtige Grundlagen für die behördliche Umweltbeobachtung sowie umwelt- und naturschutzrechtliche Entscheidungen. Beispiele wurden im Projekt erarbeitet und Empfehlungen diesbezüglich abgeleitet.

**Abstract: Genetic research on biological diversity with the environmental specimen bank**

The TrendDNA project (2021–2025) was commissioned by the German Federal Environment Agency (UBA) as a pilot study to assess the potential of the German Environmental Specimen Bank (ESB) for genetic biodiversity analyses. The ESB has archived biological and abiotic environmental samples from marine, freshwater, and terrestrial ecosystems for over 40 years at ultra-low temperatures (below –150 °C), preserving the molecules contained in the samples. This has been used for chemical trend monitoring. Since DNA and RNA are also molecules, the samples can additionally be analysed using genetic methods, yet this has not been performed so far in a systematic manner; and this was precisely the subject of the TrendDNA project.

A multi-institutional consortium comprising the University of Duisburg-Essen, the University of Trier, the Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, and the Senckenberg Society for Nature Research addressed three central guiding questions: Which ESB sample types are suitable for genetic analyses? Which current research questions on biodiversity can the ESB contribute to? How can the ESB support regulatory environmental protection with genetic data? The systematic evaluation of sample types showed that basically all archived samples are suitable for genetic analyses — spanning levels from intraspecific genetic diversity to ecosystem diversity. The primary analytical approach was environmental DNA (eDNA) metabarcoding, which was successfully applied to samples from freshwaters, marine and terrestrial realms. The eDNA metabarcoding method enables retrospective analyses of community change across time series of up to 30 years. The results reveal clearly detectable biodiversity trends: in aquatic and terrestrial ecosystems, the arrival and spread of invasive species were documented, including new *Dreissena* mussels and goby fish species in rivers, as well as general shifts in communities. A particular finding was a strong species turnover, which in many sample types and ecosystems proceeded faster than previously expected. Data on the distribution and change of fish communities proved highly plausible when benchmarked against independent monitoring programmes. Direct drivers of the observed changes could not be pinpointed in many cases; further development of environmental statistical methods and integration of environmental covariates is needed. All datasets generated within the project are freely available in open repositories in accordance with the FAIR principles (Findable, Accessible, Interoperable, Reusable).

The project provided strong support for early-career researchers: 25 young scientists participated, including students at bachelor's and master's level as well as 3 doctoral researchers who have completed or are completing their PhD theses based on TrendDNA data, and 3 PostDocs. The findings demonstrate the considerable potential of the Environmental Specimen Bank as a long-term genetic archive for integrated, retrospective biodiversity monitoring in Germany, and provide an important foundation for regulatory environmental surveillance and nature conservation decision-making. Concrete examples were developed within the project and corresponding recommendations were derived.

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildungsverzeichnis.....                                                                               | 11 |
| Tabellenverzeichnis .....                                                                                | 14 |
| Abkürzungsverzeichnis .....                                                                              | 15 |
| Zusammenfassung.....                                                                                     | 19 |
| Summary .....                                                                                            | 24 |
| 1 Einleitung.....                                                                                        | 28 |
| 1.1 Das TrendDNA-Projekt .....                                                                           | 28 |
| 1.1.1 Motivation des Projekts.....                                                                       | 28 |
| 1.1.2 Die Umweltprobenbank des Bundes .....                                                              | 29 |
| 1.1.3 Potenzial der Umweltprobenbank für ein Biodiversitätsmonitoring .....                              | 30 |
| 1.1.4 Ein Forschungs- und Entwicklungsprojekt zur Prüfung des Potenzials.....                            | 30 |
| 1.2 Das TrendDNA-Lösungs- und Umsetzungskonzept.....                                                     | 31 |
| 1.2.1 Arbeitspaket 1 – Auswahl geeigneter Proben und Methoden für genetische<br>Untersuchungen .....     | 31 |
| 1.2.2 Arbeitspaket 2 – Operationalisierung.....                                                          | 32 |
| 1.2.3 Arbeitspaket 3 – Untersuchung der Proben mit genetischen Methoden .....                            | 33 |
| 1.2.4 Arbeitspaket 4 – Fallstudien zur Veränderung der Biodiversität über die Zeit .....                 | 33 |
| 1.2.5 Arbeitspaket 5 – Effiziente Verwertung der Daten für Umwelt- und Naturschutz .....                 | 33 |
| 1.2.6 Arbeitspaket 6 – Informieren der Allgemeinheit und der Fachöffentlichkeit: .....                   | 33 |
| 2 Auswahl geeigneter Methoden und Proben für genetische Untersuchungen mit der<br>Umweltprobenbank ..... | 34 |
| 2.1 Identifizierte Methoden für die Untersuchung der Biodiversität aus den Proben.....                   | 34 |
| 2.1.1 DNA-Metabarcoding .....                                                                            | 34 |
| 2.1.2 Metagenomik.....                                                                                   | 35 |
| 2.1.3 Genomsequenzierung und Populationsgenomik.....                                                     | 37 |
| 2.1.4 Transkriptomik .....                                                                               | 38 |
| 2.2 Geeignete Probenarten für molekulare Biodiversitätsanalysen.....                                     | 39 |
| 2.3 Datenmanagement .....                                                                                | 44 |
| 3 Operationalisierung.....                                                                               | 46 |
| 3.1 Sicherstellung der Probenreinheit .....                                                              | 46 |
| 3.1.1 Untersuchung potenzieller Kontaminationen während Probenahme und -<br>prozessierung.....           | 46 |

|       |                                                                                                                                            |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.2 | Untersuchung potenzieller Kontaminationen in UPB-Proben durch Nutzung der Kryomühle.....                                                   | 47 |
| 3.1.3 | Untersuchung zur Kombination von eDNA- und regulären UPB-Probenahmen .....                                                                 | 47 |
| 3.1.4 | Untersuchung der taxonomischen Reinheit verschiedener Probenarten .....                                                                    | 47 |
| 3.2   | Optimierung molekularer Protokolle .....                                                                                                   | 50 |
| 3.2.1 | Analyse der notwendigen Probenmenge in der DNA-Extraktion .....                                                                            | 50 |
| 3.2.2 | Analyse der notwendigen Anzahl von DNA-Extraktions- und PCR-Replikaten.....                                                                | 50 |
| 3.2.3 | PCR-Primer-Wahl .....                                                                                                                      | 54 |
| 3.2.4 | Analyse der notwendigen Sequenziertiefe .....                                                                                              | 57 |
| 3.2.5 | Test der Genauigkeit des Nachweises von Biodiversitätsmustern.....                                                                         | 58 |
| 3.2.6 | Vergleich aquatischer Nachweise in UPB-Proben im Vergleich zu Wasserproben .....                                                           | 61 |
| 3.3   | Bestimmung des Mehrwerts von Monats- vs. Jahresproben .....                                                                                | 63 |
| 3.3.1 | Schwebstoffe .....                                                                                                                         | 63 |
| 3.3.2 | Blasentang und Miesmuscheln .....                                                                                                          | 64 |
| 4     | Arbeitspaket 3 – Generation und Datenauswertung der eDNA-Zeitreibendaten .....                                                             | 67 |
| 4.1   | Biodiversität auf Ebene von Artengemeinschaften und Ökosystemen .....                                                                      | 67 |
| 4.1.1 | Miesmuscheln – marin – Metabarcoding .....                                                                                                 | 67 |
| 4.1.2 | Blasentang – marin – Metabarcoding.....                                                                                                    | 69 |
| 4.1.3 | Dreikantmuscheln – limnisch – Metabarcoding .....                                                                                          | 69 |
| 4.1.4 | Blätter von Bäumen – terrestrisch – Metabarcoding .....                                                                                    | 70 |
| 4.1.5 | Schwebstoffe – limnisch – Metabarcoding.....                                                                                               | 72 |
| 4.1.6 | Regenwurmkörper – terrestrisch – Metabarcoding .....                                                                                       | 72 |
| 4.1.7 | Regenwurmkot – terrestrisch – Metabarcoding: .....                                                                                         | 74 |
| 4.1.8 | Regenwurmkörper – terrestrisch – Kultivierung .....                                                                                        | 74 |
| 4.1.9 | Boden – terrestrisch – Metagenomik .....                                                                                                   | 75 |
| 4.2   | Biodiversität innerhalb einzelner Arten.....                                                                                               | 75 |
| 4.2.1 | Regenwürmer – terrestrisch – Populationsgenomik .....                                                                                      | 75 |
| 4.2.2 | Aalmutter – marin – Populationsgenomik.....                                                                                                | 76 |
| 4.2.3 | Aalmutter – marin – Transkriptomik .....                                                                                                   | 76 |
| 5     | Arbeitspakete 4 & 7: Fallstudien zur Entwicklung der biologischen Vielfalt inklusive optionaler Studien und Methodvalidierungsstudien..... | 79 |
| 5.1   | Struktur der Fallstudien .....                                                                                                             | 79 |
| 5.2   | eDNA-basierte Fallstudien zur Veränderung limnischer, mariner und terrestrischer Lebensgemeinschaften .....                                | 82 |
| 5.2.1 | Analyse von Biodiversitätsveränderungen in Flüssen mit Schwebstoffproben .....                                                             | 82 |

|       |                                                                                                                                |     |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.2.2 | Taxonomische Zusammensetzung und Funktion von Bodengemeinschaften:<br>raumzeitliche Veränderungen .....                        | 91  |
| 5.2.3 | Ausbreitung mariner Neozoen im Kontext vom Klimawandel .....                                                                   | 96  |
| 5.2.4 | Integrative Analyse von Biodiversitätstrends über terrestrische, limnische und<br>marine Lebensräume hinweg .....              | 100 |
| 5.3   | <i>Proof-of-Principle</i> -Studien für Einsatzfelder mit den Proben der Umweltprobenbank .....                                 | 107 |
| 5.3.1 | Analyse von Biodiversitätsveränderungen blattassoziierter Pilzgemeinschaften .....                                             | 107 |
| 5.3.2 | Internationaler Vergleich von Biodiversitätsveränderungen in blattassozierten<br>Gliederfüßergemeinschaften .....              | 111 |
| 5.3.3 | Innerartliche genetische Diversität von baumkronenassoziierten Gliederfüßern .....                                             | 116 |
| 5.4   | <i>Proof-of-Principle</i> -Fallstudien zur Veränderung innerartlicher genetischer Diversität und<br>Genexpressionsmuster ..... | 121 |
| 5.4.1 | Populationsgenomische Veränderungen der Aalmutter .....                                                                        | 121 |
| 5.4.2 | Transkriptomische Veränderungen der Aalmutter .....                                                                            | 126 |
| 6     | Arbeitspaket 5: Effiziente Verwertung der Daten für den Umwelt- und Naturschutz .....                                          | 130 |
| 6.1   | Begleitkreis .....                                                                                                             | 130 |
| 6.2   | Verwertungsoptionen .....                                                                                                      | 132 |
| 6.3   | Herausforderung und offene Fragen .....                                                                                        | 132 |
| 6.3.1 | Methodische Aspekte .....                                                                                                      | 132 |
| 6.3.2 | Konzeptionelle Aspekte .....                                                                                                   | 133 |
| 6.3.3 | Strukturelle Aspekte .....                                                                                                     | 133 |
| 7     | Arbeitspaket 6: Information der allgemeinen und Fachöffentlichkeit .....                                                       | 134 |
| 8     | Nachwuchsförderung .....                                                                                                       | 136 |
| 9     | Übersicht über produzierte genetische Datensätze .....                                                                         | 139 |
| 10    | Bibliographie .....                                                                                                            | 140 |
| A     | Anhang zum Bericht .....                                                                                                       | 156 |
| A.1   | Laborprotokolle zur DENA-Extraktion aus UPB-Proben .....                                                                       | 156 |
| A.1.1 | Protokolle nach Herstellerangaben (nicht weiter aufgeführt) .....                                                              | 156 |
| A.1.2 | TNES-Protokoll .....                                                                                                           | 156 |
| A.1.3 | TNES SPM (terrestrik) Protokoll .....                                                                                          | 157 |
| A.1.4 | IME-Protokoll .....                                                                                                            | 158 |
| A.1.5 | Inhibitor removal .....                                                                                                        | 159 |
| A.1.6 | Protokoll zur Isolation von DNA aus Schwebstoffen (UDE Fallstudie 1) .....                                                     | 159 |
| A.2   | Qualitätssicherung – Kontaminationsprüfung .....                                                                               | 164 |

|       |                                                                                                                                          |     |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| A.2.1 | Überarbeitung der aktuellen Protokolle der UPB für die<br>Reinigung/Dekontamination der Ausrüstung zwischen der Probenverarbeitung ..... | 164 |
| A.2.2 | Laboruntersuchungen zu verschiedenen Dekontaminationsstrategien.....                                                                     | 169 |
| A.2.3 | Qualitätssicherung - Kontaminationstest für eDNA in der Kryomühle.....                                                                   | 170 |
| A.2.4 | Qualitätssicherung – Kreuzkontaminationen, UPB, Projektgruppe UT .....                                                                   | 172 |
| A.3   | Hybridisierungsanalyse <i>Mytilus</i> .....                                                                                              | 182 |
| A.4   | Analyse der genetischen Diversität von <i>Lumbricus terrestris</i> .....                                                                 | 183 |
| A.5   | Schwebstoffproben – 16S-Metabarcoding-Daten .....                                                                                        | 184 |
| A.6   | Fallstudie 1: Fischdiversität in Deutschland basierend auf den SPM-Proben .....                                                          | 186 |
| A.7   | Statistische Informationen zur raumzeitlichen Verteilung der Varianz für die OTUs aus<br>Fallstudie 9 .....                              | 187 |
| A.8   | Informationen der Öffentlichkeit.....                                                                                                    | 188 |



## Abbildungsverzeichnis

|               |                                                                                                                                                                                    |    |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1:  | Der Politikzyklus zum Schutz der Biodiversität.....                                                                                                                                | 31 |
| Abbildung 2:  | Übersicht über das Lösungs- und Umsetzungskonzept .....                                                                                                                            | 32 |
| Abbildung 3:  | Schematischer Ablauf einer DNA-Metabarcoding-Analyse mit<br>Proben aus der Umweltprobenbank von Probenahme (links)<br>bis zur finalen Datenanalyse (rechts) .....                  | 35 |
| Abbildung 4:  | Schematischer Ablauf einer metagenomischen Analyse<br>unterschiedlicher Biota- und Umweltproben der<br>Umweltprobenbank.....                                                       | 36 |
| Abbildung 5:  | Schematischer Ablauf einer populationsgenomischen Analyse<br>basierend auf Biotaproben der Umweltprobenbank des Bundes<br>.....                                                    | 38 |
| Abbildung 6:  | Schematischer Ablauf einer Genexpressionsanalyse mittels<br>RNA-Sequenzierung (=Transkriptomik) .....                                                                              | 39 |
| Abbildung 7:  | Heatmap-Diagramm der DNA-Extraktionsleistung über<br>verschiedene Probentypen der UPB und Protokolle hinweg ...                                                                    | 40 |
| Abbildung 8:  | Exemplarische Übersicht der erfolgreichen RNA-Extraktion aus<br>Leberhomogenat einer Aalmutterprobe (Biotaprobe).....                                                              | 41 |
| Abbildung 9:  | Nachweis von Quaggamuscheln in den Dreikantmuschel-<br>Proben .....                                                                                                                | 49 |
| Abbildung 10: | Effekt verschiedener in der DNA-Extraktion eingesetzten<br>Homogenatmengen, sowie Isolations- und PCR Replikation auf<br>die nachgewiesene $\alpha$ - und $\beta$ -Diversität..... | 51 |
| Abbildung 11: | Anzahl der nachgewiesenen Metazoen-OTUs aus vier<br>Blasentangproben, die mittels eines metazoenspezifischen<br>Primers amplifiziert wurden .....                                  | 52 |
| Abbildung 12: | Verhältnis nachgewiesener Insektenarten in den<br>Blatthomogenaten in Abhängigkeit der Anzahl von PCR-<br>Replikaten .....                                                         | 52 |
| Abbildung 13: | Abhängigkeit der Artnachweise aus Schwebstoffproben (Y-<br>Achse) von der Anzahl der Replikate für Fischarten (links) und<br>Wirbellosenarten (rechts) .....                       | 54 |
| Abbildung 14: | Durchgeführte Primer-Validierung für das eDNA-<br>Metabarcoding von Schwebstoff-Proben zum Nachweis von<br>Fischen- und Rundmäulern.....                                           | 57 |
| Abbildung 15: | Saturierung der Diversität aus verschiedenen Proben mit der<br>Sequenziertiefe.....                                                                                                | 58 |
| Abbildung 16: | Tiere, die von Blasentang-Thalli gesammelt und mikroskopisch<br>bestimmt wurden .....                                                                                              | 59 |
| Abbildung 17: | Vergleich von Biodiversitätsmustern aus dem Boden und dem<br>Kot von Regenwürmern aus demselben Boden .....                                                                        | 60 |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abbildung 18: | NMDS-Diagramme der aus Proben nachgewiesenen<br>Artengemeinschaften über den Stammbaum des Lebens <sup>61</sup>                                                                                                                                                                                           |
| Abbildung 19: | Nachweis von Artengemeinschaften aus Dreikant- und<br>Quaggamuschelproben und eDNA-Wasserproben <sup>62</sup>                                                                                                                                                                                             |
| Abbildung 20: | Vergleich der detektierten Artenzahlen von Jahres- und<br>Monatsproben..... <sup>63</sup>                                                                                                                                                                                                                 |
| Abbildung 21: | Vergleich der detektierten Zahlen einzigartiger Sequenzen<br>(ESVs, hier „zOTUs“) aus regulären Jahreshomogenaten (Anzahl<br>Monatsproben n = 6) und Jahreshomogenaten aus nur 3<br>Monatsproben von Blasentang beider Nordseestandorte für<br>Bakterien (links) und Metazoa (rechts) ..... <sup>64</sup> |
| Abbildung 22: | Taxonomische Zusammensetzung der mit terrestrischen,<br>marinen und limnischen UBP-Probenorganismen assoziierten<br>Lebensgemeinschaften zu verschiedenen Zeitpunkten ..... <sup>68</sup>                                                                                                                 |
| Abbildung 23: | Übersicht über die Anzahl der in den Blasentangproben<br>erfassten Arten von und wirbellosen Tieren ..... <sup>69</sup>                                                                                                                                                                                   |
| Abbildung 24: | Übersicht über die Anzahl der in den Blattproben der Bäume<br>erfassten Arten von und wirbellosen Tieren mithilfe des COI-<br>Gens..... <sup>71</sup>                                                                                                                                                     |
| Abbildung 25: | Beispiel für eine ökologische Annotation der aus Baumkronen<br>nachgewiesenen Gliederfüßer ..... <sup>72</sup>                                                                                                                                                                                            |
| Abbildung 26: | Übersicht über die Anzahl der in den Schwebstoffproben<br>erfassten Arten von Wirbeltieren und wirbellosen Tieren <sup>73</sup>                                                                                                                                                                           |
| Abbildung 27: | Vergleich der eukaryotischen OTUs, die in Proben von<br>Regenwurm Kot (links) und Regenwurmkörper (rechts)<br>gefunden wurden ..... <sup>74</sup>                                                                                                                                                         |
| Abbildung 28: | Kultivierung von Bakterien aus Regenwurmhomogenaten <sup>75</sup>                                                                                                                                                                                                                                         |
| Abbildung 29: | Übersicht zu den Fischdiversitätstrends an den 13 Messstellen<br>der UPB (oben) sowie „Gewinner“ (grün) und „Verlierer“ (rot)<br>mit Blick auf Zu- und Abnahme von Nachweisen über alle<br>Probestellen hinweg (unten) ..... <sup>86</sup>                                                                |
| Abbildung 30: | Generalisierte additive Modelle (GAMs) der eDNA-Zeitreihen<br>für Wirbellose an den verschiedenen Standorten ..... <sup>87</sup>                                                                                                                                                                          |
| Abbildung 31: | Übersicht über getestete Treiber zur Veränderung der<br>Fischdiversität an den SPM-Messstellen ..... <sup>89</sup>                                                                                                                                                                                        |
| Abbildung 32: | Diversitätsanalyse und Effekte von Stressoren auf die<br>aquatischen Wirbellosen ..... <sup>90</sup>                                                                                                                                                                                                      |
| Abbildung 33: | Taxonomischer Reichtum der Organismengruppen bei<br>unterschiedlicher Landnutzung..... <sup>93</sup>                                                                                                                                                                                                      |
| Abbildung 34: | Zeitliche Trends der Bray-Curtis-Distanzen (Betadiversität, Y-<br>Achse) sowie ihrer Komponenten der ausgeglichenen Variation<br>und des Abundanzgradienten ..... <sup>94</sup>                                                                                                                           |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 35: | Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) der Zusammensetzung bakterieller (Stress: 0,164), pilzlicher (Stress: 0,17) und metazoischer (Stress: 0,259) Gemeinschaften .....                                                                    | 95  |
| Abbildung 36: | Zusammenfassung der Untersuchung von miesmuschelassoziierten Gemeinschaften .....                                                                                                                                                                        | 98  |
| Abbildung 37: | Veränderung der relativen Sequenzabundanzen von vier invasiven Arten an den Nordseestandorten der UPB .....                                                                                                                                              | 99  |
| Abbildung 38: | Übersicht über Probenahmestellen und rekonstruierte Biodiversität aus UPB-Proben aus terrestrischen, limnischen und marinen Ökosystemen im Zeitraum 1985-2022 .....                                                                                      | 102 |
| Abbildung 39: | Multidekadische Trends der $\alpha$ -Diversität, der zeitlichen und räumlichen $\beta$ -Diversität und der $\gamma$ -Diversität in Gemeinschaften entlang des Stammbaums des Lebens, die mit natürlichen eDNA-Sammlern aus der UPB assoziiert sind ..... | 105 |
| Abbildung 40: | Zeitliche Muster von $\alpha$ - und $\beta$ -Diversität der Pilzlebensgemeinschaften .....                                                                                                                                                               | 109 |
| Abbildung 41: | $\alpha$ -Diversität (hier dargestellt als ESV-Reichtum) für blattassoziierte Pilze mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften .....                                                                                                              | 110 |
| Abbildung 42: | Die Auswahl der Probenahmestellen und die Ermittlung der Vielfalt und Wechselwirkungen mit den mit dem Kronendach assoziierten Gliederfüßergemeinschaften aus Blattmaterial. ....                                                                        | 114 |
| Abbildung 43: | Trends der ESV-Vielfalt in Waldarthropoden-Gemeinschaften über einen Zeitraum von 11 Jahren in (A) Deutschland und (B) Südkorea .....                                                                                                                    | 115 |
| Abbildung 44: | Analysen zur innerartlichen genetischen Diversität von blattassoziierten Gliederfüßern .....                                                                                                                                                             | 118 |
| Abbildung 45: | Beispiel einer Art mit zeitlichem, räumlichem und baumartbezogenem ESV-Signal .....                                                                                                                                                                      | 120 |
| Abbildung 46: | Populationsgenomische Auswertung der Aalmutterzeitreihe .....                                                                                                                                                                                            | 124 |
| Abbildung 47: | Darstellung der räumlichen und zeitlichen Veränderung von Genexpression in der Nordsee und der Ostsee .....                                                                                                                                              | 127 |
| Abbildung 48: | Darstellung der zeitlichen Veränderung der Genexpression von hitzestressassoziierten Genen in der Nordsee (North Sea; gelb) und der Ostsee (Baltic Sea; violett) .....                                                                                   | 128 |
| Abbildung 49: | Teilnehmende des Workshops zu genetischen Methoden in der Umweltbeobachtung, 26.-28. März 2025 an der Universität Duisburg-Essen .....                                                                                                                   | 130 |
| Abbildung 50: | Die TrendDNA-Webseite als zentrale Informationsseite zu dem Projekt; verfügbar auf Deutsch und Englisch .....                                                                                                                                            | 135 |

## Tabellenverzeichnis

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabelle 1: | RNA-Ausbeute und Qualität (RIN) der Aalmutter-Leberhomogenate, gemessen auf einem Agilent 2100 Bioanalyzer .....                                                                                                                                                                                                                           | 42  |
| Tabelle 2: | Übersicht der in AP1 vom Projektteam vorgenommenen Arbeiten zur Auswahl und Eignung von verschiedenen genetischen Verfahren zur Untersuchung von Proben .....                                                                                                                                                                              | 43  |
| Tabelle 3: | Verwendete Primerkombinationen und Zielgene der jeweiligen Proben .....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 55  |
| Tabelle 4: | Übersicht der in AP2 vom Projektteam vorgenommenen Arbeiten zur Integration genetischer Analysemethoden in den Betriebsablauf der UPB, zur Identifikation kritischer Arbeitsabläufe und zur Qualitätssicherung. Die Tabelle zeigt die verfolgten Ziele, die angewandte Methodik und die entsprechenden Ergebnisse (siehe Anhang A.3) ..... | 65  |
| Tabelle 5: | Übersicht über in AP 3 generierte Zeitreihendaten                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 77  |
| Tabelle 6: | Hauptergebnisse der Fallstudien .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 80  |
| Tabelle 7: | Übersicht über die im TrendDNA-Projekt durchgeführte Abschlussarbeiten .....                                                                                                                                                                                                                                                               | 136 |
| Tabelle 8: | Übersicht über die Verfügbarkeit der im TrendDNA-Projekt generierten Daten in internationalen Repositorien gemäß der FAIR-Prinzipien .....                                                                                                                                                                                                 | 139 |

## Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung          | Erläuterung                                                                                                                                                              |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AP</b>          | Arbeitspaket                                                                                                                                                             |
| <b>BfG</b>         | Bundesanstalt für Gewässerkunde                                                                                                                                          |
| <b>BfN</b>         | Bundesamt für Naturschutz                                                                                                                                                |
| <b>BLAST</b>       | Bezeichnung für ein Programm, das zur Analyse biologischer Sequenzdaten genutzt wird (engl. = Basic Local Alignment Search Tool)                                         |
| <b>BMUV</b>        | Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz                                                                                     |
| <b>BOLD</b>        | Webseite und Datenbank für DNA-basierte Art-Identifizierung (engl. = Barcode of Life Data Systems)                                                                       |
| <b>bp</b>          | Basenpaare                                                                                                                                                               |
| <b>CBD</b>         | Convention on Biological Diversity                                                                                                                                       |
| <b>CCS</b>         | Sequenzier-Methode (engl. = Circular consensus sequence)                                                                                                                 |
| <b>COI</b>         | Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit I                                                                                                                                       |
| <b>Cq-Wert</b>     | Ein Maß für die Ausgangsmenge der Ziel-DNA oder RNA, quantifiziert über Fluoreszenz in einer qPCR. Je niedriger der Wert, desto mehr Material war in der Probe vorhanden |
| <b>CTAB</b>        | Cetyltrimethylammoniumbromid                                                                                                                                             |
| <b>DFG</b>         | Deutsche Forschungsgemeinschaft                                                                                                                                          |
| <b>DGL</b>         | Deutsche Gesellschaft für Limnologie                                                                                                                                     |
| <b>DNA</b>         | Desoxyribonukleinsäure (auch DNS, engl. = deoxyribonucleic acid)                                                                                                         |
| <b>DWD</b>         | Deutscher Wetterdienst                                                                                                                                                   |
| <b>EBI</b>         | European Bioinformatics Institute                                                                                                                                        |
| <b>eDNA / eRNA</b> | Umwelt DNA / Umwelt RNA                                                                                                                                                  |
| <b>EMBL</b>        | European Molecular Biology Laboratory                                                                                                                                    |
| <b>ENA</b>         | European Nucleotide Archive, öffentliches Repositorium für Sequenzdaten                                                                                                  |

| Abkürzung             | Erläuterung                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ESV</b>            | Exact sequence variant, eindeutige genetische Variante                                                                                                                                                            |
| <b>EtOH</b>           | Ethanol                                                                                                                                                                                                           |
| <b>EU</b>             | Europäische Union                                                                                                                                                                                                 |
| <b>EWG</b>            | Europäische Wirtschaftsgemeinschaft                                                                                                                                                                               |
| <b>FAIR</b>           | Die FAIR-Prinzipien beschreiben Anforderungen an das Forschungsdatenmanagement, wonach Daten Findable (auffindbar), Accessible (zugänglich), Interoperable (interoperabel) und Reusable (nachnutzbar) sein sollen |
| <b>FST</b>            | Genetischer Differenzierungsindex                                                                                                                                                                                 |
| <b>GeDNA</b>          | Umweltbundesamt-Projekt „eDNA basierte Methoden für die behördliche Gewässerbeobachtung“                                                                                                                          |
| <b>GFBio</b>          | Gesellschaft für Biologische Daten e.V.                                                                                                                                                                           |
| <b>ICPDR/IKSD</b>     | Internationale Kommission zum Schutz der Donau (engl. = International Commission for the Protection of the Danube River)                                                                                          |
| <b>IKSR</b>           | Internationale Kommission zum Schutz des Rheins                                                                                                                                                                   |
| <b>LTER-D</b>         | Long-Term Ecosystem Research, Deutschland                                                                                                                                                                         |
| <b>mg</b>             | Milligramm                                                                                                                                                                                                        |
| <b>min</b>            | Minuten                                                                                                                                                                                                           |
| <b>mRNA</b>           | Messenger-RNA oder Boten-RNA, einzelsträngiges RNA-molekül, das die genetische Bauanleitung für die Proteinsynthese trägt                                                                                         |
| <b>Mock-Community</b> | Künstlich-erstellte Kombination von Organismen / DNA zur Validierung von Methoden durch diese bekannte Zusammensetzung (Positivkontrolle)                                                                         |
| <b>NABU</b>           | Naturschutzbund Deutschland                                                                                                                                                                                       |
| <b>NaOH</b>           | Natriumhydroxid                                                                                                                                                                                                   |
| <b>NC</b>             | Negativkontrolle (engl. = negative control)                                                                                                                                                                       |
| <b>NCBI</b>           | National Center for Biotechnology Information                                                                                                                                                                     |
| <b>ng</b>             | Nanogramm                                                                                                                                                                                                         |
| <b>NIH</b>            | National Institutes of Health                                                                                                                                                                                     |

| Abkürzung      | Erläuterung                                                                                 |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>nm</b>      | Nanometer                                                                                   |
| <b>NMDS</b>    | Nichtmetrische multidimensionale Skalierung                                                 |
| <b>NMZB</b>    | Nationales Monitoringzentrum zur Biodiversität                                              |
| <b>NUMT</b>    | Mitochondrielles pseudogenisiertes Element im Kerngenom (engl. = nuclear mitochondrial DNA) |
| <b>OTU</b>     | Operative taxonomische Einheit (engl. = Operative Taxonomic Unit)                           |
| <b>PCR</b>     | Polymerase-Kettenreaktion (engl. = polymerase chain reaction)                               |
| <b>PoolSeq</b> | Bezeichnung für aus Mischproben gewonnene biologische Sequenzdaten                          |
| <b>QC</b>      | Qualitätskontrolle (engl. = Quality control)                                                |
| <b>qPCR</b>    | Quantitative Echtzeit-PCR (engl. = real-time quantitative PCR)                              |
| <b>rDNA</b>    | Ribosomale DNA                                                                              |
| <b>RNA</b>     | Ribonukleinsäure (auch RNS, engl. = Ribonucleic acid)                                       |
| <b>rRNA</b>    | Ribosomale RNA                                                                              |
| <b>SDS</b>     | Natriumdodecylsulfat (engl. = Sodium Dodecyl Sulfate)                                       |
| <b>sek</b>     | Sekunden                                                                                    |
| <b>SGN</b>     | Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung                                                 |
| <b>SNP</b>     | Punktmutation (engl. = Single Nucleotide Polymorphism)                                      |
| <b>SOP</b>     | Standard-Arbeitsanweisung (engl. = Standard Operation Procedure)                            |
| <b>SPM</b>     | Schwebstoffe (engl. = Suspended Particulate Matter)                                         |
| <b>SRA</b>     | Sequence Read Archive, öffentliches Sequenzdaten-Repository                                 |
| <b>Tris</b>    | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                                                              |
| <b>UBA</b>     | Umweltbundesamt                                                                             |
| <b>UDE</b>     | Universität Duisburg-Essen                                                                  |



| Abkürzung | Erläuterung                                     |
|-----------|-------------------------------------------------|
| UK        | Vereinigtes Königreich (engl. = United Kingdom) |
| UPB       | Umweltprobenbank des Bundes                     |
| VE Wasser | Vollentsalztes Wasser                           |
| WRRL      | Wasserrahmenrichtlinie                          |

## Zusammenfassung

Das TrendDNA-Projekt wurde vom Umweltbundesamt (UBA) als Forschungs- und Entwicklungsprojekt beauftragt, um das Potenzial der Umweltprobenbank des Bundes (UPB) für genetische Biodiversitätsanalysen zu untersuchen. Die UPB archiviert seit über 40 Jahren biologische und abiotische Umweltproben aus Meeres-, Süßwasser- und Landökosystemen bei ultratiefen Temperaturen (unter  $-150\text{ °C}$ ). Dadurch bleiben alle Moleküle – einschließlich DNA und RNA – erhalten. Die UPB wurde bislang vor allem für das chemische Trendmonitoring genutzt wurde. Das TrendDNA-Projekt prüfte erstmals systematisch, ob diese speziell-gelagerten Proben auch für ein genetisches Biodiversitätsmonitoring geeignet sind. Ein multi-institutionelles Konsortium aus der Universität Duisburg-Essen (UDE, Leitung), der Universität Trier (UT), dem Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie (F-IME) sowie der Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung (SGN) bearbeitete die Aufgabe über vier Jahre. Zentrales Ziel war die Beantwortung von drei Leitfragen: Welche Probenarten der UPB eignen sich für genetische Analysen? An welchen Biodiversitäts-Forschungsfragen kann die UPB mitwirken? Wie kann sie den behördlichen Umweltschutz mit genetischen Daten unterstützen? Für die Projektarbeiten wurde das Projekt in 6 Arbeitspakete (APs) strukturiert, die im Folgenden näher erläutert werden.

**AP 1 – Auswahl geeigneter Proben und Methoden:** Im ersten AP wurde geprüft, welche der rund 24 untersuchten Probentypen der UPB grundsätzlich für genetische Analysen geeignet sind. Das Fraunhofer-Institut testete und optimierte DNA-Extraktionsprotokolle systematisch für alle Probentypen – von Schwebstoffen und Muschelproben bis zu Blättern, Böden und Biotaproben. Für jeden Probentyp wurden DNA-Ausbeute, Reinheit und das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren quantifiziert. Das Ergebnis war eindeutig: Für alle Probenarten konnten geeignete Extraktionsprotokolle identifiziert werden, die ausreichende DNA-Mengen in guter Qualität liefern. Auch die RNA-Extraktion aus Biotaproben der Aalmutter gelang erfolgreich mit hohen RNA-Integritätswerten. Parallel dazu wurden die vier wichtigsten genetischen Methoden ausgewählt und bewertet: DNA-Metabarcoding (Artgemeinschaftsanalyse über kurze Marker-Genabschnitte), Metagenomik (Gesamtgenomsequenzierung von Umweltproben), Populationsgenomik (Zeitreihen innerartlicher genetischer Variation) und Transkriptomik (Genexpressionsanalyse zur Messung von Stressantworten). Das DNA-Metabarcoding erwies sich als die aktuell am besten geeignete Methode für das breite Probenspektrum der UPB und wurde zum methodischen Schwerpunkt des Projekts. Ebenso wurden in AP 1 Grundlagen des übergeordneten Datenmanagementkonzepts erarbeitet, das eine Integration der genetischen Daten in das digitale Informationssystem der UPB nach FAIR-Prinzipien (*Findable, Accessible, Interoperable, Reusable*) vorsieht.

**AP 2 – Operationalisierung:** Im Zentrum von AP 2 stand die Frage, ob und wie genetische Analyseverfahren in die hochstandardisierten Betriebsabläufe der UPB integriert werden können. Dabei standen zunächst potenzielle Kontaminationsquellen im Labor und im Feld im Fokus. Es wurde geprüft, ob die verwendeten Arbeitsflächen, Werkzeuge und insbesondere die Kryomühle – in der die Proben homogenisiert werden – Kreuzkontaminationen zwischen verschiedenen Proben verursachen können. Die Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf Kreuzkontaminationen; die bestehenden Dekontaminationsverfahren für die Kryomühle sind für eDNA-Analysen geeignet. Darüber hinaus wurde für verschiedene Probentypen geprüft, ob die Menge des eingesetzten Homogenats die Biodiversität repräsentativ abbildet: Bereits ab 200 mg Homogenat wurde bei Blattproben eine Sättigung der Artenzusammensetzung erzielt. Für die Schwebstoffproben wurde der Mehrwert von Monatsproben gegenüber Jahresmischproben untersucht; Monatsproben erfassen die saisonale Artendynamik besser. Außerdem wurde die taxonomische Reinheit ausgewählter Biotaproben überprüft. Dreikantmuschel-Proben wiesen

teilweise Beimischungen der invasiven Quaggamuschel auf, was zugleich wertvolle Informationen zur Invasionsgeschichte dieser Art lieferte. Bei Miesmuscheln wurden Hybridisierungsphänomene nachgewiesen, die künftig weiter untersucht werden sollen. Die Untersuchungen belegen insgesamt, dass die UPB-Proben unter definierten Protokollen robust und zuverlässig für genetische Biodiversitätsanalysen genutzt werden können.

**AP 3 – Generierung und Auswertung von eDNA-Zeitreihendaten:** Auf Basis der validierten Protokolle aus AP 1 und AP 2 wurden in AP 3 umfangreiche Zeitreihendatensätze für terrestrische, limnische und marine Ökosysteme generiert. Im Mittelpunkt stand das eDNA-Metabarcoding, angewandt auf Schwebstoffe der 13 Probestellen, Miesmuscheln und Blasentang aus Nord- und Ostsee sowie Blattmaterial von vier Baumarten und Bodenproben der terrestrischen Standorte. Dreikantmuschelproben aus neun Probenahmestellen in vier Flüssen (1994–2020) wurden ebenfalls analysiert. Die Zeitreihen umfassen bei manchen Probentypen bis zu 30 Jahre. Für Bodenproben wurde zusätzlich Metagenomik eingesetzt, um mikrobielle Gemeinschaften umfassend zu charakterisieren. Populationsgenomische Analysen (Pool-Sequenzierung) wurden erstmals an Aalmuttern und Regenwürmern durchgeführt. Außerdem wurden aus UPB-Aalmutterproben auch Transkriptomdaten erhoben. Die generierten Datensätze waren von hoher Qualität, mit plausiblen Artennachweisen, die durch Vergleiche mit konventionellen Monitoring-Daten bestätigt wurden: Die aus Schwebstoffproben detektierten Fischgemeinschaften stimmten gut mit Erwartungen aus der Gewässertypologie überein; blattassoziierte Lebensgemeinschaften von Arthropoden (im Folgenden Gliederfüßer) waren baumartenspezifisch; blasentangassoziierte Arten deckten sich mit Ergebnissen konventioneller Absammlungen; Regenwurmkot erwies sich als zuverlässiger Indikator für Bodendiversität.

**AP 4 – Fallstudien zur zeitlichen Veränderung der Biodiversität:** In AP 4 wurden fünf umfassende wissenschaftliche Fallstudien auf Basis der in AP 3 generierten Zeitreihen erarbeitet. Die Fallstudien adressierten terrestrische, limnische und marine Ökosysteme gleichermaßen und sollten Muster sowie potenzielle Treiber des Biodiversitätswandels identifizieren. Ein besonderer Schwerpunkt lag auf der Frage, ob sich die genetischen Zeitreihendaten mit vorhandenen chemisch-physikalischen Umweltdaten verknüpfen lassen, um Treiber von Biodiversitätsveränderungen zu identifizieren.

Die limnische Fallstudie analysierte Schwebstoffproben aus sechs Flüssen an 13 Messstellen über den Zeitraum 2005–2021. Mittels eDNA-Metabarcoding wurden insgesamt 63 Fisch- und Neunaugenarten sowie über 1700 Invertebratenarten nachgewiesen. Die Artentrends aus den eDNA-Daten zeigten eine Übereinstimmung von über 73 % mit Ergebnissen traditioneller Fischmonitoringprogramme (WRRL, IKSRL) und belegen damit die Zuverlässigkeit des retrospektiven Ansatzes. Die Veränderungen in den Fischgemeinschaften waren standortspezifisch – an einigen Messstellen nahm die Artenzahl signifikant ab, andere blieben stabil oder zeigten leichte Zunahmen. Insgesamt überwog Arten-Turnover (räumliche Ersetzung von Arten zwischen Gemeinschaften) gegenüber Nestedness (systematisches Verschwinden von Arten, sodass artenärmere Gemeinschaften eine Teilmenge der artenreicheren darstellen; eine generelle Homogenisierung der Fischgemeinschaften war nicht festzustellen. Besonders auffällig war die Einwanderung und rasche Ausbreitung invasiver Grundelarten: Die Schwarzmundgrundel (*Neogobius melanostomus*) war zu Beginn der Zeitreihe 2005 nicht nachweisbar und nahm in den Folgejahren rapide zu – sowohl in Signalstärke als auch in der Zahl positiver Probestellen. Auch weitere invasive Grundelarten (z. B. *Babka gymnotrachelus*, *Ponticola kessleri*) konnten in ihrer Ausbreitung über die Flüsse hinweg nachverfolgt werden. Ebenso wurde die Einwanderung der Quaggamuschel (*Dreissena rostriformis*) über die Dreikantmuschelproben detailliert dokumentiert. Da die Schwebstoffproben gleichzeitig als Träger chemisch-physikalischer Langzeitmessdaten dienen, konnten Korrelationsanalysen

zwischen biotischen und abiotischen Daten durchgeführt werden. Dabei zeigte sich, dass Faktoren wie Quecksilberkonzentration, Chloridgehalt, Feinsedimentanteil, Wassertemperatur sowie persistente Schadstoffe (PFAS, Pflanzenschutzmittel) signifikant mit Fischartenzahl und -zusammensetzung korrelieren. Diese Kombination multipler Stressoren ist dabei vor allem probestellenspezifisch und erklärt, warum verschiedene Standorte unterschiedliche Trends zeigen. Für ein vollständiges Bild sind umfangreichere Mehrfachstressor-Analysen unter Einbeziehung weiterer Gewässerdaten erforderlich.

Die terrestrische Fallstudie zu Bodengemeinschaften analysierte 54 Bodenproben von 11 Standorten in neun Regionen Deutschlands aus dem Zeitraum 2002–2019 mittels Metagenomik. Der Artenreichtum von Bakterien, Pilzen und Metazoa blieb über 17 Jahre statistisch stabil – ein Phänomen, das die tieferliegenden Veränderungen in der Artenzusammensetzung verdeckt. Bei Bakterien und Pilzen wurden Anzeichen zunehmender Homogenisierung festgestellt; bei Bodenmetazoa hingegen nicht. Hinsichtlich der Treiber zeigte sich ein klarer Befund: Für mikrobielle Gemeinschaften war die Landnutzung der dominante strukturierende Faktor – auf landwirtschaftlich genutzten Flächen waren die Bakteriengemeinschaften artenärmer als in Wäldern. Für Bodenmetazoa dagegen war nicht die Landnutzung, sondern der Standort selbst. Dies belegt die Bedeutung der lokalen biogeographischen Geschichte und Ausbreitungsbarrieren als wichtigste strukturierende Faktoren. Das Ergebnis unterstreicht, dass der Schutz tierischer Bodenbiodiversität standortspezifische Strategien erfordert, die über flächendeckende Landnutzungsmaßnahmen hinausgehen.

Die marine Fallstudie untersuchte anhand von Miesmuschel-Jahreshomogenaten (1985–2020) die Einwanderung und Ausbreitung der australischen Seepocke (*Austrominius modestus*) an der deutschen Nordseeküste. Die relative Sequenzabundanz korrelierte eng mit tatsächlichen Individuenzählungen und erlaubte damit semiquantitative Aussagen zur Populationsdynamik. Die Ausbreitung der invasiven Art war signifikant positiv mit steigenden Wintertemperaturen korreliert. Während kältere Winter zu Populationseinbrüchen führten, folgte auf häufigere milde Winter eine rasche Erholung und zunehmende Ausbreitung – ein klares Signal für den Einfluss des Klimawandels. Darüber hinaus wurden weitere invasive und kryptische Arten wie Parasiten und Mikroalgen in den Proben erstmalig nachgewiesen, die in konventionellen Monitoringprogrammen nicht erfasst werden. Die Studie zeigt das Potenzial der UPB als Frühwarnsystem für Artinvasionen.

Die integrative Fallstudie verknüpfte Zeitreihen aus terrestrischen (Blattproben von Buche, Fichte, Pappel; 1985–2022), marinen (Miesmuscheln, Blasentang; 1985–2021) und limnischen Ökosystemen (Dreikantmuscheln; 1985–2021). Mithilfe eines statistischen Metacommunity-Modells wurden  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Diversitätstrends verglichen. Das zentrale Ergebnis: In keinem untersuchten Ökosystemtyp ließ sich ein systematischer Verlust der lokalen Artenzahl feststellen. Jedoch veränderte sich die Artenzusammensetzung in allen Gemeinschaften – quer über Ökosysteme und Organismengruppen – signifikant schneller, als ohne anthropogene Einflüsse zu erwarten wäre. Dieser schnelle, gerichtete Turnover kann als Ausdruck einer anthropogen beschleunigten Biodiversitätsdynamik interpretiert werden. Eine direkte Zuordnung zu einzelnen Umweltfaktoren war bislang nicht möglich; hier besteht weiterer Bedarf an umweltstatistischen Methoden und der Integration umfassenderer Umweltdatensätze.

Weitere Fallstudien befassten sich mit verschiedenen Ebenen der Biodiversität. In Zusammenarbeit mit der Probenbank Südkoreas wurde eine vergleichende Analyse des Insektensterbens in heimischen und koreanischen Wäldern vorgenommen. Interessanterweise zeigen sich hier deutliche Unterschiede: Während die Insektenvielfalt in den letzten 10 Jahre in Deutschland stabil geblieben ist, fand in Korea ein erheblicher Rückgang statt. Die Arbeit zeigt

den großen Wert der Zusammenarbeit internationaler Probenbanken zur globalen Analyse des Biodiversitätswandels.

In einer weiteren Studie wurde die Artenvielfalt von Pilzen in Baumkronen von Buchen und Fichten über die Zeit untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine deutlich schnellere Veränderung der Artenzusammensetzung in der gebietsfremden Fichte als in der heimischen Buche.

Eine Untersuchung der genetischen Vielfalt von baumkronenassoziierten Insektenarten wurde mithilfe eines eDNA-Metabarcoding-Datensatzes zur Biodiversität von Insekten aus Baumkronen vorgenommen. Die Analyse zeigt die Eignung von Metabarcoding-Zeitreihen, Informationen zur genetischen Vielfalt diverser Arten über Raum und Zeit zu rekonstruieren.

Neben der Generierung von Metabarcoding-Daten wurde die Eignung von UPB-Proben zur Untersuchung innerartlicher genetischer Variation, des Anpassungspotenzials, sowie physiologischer Stresssignale untersucht. Dazu diente die Probenart Aalmutter.

Populationsgenomische Untersuchungen des Fisches zeigen eine Anpassung an die verringerte Salinität der Ostsee, aber nur wenige Hinweise auf eine rezente Anpassung an den Klimawandel. Eine genomische Untersuchung über große Teile des Areals dieses Fisches wurde durch eine enge Zusammenarbeit mit der schwedischen Probenbank möglich, die diese Indikatorart ebenfalls beprobt. Zusätzlich wurde, mittels RNA-Sequenzierung, die genomweite Genexpression der Aalmutter über die Zeit gemessen. Da RNA-Moleküle sehr instabil sind, spielt hier die Kryokonservierung der UPB eine entscheidende Rolle. Die Ergebnisse zeigen, dass kryokonservierte UPB-Proben sich sogar eignen, um den individuellen Stresszustand von Arten zu untersuchen.

**AP 5 – Effiziente Verwertung der Daten für Umwelt- und Naturschutz:** AP 5 verfolgte das Ziel, die Projektergebnisse für die behördliche Praxis und den Naturschutz nutzbar zu machen. Hierzu wurde ein Begleitkreis aus Expertinnen und Experten aus Forschung, Behörden und Naturschutzpraxis eingerichtet, der die Projektergebnisse in jährlichen Treffen begleitete und Empfehlungen für weitere Analysen einbrachte. Das Projekt zeigte konkrete Anknüpfungspunkte an gesetzliche Anforderungen und Politikzyklen zum Schutz der Biodiversität. In einem gemeinsamen Abschlussworkshop im März 2025 wurden zehn Handlungsempfehlungen erarbeitet, die unter anderem die organisatorische und finanzielle Verstärkung genetischer Analysen in der UPB, die Verknüpfung mit behördlichen Monitoringprogrammen (Wasserrahmenrichtlinie, Flora-Fauna-Habitatrichtlinie, Meeresstrategierahmenrichtlinie), die Entwicklung neuer genetischer Indikatoren für die Umweltpolitik sowie die stärkere Nutzung von KI-gestützten statistischen Verfahren empfehlen.

**AP 6 – Information der allgemeinen und Fachöffentlichkeit:** AP 6 umfasste die gesamte Kommunikations- und Transferstrategie des Projekts. Die Fachöffentlichkeit wurde durch zahlreiche Beiträge auf nationalen und internationalen Konferenzen informiert, darunter durch mehrere Plenarvorträge auf großen Tagungen. Mehrere Publikationen in begutachteten Fachzeitschriften wurden bereits angenommen, weitere befinden sich in Vorbereitung. Internationale Delegationen aus Südkorea und Südafrika besuchten das Projekt; eine erste gemeinsame Publikation mit der koreanischen Umweltprobenbank entstand. Die allgemeine Öffentlichkeit wurde über die Projektwebseite (<https://trenddna.de>), Ausstellungsformate, Science Slams, Girls' Days und Veranstaltungen wie den City Campus Trier sowie Kinderuniversitäten angesprochen. Ein populärwissenschaftlicher Artikel zu den Projektergebnissen befindet sich derzeit im Druck in „Biospektrum“. Alle im Projekt generierten Datensätze sind gemäß den FAIR-Prinzipien in offenen, frei zugänglichen Repositorien verfügbar.

Nachwuchsförderung und Gesamtergebnis: Ein wichtiges Ergebnis des Projekts ist die intensive Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses: Insgesamt 25 Nachwuchswissenschaftlerinnen und Nachwuchswissenschaftler waren beteiligt, darunter Studierende auf Bachelor- und Masterniveau sowie 3 Promovierende, die ihre Dissertationen im Rahmen des Projekts abgeschlossen haben oder abschließen sowie 3 Postdoktorand\*innen.

Die Gesamtergebnisse des TrendDNA-Projekts belegen eindrücklich, dass die Umweltprobenbank des Bundes ein genetisches Langzeitarchiv für ein integriertes, rück- und vorwärtsblickendes Biodiversitätsmonitoring geeignet ist. Die Proben erlauben Aussagen zu Biodiversitätstrends von der Ebene der innerartlichen genetischen Diversität bis zu Ökosystemveränderungen – und liefern damit einzigartige Informationen für die Forschung, die behördliche Umweltbeobachtung und naturschutzrechtliche Entscheidungen in Deutschland. Dieses Potenzial gilt es im Routinebetrieb zu implementieren und weiterzuentwickeln.



## Summary

The TrendDNA project was commissioned by the German Federal Environment Agency (UBA) as a research and development project to assess the potential of the German Environmental Specimen Bank (ESB) for genetic biodiversity analyses. The ESB has archived biological and abiotic environmental samples from marine, freshwater, and terrestrial ecosystems for over 40 years at ultra-low temperatures (below  $-150^{\circ}\text{C}$ ), preserving all molecules including DNA and RNA – a property previously exploited mainly for chemical trend monitoring. TrendDNA was the first systematic investigation of whether these samples can also serve as a genetic biodiversity archive. A multi-institutional consortium – led by the University of Duisburg-Essen, together with the University of Trier, the Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, and the Senckenberg Society for Nature Research – addressed this challenge in six work packages (WP) over four years, guided by three central questions: Which ESB sample types are suitable for genetic analyses? Which biodiversity research questions can the ESB contribute to? And how can it support regulatory environmental monitoring with genetic data?

**WP 1 – Selection of suitable samples and methods:** The first WP determined which of approximately 24 ESB sample types are fundamentally suitable for genetic analyses. The Fraunhofer Institute systematically tested and optimised DNA extraction protocols for all sample types – from suspended particulate matter and mussel samples to leaves, soils, and biota samples – quantifying DNA yield, purity, and the presence of PCR inhibitors. The outcome was clear: suitable extraction protocols could be identified for all sample types, delivering sufficient DNA in good quality. RNA extraction from biota samples (eel pout liver homogenates) also succeeded with high RNA integrity scores. Alongside this, four key genetic methods were evaluated: eDNA metabarcoding (community analysis via short marker gene fragments), metagenomics (whole-genome sequencing of environmental samples), population genomics (time-series analysis of intraspecific genetic variation), and transcriptomics (gene expression analysis to measure stress responses). DNA metabarcoding proved most broadly applicable across the ESB sample spectrum and became the methodological backbone of the project. WP 1 also established the foundations for an overarching data management concept aimed at integrating genetic data into the ESB's digital information system in accordance with FAIR principles (Findable, Accessible, Interoperable, Reusable).

**WP 2 – Operationalisation: Contamination testing and method validation:** WP 2 addressed whether and how genetic methods can be integrated into the ESB's highly standardised operational workflows. The primary focus was on potential contamination sources in the laboratory and the field – in particular, whether work surfaces, tools, and the cryo-mill used for homogenisation could cause cross-contamination between samples. Tests found no evidence of cross-contamination; existing decontamination procedures for the cryo-mill are adequate for eDNA analyses. Further tests examined whether the amount of homogenate used in DNA extraction is sufficient to represent sample biodiversity: saturation of species composition was already achieved with as little as 200 mg of leaf homogenate. For suspended particulate matter, monthly samples were compared with annual composites; monthly samples captured seasonal species dynamics more effectively. The taxonomic purity of selected biota samples was also checked. Zebra mussel samples showed partial contamination by the invasive quagga mussel, simultaneously yielding valuable information on the quagga mussel's invasion history. Hybridisation phenomena were detected in blue mussels, warranting further investigation. Overall, the results confirm that ESB samples can produce robust and reliable data for genetic biodiversity analyses under defined protocols.

**WP 3 – Generation and analysis of eDNA time series:** Building on the validated protocols from WP 1 and WP 2, WP 3 generated extensive time-series datasets for terrestrial, freshwater, and marine ecosystems. The central method was eDNA metabarcoding, applied to suspended particulate matter from four German rivers, blue mussels and bladder wrack from the North Sea and Baltic Sea, leaf material from four tree species, and soil samples from terrestrial sites. Zebra mussel samples from nine sampling sites in four rivers (1994–2020) were also analysed. Time series span up to 30 years for some sample types. Metagenomics was additionally applied to soil samples to comprehensively characterise microbial communities. Population genomic analyses (pool-sequencing) were performed on eelpout and earthworms, and transcriptomic data from ESB eelpout samples were generated for the first time. The resulting datasets are of high quality, with species detections validated against independent monitoring data: fish communities detected from suspended particulate matter matched expectations from river typology; leaf-associated insect communities were tree-species-specific; bladder wrack-associated taxa corresponded well to conventional hand-sampling results; earthworm casts proved a reliable proxy for soil biodiversity.

**WP 4 – Case studies on long-term biodiversity change:** WP 4 developed five comprehensive scientific case studies based on the time series generated in WP 3, addressing terrestrial, freshwater, and marine ecosystems alike and aiming to identify patterns and potential drivers of biodiversity change. A particular focus was placed on whether the genetic time-series data could be linked to existing physico-chemical environmental data to identify drivers of biodiversity change.

The freshwater case study analysed suspended particulate matter samples from six rivers at 13 monitoring sites over the period 2005–2021. Using eDNA metabarcoding, a total of 63 fish and lamprey species and over 1,700 invertebrate species were detected. Species trends derived from eDNA data showed more than 73 % agreement with results from conventional fish monitoring programmes (WFD, ICPR), confirming the reliability of the retrospective approach. Changes in fish communities were site-specific – species richness declined significantly at some sites while others remained stable or showed slight increases. Overall, species turnover predominated over nestedness; no general homogenisation of fish communities was detected. Particularly striking was the arrival and rapid spread of invasive goby species: the round goby (*Neogobius melanostomus*) was undetectable at the start of the time series in 2005 and increased rapidly in subsequent years, both in signal strength and in the number of sites with positive detections. Additional invasive gobies (e.g. *Babka gymnotrachelus*) could also be tracked in their spread across river systems. The invasion and spread of the quagga mussel (*Dreissena rostriformis*) was similarly reconstructed in detail from zebra mussel samples. Since the SPM samples simultaneously carry long-term physico-chemical monitoring data, correlation analyses between biotic and abiotic data were possible. Chemical and physical stressors – including mercury concentration, chloride content, fine sediment load, water temperature, discharge, and persistent pollutants such as PFAS and pesticides – correlated significantly with fish species richness and composition. The combination of multiple stressors proved highly site-specific, explaining why different monitoring locations show different biodiversity trajectories. More comprehensive multi-stressor analyses incorporating broader water quality datasets are needed for a full mechanistic understanding.

The terrestrial case study on soil communities analysed 54 soil samples from 11 sites in 9 regions of Germany collected between 2002 and 2019 using metagenomics. Species richness of bacteria, fungi, and metazoa remained statistically stable over 17 years, yet community composition shifted substantially – a decoupling that masks deep structural reorganisation. Bacteria and fungi showed signs of increasing homogenisation; soil Metazoa did not. Regarding



drivers, a clear pattern emerged: for microbial communities, land use was the dominant structuring factor, with bacterial communities richest on arable land and poorest in forests, consistent with patterns observed across Europe. For soil Metazoa, however, the site itself – reflecting local biogeographic history and dispersal barriers – was the most important driver rather than land use. This finding underscores that protecting animal soil biodiversity requires site-specific strategies that go beyond blanket land-use management.

The marine case study examined annual blue mussel homogenates (1985–2020) to track the invasion and spread of the Australian barnacle (*Austrominius modestus*) along the German North Sea coast. Relative sequence abundance correlated closely with actual individual counts, enabling semi-quantitative statements on population dynamics. The spread of the invasive species was significantly and positively correlated with rising winter temperatures: while cold winters caused population crashes, more frequent mild winters enabled rapid recovery and enhanced expansion – a clear signal for the role of climate change as a driver. In addition, further invasive and cryptic species – including parasites and microalgae – were detected in the mussel samples for the first time, species that would have been missed by conventional morphological monitoring. The study demonstrates convincingly the potential of the ESB archive as a retrospective early-warning system for biological invasions.

The integrative case study linked time series from terrestrial (leaf samples of beech, spruce, poplar; 1985–2022), marine (blue mussels, bladder wrack; 1985–2021), and freshwater (zebra mussels; 1985–2021) ecosystems. Using a statistical metacommunity model based on island biogeography theory,  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ -diversity trends were compared for 1991–2021. The central finding: no systematic loss of local species richness ( $\alpha$ -diversity) was detected in any ecosystem type. However, community composition changed significantly faster across all ecosystems and organism groups than would be expected without anthropogenic influence – a pattern that can be interpreted as anthropogenically accelerated biodiversity turnover. Direct attribution of the observed change to specific environmental factors was not possible; this underscores the need for further development of environmental statistical methods and integration of more comprehensive environmental datasets.

Further case studies examined various levels of biodiversity. In collaboration with South Korea's sample bank, a comparative analysis of insect decline in native German and Korean forests was conducted. Interestingly, clear differences emerge: while insect diversity in Germany has remained stable over the past 10 years, substantial declines were observed in Korea. This work demonstrates the great value of international sample bank collaboration for the global analysis of biodiversity change.

A further study examined the species diversity of fungi in the canopies of beech and spruce trees over time. The results show a markedly faster change in species composition in the non-native spruce than in the native beech.

An investigation of the genetic diversity of tree canopy-associated insect species was carried out using an eDNA metabarcoding dataset on insect biodiversity from tree canopies. The analysis demonstrates the suitability of metabarcoding time series for reconstructing information on the genetic diversity of diverse species across space and time.

In addition to generating metabarcoding data, the suitability of ESB samples for studying intraspecific genetic variation, adaptive potential, and physiological stress signals was also investigated, using the eelpout as the model species. Population genomic studies of this fish reveal adaptation to the reduced salinity of the Baltic Sea, but only limited evidence of rapid adaptation to climate change. A genomic study covering large parts of this fish's range was made possible through close collaboration with the Swedish sample bank, which also samples this

indicator species. Additionally, genome-wide gene expression in the eelpout was measured over time using RNA sequencing. Since RNA molecules are highly unstable, the ESB's cryopreservation plays a decisive role here. The results show that cryopreserved UPB samples are even suitable for examining the individual stress status of species.

**WP 5 – Efficient use of data for environmental and nature conservation:** WP 5 aimed to translate project results into practical value for regulatory authorities and nature conservation. A scientific advisory board comprising experts from research, government agencies, and conservation practice was established and met annually to review results and recommend further analyses. The project identified concrete interfaces with legal frameworks and biodiversity policy cycles at national and European level. A joint closing workshop in March 2025 produced ten recommendations, covering the organisational and financial mainstreaming of genetic analyses in the ESB, linkage to statutory monitoring programmes (Water Framework Directive, Habitats Directive, Marine Strategy Framework Directive), development of new genetic indicators for environmental policy, and greater use of AI-supported statistical approaches.

**WP 6 – Public and expert communication:** WP 6 covered the entire communication and knowledge transfer strategy of the project. The scientific community was reached through numerous contributions at national and international conferences, including several plenary lectures at major meetings. Multiple peer-reviewed publications have already been accepted; further manuscripts are in preparation. International delegations from South Korea and South Africa visited the project; a first joint publication with the Korean specimen bank has emerged. The general public was engaged through the project website ([trenddna.de](https://trenddna.de)), exhibition formats, Science Slams, Girls' Day events, the City Campus Trier, and children's university lectures. A popular science article on the project's results is in press in "Biospektrum". All datasets generated within the project are freely available in open repositories in accordance with FAIR principles.

**Early-career researcher support and overall conclusions:** The project provided substantial support for early-career researchers. A total of 25 young scientists participated, including students at bachelor's and master's level as well as three doctoral researchers who have completed or are completing their PhD theses based on TrendDNA data. The overall results of the TrendDNA project demonstrate convincingly that the German Environmental Specimen Bank holds enormous potential as a long-term genetic archive for integrated, retrospective biodiversity monitoring. The samples enable assessments of biodiversity trends spanning from intraspecific genetic diversity to ecosystem-level change – providing unique information for research, regulatory environmental surveillance, and nature conservation decision-making in Germany. It is important to further develop the implementation of the proposed solutions in the ESB routine programme.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das TrendDNA-Projekt

### 1.1.1 Motivation des Projekts

Globale Ökosysteme sind derzeit einem nie dagewesenen anthropogenen Wandel ausgesetzt. Klimaerwärmung, Umweltverschmutzung, Intensivierung der Landnutzung und die Einwanderung invasiver Arten setzen Lebensgemeinschaften unter zunehmenden Druck (IPBES, 2019; Keck et al., 2025; Newbold et al., 2015). Dies führt zum Verlust zahlloser Arten und damit auch ihrer unverzichtbaren Ökosystemleistungen (Marques et al., 2019). Allein die Bestäubungsleistung von Insekten trägt zu einem erheblichen Anteil der globalen Lebensmittelversorgung bei, Berechnungen schätzen einem kommerziellen Wert dieser Leistung von 150 Milliarden Euro jährlich (Gallai et al., 2009). Vor diesem Hintergrund ist die Überwachung des Zustandes der Ökosysteme durch ein systematisches Monitoring essenziell, um die Muster, Treiber und Konsequenzen des globalen Ökosystemwandels zu verstehen (Gonzalez et al., 2023; Kissling et al., 2026; Leese et al., 2018; Meyer et al., 2015).

Für Deutschland lieferten die Ergebnisse des kürzlich veröffentlichten „Faktencheck Artenvielfalt“ (Wirth et al., 2024) erstmals einen umfassenden Überblick über den Zustand der Arten und ihrer Trends. Hierzu wurden über 6000 Literaturquellen analysiert und über 15 000 Zeitreihen zu Tier- und Pflanzenarten ausgewertet. Der Bericht belegt, dass 60 der 93 Lebensraumtypen in Deutschland einen unzureichenden oder sogar schlechten Erhaltungszustand zeigen, bzw. dass ein Trend zur Verschlechterung festzustellen ist. Ebenfalls zeigen die Analysen, dass etwa ein Drittel der Arten in den Roten Listen bestandsgefährdet sind. Der Bericht wurde durch das Fehlen standardisierter Verfahren zur Erhebung und Analyse von Biodiversitätstrends erschwert. Die Autorinnen und Autoren betonten die Bedeutung eines integrierten, methodisch vereinheitlichten und dauerhaft etablierten Biodiversitätsmonitorings, um repräsentative und valide Daten zu erhalten (Wirth et al., 2024). Da Biodiversitätsdaten jedoch raum-zeitlich wie taxonomisch nach wie vor selektiv und lückenhaft sind, können daraus abgeleitete Trendaussagen systematisch verzerrt sein (Jähnig et al., 2021). Aus Forschungsprogrammen wie LTER-D (Long-Term Ecosystem Research, Deutschland) gibt es für ausgewählte Gebiete und Artengruppen in Deutschland sehr systematisch erhobene Daten (Welti et al., 2022). In diesen Studien werden auch neue Methoden integriert, um umfassender Arten – und teilweise innerartliche Diversität – zu erfassen und in den Kontext mit direkten und indirekten Treibern des Biodiversitätswandels zu setzen (Buchner et al., 2025; Sinclair et al., 2025; Uhler et al., 2021). Die Finanzierung ist allerdings projektbasiert, was eine Langzeitperspektive erschwert. Behörden haben mit den Umwelt-, Natur- und Artenschutzgesetzen verschiedene Monitoringprogramme implementiert, die den Zustand der Ökosysteme und ausgewählter Arten dokumentieren und Daten zum gegenwärtigen Zustand und der Ableitung von Maßnahmen für ihren Erhalt liefern. Die Wasserrahmenrichtlinie (WRRL, 2000/60/EG), die Meeresstrategie-Rahmenrichtlinie (2008/56/EG) und die Flora-Fauna-Habitatrichtlinie (92/43/EWG) der EU sind hierzu drei prominente Beispiele, die von den Bundesländern umgesetzt werden. Daten dieser Monitoringprogramme können genutzt werden, um zukünftige Veränderungen vorherzusagen, sind jedoch für raumzeitlichen Aussagen limitiert, da nur bestimmte Habitate oder Gewässer berichtspflichtig sind und die Erhebungen in der Regel nur alle drei Jahre erfolgen. Biodiversität verändert sich – auch ohne anthropogene Stressfaktoren – oft viel schneller, was die natürliche Dynamik von systematischen Veränderungen schwer abbildbar macht. Zudem verändert sich Biodiversität auf

unterschiedlichen Ebenen. Die Hauptebenen der Biodiversität sind gemäß der Konvention zur Biologischen Vielfalt (CBD 1992):

- **Innerartliche genetische Diversität:** Diese Ebene umfasst die genetische und phänotypische Variation, sowie die Stressantworten innerhalb der Arten. Die Erfassung dieser Parameter erlaubt es, das Anpassungspotenzial von Populationen und den Stresszustand von Individuen zu quantifizieren (z. B. Akbarzadeh et al., 2018). Bevor Arten aussterben, geht oftmals zunächst die innerartliche genetische Diversität verloren (Gendrift). Für eine Erfassung der Veränderungen auf innerartlicher genetischer Ebene wäre ein genetisches Monitoring erforderlich (Clark et al., 2025). Das würde es auch ermöglichen, den Genfluss und damit die Konnektivität fragmentierter Habitate zu quantifizieren (z. B. Weiss & Leese, 2016).
- **Diversität von Artengemeinschaften:** Diese Ebene umfasst alle in einem Lebensraum vorkommenden Arten ( $\alpha$ -Diversität). Die Erfassung von zeitlichen Veränderungen in Artengemeinschaften erlaubt es, Rückschlüsse über den Zustand der Lebensgemeinschaften in einem Habitat abzuleiten. Veränderungen können z. B. durch Habitatverlust, Verschmutzung, Pathogene oder in der Einwanderung invasiver Arten begründet sein (Junk et al., 2023; Keck et al., 2025). Durch den Vergleich der Lebensgemeinschaften verschiedener Standorte und Habitate ( $\beta$ -Diversität) können Einflussfaktoren auf die Artengemeinschaften in der Fläche quantifiziert sowie generelle von ortsspezifischen Trends unterschieden werden (Sinclair et al., 2025).
- **Diversität von Ökosystemen:** Diese Ebene umfasst die Vielfalt unterschiedlicher Lebensraumtypen sowie deren strukturelle und funktionelle Eigenschaften. Ökosysteme werden durch das Zusammenspiel von Lebensgemeinschaften und abiotischen Umweltbedingungen wie Temperatur, Nährstoffverfügbarkeit oder Schadstoffbelastung geprägt. Unterschiede in diesen Umweltbedingungen tragen zur Ausprägung verschiedener Ökosystemtypen bei und beeinflussen gleichzeitig die Artenzusammensetzung und deren Veränderungen (Tews et al., 2004). Zudem können über die Ebene der Arten hinweg funktionelle Änderungen (z. B. Änderungen in funktionellen Ernährungsgruppen) sowie Metriken wie ökologische Zustandsklassen bestimmt werden (Macher et al., 2025; Stat et al., 2017; Y. Zhang et al., 2020).

Behördliche Monitoringprogramme erheben vorwiegend Daten zur Biodiversität auf Artengemeinschaftsebene, teilweise daraus abgeleitet auf Habitat- und Ökosystemebene. Die innerartliche genetische Diversität ist bislang nicht Teil der behördlichen Umweltbeobachtung (Shaw et al., 2025; Wirth et al., 2024). Mit dem Archiv der Umweltprobenbank des Bundes gibt es in Deutschland eine Zeitreihe, die Behördenprogramme – auch retrospektiv – auf allen drei Ebenen der Biodiversitätsbeobachtung unterstützen könnte, um die Muster und Ursachen des Biodiversitätswandels zu erforschen (Zizka et al., 2022).

### 1.1.2 Die Umweltprobenbank des Bundes

Die Umweltprobenbank (UPB) wurde vor über 40 Jahren als Archiv für heimische Ökosysteme gegründet. In den Archiven lagern ausgewählte Proben verschiedener Organismen und Ökosysteme (Meeres-, Süßwasser-, Landökosysteme) für die Beobachtung des Zustands der Umwelt (Kolossa-Gehring et al., 2012). Zu den Probenarten gehören z. B. abiotische Umweltproben wie Böden und Schwebstoffe aus Flüssen, Biotaprobe, d. h. Pflanzen und Tiere als Vertreter der Trophieebenen der beobachteten Ökosysteme: Algen und Bäume, Regenwürmer, Muscheln, Fische, Rehe und Vögel. Die Probennahme, der Transport, die

Probenprozessierung und -lagerung erfolgen mit hoch-standardisierten Verfahren. Damit die chemische und biologische Integrität der Proben gewährleistet ist, werden die Proben bereits im Feld mit flüssigem Stickstoff auf ultratiefen Temperaturen (unter -150 °C) gekühlt und bleiben in der Regel bei diesen (Stoeppeler et al., 1990). Die Proben lagern unter dem Flüssigkristallisationspunkt, alle chemischen und biologischen Prozesse kommen somit zum Stillstand. Damit stellen sie ein genaues Abbild ihres Zustands vor dem Einfrieren dar – inklusive DNA und RNA und somit der Erbinformation der in der Probenart enthaltenen Organismen (Junk, Frank, et al., 2025).

### **1.1.3 Potenzial der Umweltprobenbank für ein Biodiversitätsmonitoring**

Aufgrund der Konservierungsmethoden steht mit den Proben der UPB genetisches Material für Analysen zur Biodiversität zur Verfügung. Für archiviertes Probenmaterial einzelner Arten – die Biotaprobenn – können dadurch grundsätzlich Veränderungen in der innerartlichen, genetischen Diversität oder in Stressantworten, z. B. über Genexpressionsmessungen über die Zeit, adressiert werden. Für die eingelagerten Umweltproben wie Böden und Schwebstoffen kann über Umwelt-DNA (engl. environmental DNA oder eDNA) die Artgemeinschaft in dem Lebensraum bestimmt werden. Diese eDNA-Spuren gelangen in die Umweltproben Proben, da Organismen DNA-Spuren in der Umwelt hinterlassen (Deiner et al., 2017; Taberlet et al., 2018). Dadurch können Analysen zu Veränderungen von Lebensgemeinschaften in Raum und Zeit über eDNA adressiert werden. Auch Biotaprobenn einzelner Pflanzenarten, wie z. B. Blattproben von Fichte, Kiefer, Pyramidenpappel und Buche, können auf Spuren tierischer eDNA untersucht werden, um z. B. Insektendiversität in der Baumkrone zu analysieren. Andere Biotaprobenn, insbesondere Muscheln und Schwämme, bieten großes Potenzial als natürliche „eDNA-Sammler“: Sie filtern die Wassersäule aktiv nach organischen Nahrungspartikeln und nehmen dadurch zahlreiche Arten als Nahrungspartikel auf (Jeunen et al., 2023; Mariani et al., 2019). Entsprechend besitzen die Biotaprobenn das Potenzial auch Einblicke in die Lebensgemeinschaften im Lebensraum der Muscheln zu liefern. Wie gut die etablierte Probenahme-strategie der UPB, die bislang nur für das Monitoring von Chemikali-entrends genutzt wird, auch für die Analyse von Biodiversitätstrends geeignet ist, wurde bislang kaum geprüft.

### **1.1.4 Ein Forschungs- und Entwicklungsprojekt zur Prüfung des Potenzials**

UBA hat 2020 das vorliegende Projekt als Pilotstudie vergeben, um das Potenzial genetischer Methoden für Biodiversitätsanalysen von der Ebene der innerartlichen genetischen Diversität bis zur Ökosystemdiversität mit der UPB zu prüfen. Explizit stand die Beantwortung der folgenden drei Leitfragen im Zentrum der Untersuchung.

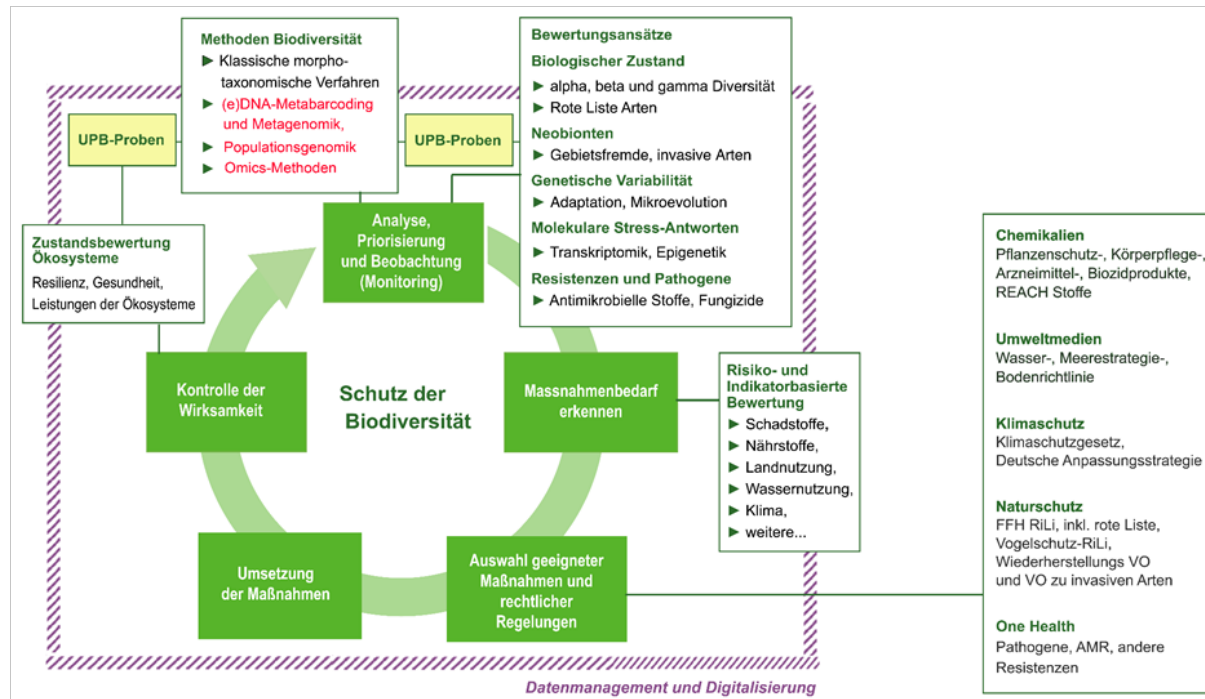
#### **Leitfragen des TrendDNA-Projekts**

- ▶ Welche Probenarten der UPB sind für genetische Untersuchungen geeignet, um die aktuelle und zeitliche Entwicklung der biologischen Vielfalt und andere genetische Endpunkte in den Probenahmegebieten abzubilden?
- ▶ An welchen aktuellen Forschungsfragen zur Beschreibung der biologischen Vielfalt und ihrer Veränderung kann die UPB mitarbeiten?
- ▶ Wie kann die UPB den behördlichen Umweltschutz und die Umweltbeobachtung des Bundes und der Länder mit genetischen Daten unterstützen?



Basierend auf den Ergebnissen sollte geprüft und an konkreten Fallbeispielen gezeigt werden, wie mit den vorhandenen und zukünftig gewonnenen Daten der UPB neben der Forschung die behördliche Umweltbeobachtung und konkrete rechtliche Maßnahmen bestmöglich unterstützt werden können (**Abbildung 1**). Auf die F+E-Projektausschreibung hat sich ein Konsortium aus Forschenden von vier Forschungsinstitutionen gemeinsam beworben: die Universität Duisburg-Essen (UDE, Leitung), die Universität Trier (UT, Koordination), das Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie (F-IME) und die Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung (SGN).

**Abbildung 1: Der Politikzyklus zum Schutz der Biodiversität**



Im Kontext des TrendDNA-Projekts stand insbesondere die Frage, wie genetische Methoden (rot, links oben) und die Probenotypen der Umweltprobenbank (gelbe Boxen), zur Analyse von Biodiversitätstrends sowie der Kontrolle von Maßnahmen effektiv eingesetzt und in ein effizientes und Datenmanagement (violetter Rahmen) eingebunden werden können. Quelle: Umweltbundesamt.

## 1.2 Das TrendDNA-Lösungs- und Umsetzungskonzept

Mit dem TrendDNA-Projekt hat das Konsortium ein Lösungskonzept erarbeitet, um innerhalb von vier Jahren die drei Leitfragen der Ausschreibung in sechs Arbeitspaketen (APs) zu untersuchen (**Abbildung 2**).

### 1.2.1 Arbeitspaket 1 – Auswahl geeigneter Proben und Methoden für genetische Untersuchungen

Ziel dieses Arbeitspakets war es, eine begründete Auswahl für die Proben aus der UPB zu treffen, die im Projekt weiter untersucht werden sollten. Grundlage dafür war eine systematische Analyse der Qualität der isolierten Nukleinsäuren. Als Methoden standen DNA-Metabarcoding, Metagenomik, Populationsgenomik und Transkriptomik zur Verfügung (siehe Kapitel 2.1). Es wurde exemplarische Probenarten mit diesen Verfahren analysiert, um ihr Potenzial zur Überwachung verschiedener Ebenen der Biodiversität zu prüfen (insbesondere probentypspezifische Protokolle, inklusive Replikationsstrategien für zuverlässige Ergebnisse).

Teil dieses Arbeitspakets war es außerdem, digitale Werkzeuge und Datenbanken sowie ein übergeordnetes Datenmanagementkonzept für die Durchführung der Analysen zu identifizieren und vorzuschlagen.

## 1.2.2 Arbeitspaket 2 – Operationalisierung

Ziel dieses Arbeitspakets war es, Optionen und Wege der Integration möglicher genetischer Analyseverfahren in die Verfahrensabläufe der UPB zu erarbeiten und zu validieren. Die Probenahmen folgen hochgradig standardisierten Protokollen. Es ist für jeden Arbeitsschritt erforderlich, Kontaminationen zwischen den unterschiedlichen Proben zu vermeiden. Zunächst wurden daher die internen Betriebsabläufe eingehend auf potenzielle Kontaminationsquellen getestet. Im Fokus standen die Oberflächen der Arbeitsplätze in den Laboren und die Werkzeuge im Feld, die mit sämtlichen Proben direkt oder indirekt in Kontakt kamen. Das umfasst z. B. Skalpelle, Pinzetten und die Kryomühle. Zudem wurde untersucht, ob Proben tatsächlich die Biodiversität an einem Standort umfassend abbilden. Zu diesem Zweck wurden Biodiversitätsmuster der UPB-Proben mit weiteren Biodiversitätsdaten am Standort aus anderen Messprogrammen verglichen, z. B. eDNA-Biodiversitätsdaten der Schwebstoffprobe aus den Flüssen mit den Daten, die aus den Berichten aus WRRL oder z. B. Rheinmessprogramm verfügbar waren (siehe **Kapitel 5.1**). Zudem wurde am Beispiel der Schwebstoffprobe geprüft, inwieweit es sinnvoll ist, die Untersuchung der Biodiversität mit Jahresmischproben durch Monatsproben zu ergänzen.

Abbildung 2: Übersicht über das Lösungs- und Umsetzungskonzept



Lösungs- und Umsetzungskonzept der Auftrag- und Unterauftragnehmer, gegliedert nach den Arbeitspaketen der Leistungsbeschreibung. Arbeitspakete 5 und 6 (grün) wurden über die gesamte Projektlaufzeit ausgeführt. Arbeitspakete 4 und 7 wurden im Bericht zu insgesamt neun Studien zusammengefasst. Quelle: eigene Darstellung, UDE.



### **1.2.3      Arbeitspaket 3 – Untersuchung der Proben mit genetischen Methoden**

Basierend auf AP 1 und AP 2 wurden Biodiversitäts-Zeitreihen aus terrestrischen, limnischen und marinen Proben generiert. Der Fokus lag hauptsächlich auf der DNA-Metabarcoding-Methode zur Analyse von Lebensgemeinschaften. Dadurch konnten umfassende Informationen über die zeitliche Veränderung der Artenzusammensetzung in den verschiedenen Ökosystemen zusammengetragen und die Einwanderung invasiver Arten zurückverfolgt werden. Ein Unterziel der Untersuchungen war die Überprüfung der taxonomischen Reinheit der Proben. Eine Kontamination kann zusätzlich zu den in AP 2 adressierten Aspekten auch dadurch entstehen, dass morphologisch ähnliche Arten mit der Zielart verwechselt werden und so in die Probe gelangen. Darüber hinaus wurden Genom- und Transkriptomanalysen genutzt, um innerartliche genetische Variation und die Veränderung von Genexpression über die Zeit zu untersuchen.

### **1.2.4      Arbeitspaket 4 – Fallstudien zur Veränderung der Biodiversität über die Zeit**

Basierend auf den Zeitreihen aus AP 3 folgten in AP 4 umfassende wissenschaftliche Fallstudien, ergänzt durch zusätzliche „*Proof-of-Principle*“-Fallstudien (ursprünglich als AP 7 bezeichnet, hier mit AP 4 fusioniert). In diesen Fallstudien sollten für terrestrische, limnische und marine Ökosysteme auf Basis der erarbeiteten Daten Muster und mögliche Treiber des Biodiversitätswandels identifiziert werden. Zusätzlich sollten Schnittstellen für die behördliche Umweltbeobachtung (**Abbildung 2**) und weitere methodische Tests initiiert werden. Ursprünglich waren fünf Fallstudien und drei optionale Studien geplant. Final wurden vier ausführliche Fallstudien, sowie fünf optionale Studien (Methodentest, explorative Analyse spezifischer Fragestellungen an Teilen der verfügbaren Zeitreihen) ausgeführt.

### **1.2.5      Arbeitspaket 5 – Effiziente Verwertung der Daten für Umwelt- und Naturschutz**

Ziel dieses Arbeitspakets war es, die Verwertungsoptionen der Projektergebnisse über die spezifischen Fallstudien in AP 4 hinaus zu identifizieren. Da die Projektergebnisse wertvolle neue Daten zum Biodiversitätswandel in Deutschland liefern und somit unmittelbar den Naturschutz heimischer Ökosysteme beitragen, wurde zur besseren Verwertung ein Beirat von Expertinnen und Experten aus der universitären Forschung und der behördlichen Praxis gegründet. Dem Beirat wurden in jährlichen Treffen die Projektergebnisse vorgestellt. Die Empfehlungen des Beirates wurden im Projektfortschritt umgesetzt sowie generelle Empfehlungen aus einer internationalen Tagung an der UDE sowie einem gemeinsamen Workshop mit Beiratsmitgliedern abgeleitet.

### **1.2.6      Arbeitspaket 6 – Informieren der Allgemeinheit und der Fachöffentlichkeit:**

Eine wichtige vom Förderer gewünschte Leistung war das Informieren der Fachöffentlichkeit aus Forschung und Praxis sowie der Allgemeinheit über den Projektfortschritt. Hierzu wurden in AP6 Zielgruppen, Inhalte, Formate und Kanäle identifiziert und der Transfer mit spezifischen Strategien realisiert.

Im Folgenden werden Ergebnisse des Projekts vorgestellt, um die drei Hauptfragen des Projekts zu beantworten.

## 2 Auswahl geeigneter Methoden und Proben für genetische Untersuchungen mit der Umweltprobenbank

Zu Beginn des Projekts wurden geeignete genetische Verfahren und Probenarten der UPB identifiziert. Im Folgenden werden zunächst die ausgewählten genetische Methoden für Biodiversitätsanalysen der archivierten Proben näher mit ihren Vor- und Nachteilen erläutert. Anschließend wird dargestellt, welche Probentypen sich für die genetischen Analysen auf den verschiedenen Biodiversitätsebenen eignen. Hierbei werden zunächst technische Aspekte, speziell die Qualität und Quantität der extrahierten Nukleinsäuren, adressiert. Anschließend wird auf besonders wichtige Aspekte der Daten, insbesondere Reinheit der Probe und Plausibilität der Resultate, eingegangen. Die Ergebnisse der Methoden- und Probenevaluation sind in **Tabelle 2** zusammengefasst.

### 2.1 Identifizierte Methoden für die Untersuchung der Biodiversität aus den Proben

#### 2.1.1 DNA-Metabarcoding

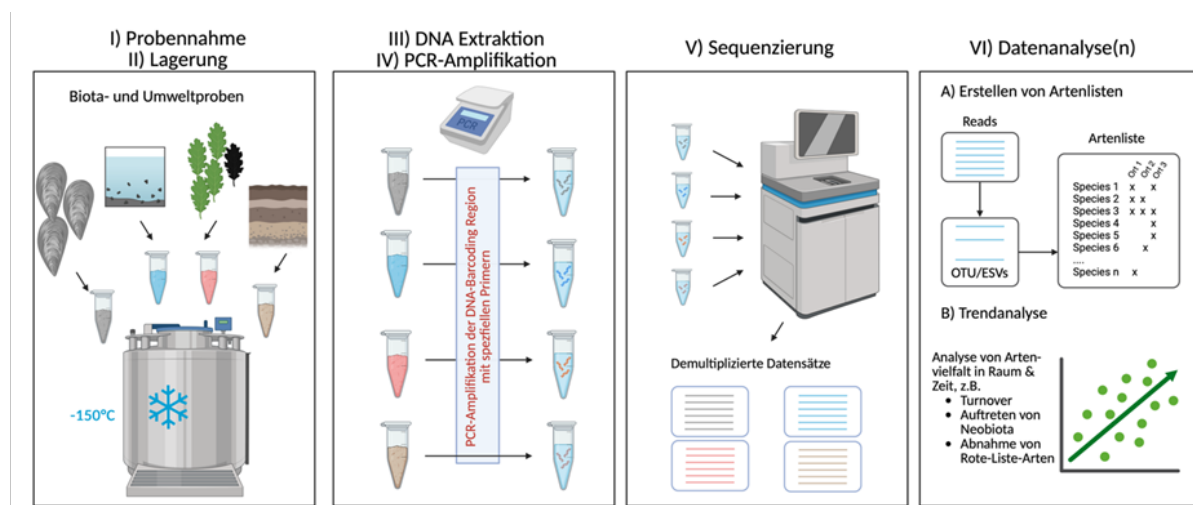
DNA-Metabarcoding ist eine genetische Methode, mit der die Artzusammensetzung einer Biota- oder Umweltprobe bestimmt werden kann. Der erste Schritt der Probenanalyse ist die Extraktion der (e)DNA. Sowohl für Biota als auch für Umweltproben wird hierzu eine geringe Menge der Probe, ggf. nach vorheriger mechanischer Zerkleinerung des Materials in einer Kryomühle, biochemisch extrahiert (Abbildung 3). Ist die DNA extrahiert, wird eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt, in der ein charakteristisches Markergen (DNA-Barcode) vervielfältigt wird. Hierzu werden sogenannte Primer (kurze DNA-Stücke) eingesetzt, mit denen ein Fragment des DNA-Barcodes möglichst aller Zielorganismen der Probe vervielfältigt (amplifiziert) werden soll. In dem Projekt wurden folgende Genmarker verwendet:

- ▶ Wirbellose – Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit I-Gen (COI) + 18S rRNA-Gen (18S)
- ▶ Wirbeltiere – 12S rRNA-Gen (12S) + 18S rRNA-Gen (18S)
- ▶ Bakterien – 16S rRNA-Gen (16S)
- ▶ Pilze – Internal Transcribed Spacer 1 bzw. 2 (ITS1/2)

Die DNA-Fragmente, auch „Amplicons“ genannt, werden auf einem Hochdurchsatzsequenzierer ausgelesen. So entstehen Millionen von Sequenzen, auch „Reads“ genannt. Damit die Biodiversität aus der Probe erfasst werden kann, müssen die Sequenzen bioinformatisch analysiert werden. Dazu müssen sie zuerst mithilfe der während der Laborprozessierung zusätzlich eingefügten Kennsequenzen (sog. Indexe) in die Proben aufgeteilt werden. Anschließend folgen einige Schritte zur Aufreinigung der Daten und zur Sicherstellung der Qualität. Für die Erstellung von Taxalisten werden die Sequenzen abschließend nach ihrer Ähnlichkeit zusammengefasst. Dabei werden entweder Sequenzgruppen mit einem bestimmten Grenzwert (z. B. maximal 3 % paarweise Distanz) als sogenannte Operationelle Taxonomische Einheiten (engl. operational taxonomic units, OTUs) oder individuelle Sequenzvarianten (engl. exact sequence variants, ESVs) bioinformatisch herausgefiltert. Die Sequenzen der OTUs oder ESVs werden anschließend gegen eine Barcode-Referenzdatenbank verglichen (z. B. Barcode of Life Data system, BOLD; Ratnasingham & Hebert, 2007). So können ihnen taxonomische Namen zugeordnet werden. Mit der finalen Taxaliste können dann weitere ökologische Analysen durchgeführt werden.

Wichtig ist, dass es für alle Schritte unterschiedliche Methoden gibt, mit denen das entsprechende Ziel erreicht werden kann. Insbesondere die Wahl der Primer und die bioinformatischen Methoden haben einen großen Einfluss auf die Ergebnisse und müssen daher vorher sorgfältig geprüft werden. Mit gut etablierten Metabarcoding-Protokollen können grundsätzlich sehr robuste Daten generiert werden, mit denen die Arten eines Standorts zuverlässig nachgewiesen werden. Allerdings hat das DNA-Metabarcoding eine Schwäche: In der im Verfahren genutzten PCR wird die DNA der unterschiedlichen Arten nicht gleichmäßig amplifiziert; es gibt also immer Arten, die erheblich überrepräsentiert sind. Daher kann man von der Anzahl erhaltener Sequenzen einer Art nicht auf ihre Häufigkeit in der Probe schließen (quantitativer Bias, auch Primer-Bias genannt, siehe Elbrecht & Leese, 2015; Krehenwinkel et al., 2017). Es ist also nur möglich zu sagen, ob eine Art an einer Stelle vorkommt, aber nicht wie viele Individuen einer Art in der Probe enthalten sind. Ein Vorteil der Methode ist, dass sie nur auf kurzen Gen-Abschnitten basiert (z. B. Leese et al., 2021; Yeo et al., 2020) und dadurch auch für teilweise degradierte DNA-Proben genutzt werden kann (Elbrecht et al., 2017; Tournayre et al., 2020; Vamos et al., 2017).

**Abbildung 3: Schematischer Ablauf einer DNA-Metabarcoding-Analyse mit Proben aus der Umweltprobenbank von Probenahme (links) bis zur finalen Datenanalyse (rechts)**



Quelle: Leese (2026). Erstellt in BioRender, <https://BioRender.com/b2g6nqg> CC-BY-4.0.

### 2.1.2 Metagenomik

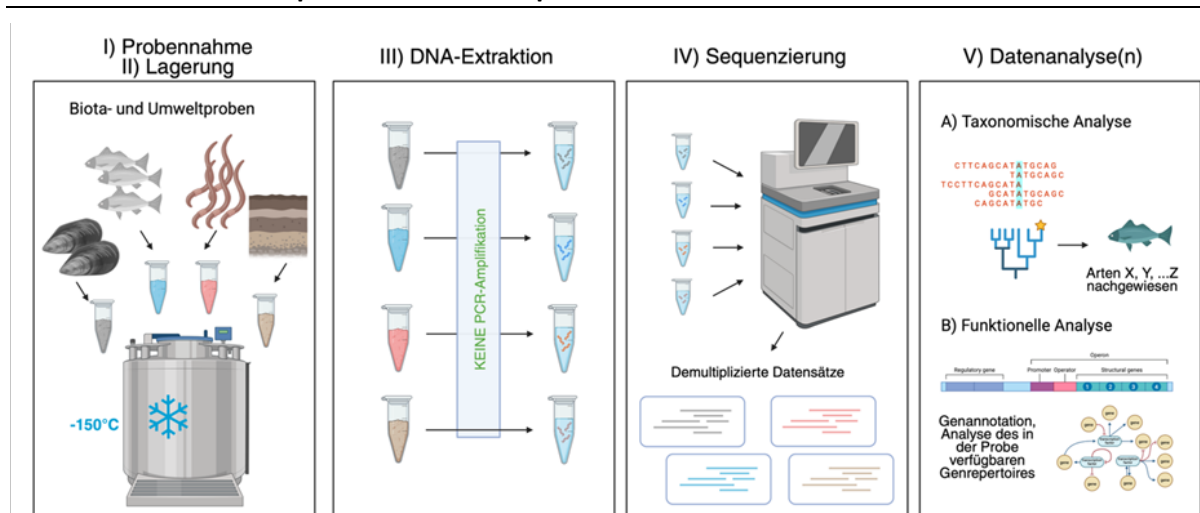
Metagenomik ist eine Methode zur Sequenzierung der gesamten DNA einer Umweltprobe, die meist zur Charakterisierung von Mikroorganismen-Gemeinschaften genutzt wird (Grossart et al., 2020). Mögliche Ziele der Anwendung dieser Methode können die taxonomische Klassifizierung, die funktionelle Analyse sowie die Zusammensetzung des gesamten Genoms einer Art sein. Da Metagenomik auf eine PCR verzichtet, ist diese Methode wesentlich weniger anfällig für quantitativen Bias. Daher erlauben metagenomische Daten im Gegensatz zu Metabarcoding-Daten auch die Quantifizierung der nachgewiesenen Arten in einer Gemeinschaft.

Für die Metagenomik wird die DNA einer Umweltprobe zunächst unter möglichst sterilen Bedingungen extrahiert und dann für die Sequenzierung vorbereitet (Abbildung 4). Die Sequenzierung wird mithilfe der sogenannten Hochdurchsatzsequenzierung durchgeführt. Aufgrund der vielen Genfragmente, die bei der Sequenzierung entstehen, wird diese auch Shotgun-Sequenzierung genannt. Nach der Sequenzierung beginnt die bioinformatische Verarbeitung der Datensätze. Der erste Schritt ist es, die Sequenzen ihren Proben zuzuordnen.

Dazu werden während der Laborprozessierung hinzugefügte Kennsequenzen (Indexe) verwendet. Anschließend werden unterschiedliche Filterschritte zur technischen Qualitätssicherung durchgeführt (z. B. *paired-end merging*, *adapter trimming*, *quality filtering* etc.). Daraufhin werden die Sequenzen mithilfe einer Referenzdatenbank taxonomisch einer Art oder funktionell bestimmten Genen (z. B. für stickstoffverarbeitende Enzyme kodierende Gene) zugeordnet. Referenzdatenbanken umfassen bereits bekannte Sequenzen von bestimmten Arten und können daher genutzt werden, um die unbekannten Sequenzen der Probe taxonomisch zuzuordnen (Collins et al., 2023; Schneider et al., 2021). Soll das Genom einer Art analysiert werden, werden die einzelnen DNA-Fragmente wieder zu einem langen DNA-Strang assembliert.

Ein Nachteil dieser Methode ist zum einen der hohe Kostenfaktor. Da in einer Umweltprobe die Genome von vielen Milliarden, insbesondere mikrobiellen Organismen vorliegen, muss eine extrem hohe Sequenziertiefe gewählt werden, um die DNA-Barcode-Regionen der Zieltaxa zu sequenzieren (Stat et al., 2017). Zum anderen existieren für den Großteil der Sequenzen noch keine Referenzdatenbanken für die taxonomische Zuweisung (A. Schmidt et al., 2022). Entsprechend ist sowohl die Artbestimmung für viele Genomsequenzen als auch die funktionelle Zuordnung mitunter schwierig. Vorteilhaft ist jedoch die Möglichkeit, Rückschlüsse auf die Biomasse einzelner Arten ziehen zu können (Lu et al., 2017), sowie die Tatsache, dass funktionelle Gene nachgewiesen werden können, die z. B. für spezifische Funktionen wie Schadstoffabbau, Antibiotika- und Fungizidresistenzen) kodieren (Hugenholtz & Tyson, 2008).

**Abbildung 4: Schematischer Ablauf einer metagenomischen Analyse unterschiedlicher Biota- und Umweltproben der Umweltprobenbank**



Eine Sequenzierung der DNA-Moleküle erfolgt in Schritt IV ohne vorherige Vervielfältigung in einer PCR. Die Daten können anschließend für eine taxonomische Analyse zur Bestimmung der Lebensgemeinschaften oder zur Analyse der funktionellen Genzusammensetzung genutzt werden. Quelle: Leese (2026). Erstellt in BioRender, <https://BioRender.com/8hkr090>. CC-BY-4.0

### Kultivierung von Mikroben und Artbestimmung durch DNA-Metabarcoding/-genomik

Die Lagerung von Proben bei ultratiefen Temperaturen (unter  $-150^{\circ}\text{C}$ ) bringt alle biologischen Prozesse zum Stillstand. Das Einfrieren muss aber für die betroffenen Organismen nicht zwingend zum Tod führen. Viele Mikroben sind dafür bekannt, längeres Einfrieren bei ultratiefen Temperaturen zu überleben. Daher bieten Proben der UPB möglicherweise die Option, mikrobielle Lebensgemeinschaften aus der Vergangenheit wieder zum Leben zu erwecken. Die wiedererweckten Arten könnten dann experimentell z. B. auf ihre Temperaturtoleranz untersucht werden. Allerdings ist die Kultur von Mikroorganismen nicht

einfach, ein Großteil der Mikroben ist gar nicht kultivierbar (Pande & Kost, 2017). Für die kultivierbaren Arten stehen verschiedene Nährmedien zur Verfügung, die jeweils bestimmte Gruppen von Mikroben anreichern (Bonnet et al., 2020). Zur Kultivierung wird das Probenmaterial in das entsprechende Nährmedium gegeben und bei definierten Temperaturen bebrütet. Die im Medium angewachsene Bakteriengemeinschaft kann dann durch DNA-Metabarcoding oder DNA-Metagenomik charakterisiert werden. Alternativ können einzelne Arten aus der Mischung isoliert und auf Nährmedien ausplattiert werden. Diese Arten stehen dann für weitere experimentelle Arbeiten zur Verfügung.

### **2.1.3 Genomsequenzierung und Populationsgenomik**

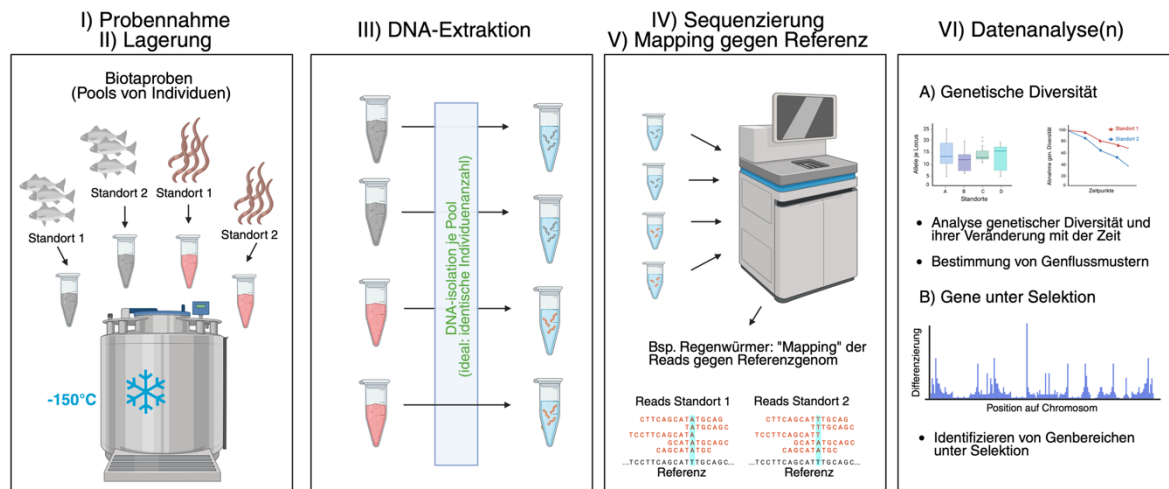
Die archivierten Biotaprobe sind Populationsstichproben einzelner Arten. Die Zielmenge der Probenahme beträgt je nach Probenart 1-2 kg pro Probe und besteht aus etwa 20 (Brassen) bis zu hunderten (Aalmuttern) oder tausenden (Dreikantmuscheln) Individuen. Jedes Individuum gelangt mit seiner gesamten Erbinformation, dem Genom, in die Proben. Moderne Sequenzierverfahren ermöglichen es, auch komplexe Genome zu sequenzieren, und bieten vielfältige Möglichkeiten für die Untersuchung der genetischen Vielfalt von Probenbank-Arten (Theissinger et al., 2023). Einige Veränderungen des Genoms erlauben es Arten, sich an Umweltstress anzupassen, sogenannte Adaptationen. Die genetische Vielfalt einer Population kann also Hinweise auf ihr Anpassungspotenzial geben. Nach der Sequenzierung der DNA-Fragmente eines einzelnen Organismus aus der Probe kann das Genom bioinformatisch bis auf Chromosomenebene zusammengesetzt werden (Formenti et al., 2022). Diesen Vorgang nennt man „Assemblieren“. Das assemblierte Genom kann dann beispielsweise als Referenzgenom für Zeitreihenanalysen verwendet werden.

Nach der Genomsequenzierung können populationsgenomische Analysen durchgeführt werden, um genomische Veränderungen in den einzelnen Populationen über die Zeit sowie zwischen den Standorten nachzuverfolgen (**Abbildung 5**). Wirken veränderte Umweltbedingungen auf die Individuen einer Population, so kann es durch natürliche Selektion zur systematischen Veränderung des Genpools kommen. Mit modernen statistischen Verfahren können Signaturen im Genom, die auf Anpassungen hinweisen, detektiert werden (Stephan, 2019; Weigand & Leese, 2018). Durch die Analyse dieser Signaturen kann das Potenzial einer Art beurteilt werden, auf den globalen Wandel mit evolutionärer Adaptation zu reagieren.

Mit populationsgenomischen Analysen ist es auch möglich, die Veränderung der genetischen Vielfalt einer Population über die Zeit zu messen. Dafür wird die Alleldiversität pro Genort oder sogenannte SNPs (engl: Single Nucleotide Polymorphisms, auf deutsch: Punktmutationen) in den Proben ermittelt und ihre Veränderung über die Zeit erfasst. Der Verlust genetischer Vielfalt heimischer Arten ist als Umweltproblem bekannt (Shaw et al., 2025). Populationsgenomik wird üblicherweise an Einzelproben einer Art vorgenommen; jedes Individuum ist eine einzelne Probe. Die Proben der UPB enthalten mehrere Individuen. Dafür bietet sich das Verfahren der Pool-Sequenzierung an, bei dem die Untersuchung populationsgenetischer Muster aus Mischproben erfolgt (Kofler, Orozco-terWengel, et al., 2011; Schlötterer et al., 2014).



**Abbildung 5: Schematischer Ablauf einer populationsgenomischen Analyse basierend auf Biotapen der Umweltprobenbank des Bundes**



DNA aus Homogenaten vieler Individuen (z. B. Regenwürmer) von einem Zeitpunkt und Standort werden sequenziert und die Sequenzen gegen ein Referenzgenom verglichen („gemapped“). Anschließend werden die Frequenzen von Punktmutationen (SNPs) je Standort/Zeitpunkt bestimmt und die Daten für Analysen zur genetischen Diversität genutzt. Quelle: Leese (2026). Erstellt in BioRender, <https://BioRender.com/62v6avh> CC-BY-4.0

## 2.1.4 Transkriptomik

Die Genexpressionsanalyse (**Abbildung 6**) hilft bei der Beantwortung der Frage, welche Gene in Organismen bei veränderten Umweltbedingungen an- oder abgeschaltet werden, bzw. hoch- oder runterreguliert. Jede Zelle eines Organismus hat ein identisches Erbgut (Genom). Allerdings verwenden die Zellen immer nur den Teil ihrer Gene, den sie für ihre Aufgaben im Organismus benötigen. Muskelzellen haben z. B. mechanische Eigenschaften, während Zellen der Bauchspeicheldrüse Insulin produzieren. Die Zellen unterscheiden sich demnach in ihrem Transkriptom – also dem Muster der jeweils aktiven Gene –, das bestimmt, welche Boten-RNA (mRNA) abgelesen und in funktionale Proteine umgesetzt wird. Die Aktivität einzelner Gene kann als Reaktion auf Umweltreize herauf- oder herabreguliert werden. Hier setzt die Genexpressionsanalyse oder auch Transkriptom-Analyse an (Stark et al., 2019) und misst die Konzentration der mRNA bekannter Gene.

Für eine Genexpressionsanalyse können die zu untersuchenden Zellen oder Organismen vorab verschiedenen experimentellen Bedingungen ausgesetzt werden (z. B. höheren oder niedrigeren Temperaturen), um anschließend die unterschiedlich exprimierten Gene im experimentellen Kontext zu vergleichen. Alternativ können Proben untersucht werden, die im Feld entweder über die Fläche oder über die Zeit veränderten Umweltbedingungen ausgesetzt waren. So können z. B. Populationen einer Art aus warmen und kalten Regionen verglichen werden. Für die Proben einzelner Probenahmeflächen der UPB bieten sich zudem Zeitreihenuntersuchungen der Genexpression an.

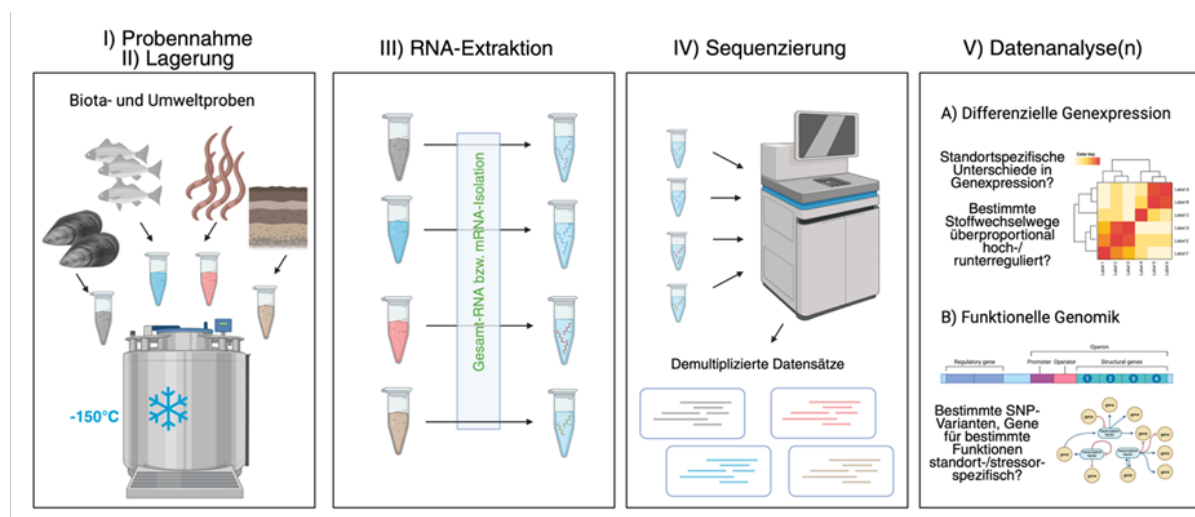
Zur Genexpressionsanalyse wird aus den zu untersuchenden Geweben zunächst die RNA isoliert. RNA ist ein im Vergleich zu DNA sehr instabiles Molekül. Entsprechend musste die Qualität der RNA im Rahmen des Projekts validiert werden.

Nach der RNA-Isolierung erfolgt die Genexpressionsanalyse durch die sogenannte RNA-Sequenzierung auf einem Hochdurchsatzsequenzierer. Im Anschluss werden die erhaltenen Sequenzen mit einem Referenzgenom der entsprechenden Gen-Datenbank abgeglichen



(Kukurba & Montgomery, 2015). So können die Sequenzen den dazugehörigen Genen zugeordnet werden. Wiederholte Experimente ermöglichen den statistischen Vergleich von Gensets in Abhängigkeit von verschiedenen künstlichen Bedingungen. So können durch die Umweltbedingungen beeinflusste Gene identifiziert und untersucht werden.

**Abbildung 6: Schematischer Ablauf einer Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung (=Transkriptomik)**



Für die Datenanalyse (V) werden RNA-Profile des gleichen Probenotyps (z. B. Aalmuttertranskriptom) zwischen verschiedenen Standorten oder über die Zeit hinweg verglichen. Quelle: Leese (2026). Erstellt in BioRender, <https://BioRender.com/m1vsxl8> CC-BY-4.0

## 2.2 Geeignete Probenarten für molekulare Biodiversitätsanalysen

Um die Probenarten zu identifizieren, die grundsätzlich für genetische Analysen brauchbar sind, musste zunächst geprüft werden, ob genügend qualitativ hochwertige Nukleinsäuren (DNA/RNA) extrahiert werden konnte. Zur Prüfung der optimalen DNA-Extraktionsmethoden wurden 24 verschiedene Probenarten freigegeben und durch den Projektpartner F-IME geprüft. RNA wurde für spezifische Biotaparten geprüft. Für die DNA-Qualität wurden für jeden Probenart diverse Protokolle und Kits getestet, um eine maximale DNA-Extraktionsausbeute und eine Minimierung potenzieller Inhibitoren und Kontaminationen im DNA-Extrakt zu erreichen. Zunächst wurden für alle Probenarten zwei Protokolle auf der Grundlage von *Magnetic Beads* getestet: TNE-Protokoll (UDE) und das NucleoMag Tissue Kit (Macherey-Nagel, Deutschland). DNA bindet selektiv an die Beads, während Kontaminationen von der Probe abgewaschen werden. Die DNA-Konzentration und Reinheit wurden mit einem Nanodrop 2000 gemessen, einem Spektralphotometer, das die Absorption von bestimmten Lichtwellenlängen durch DNA-Moleküle misst. Damit kann DNA quantifiziert werden. Außerdem liefert der Nanodrop Informationen zur Reinheit der DNA-Isolation. Die Beurteilung der DNA-Extraktion erfolgte anhand folgender Kriterien:

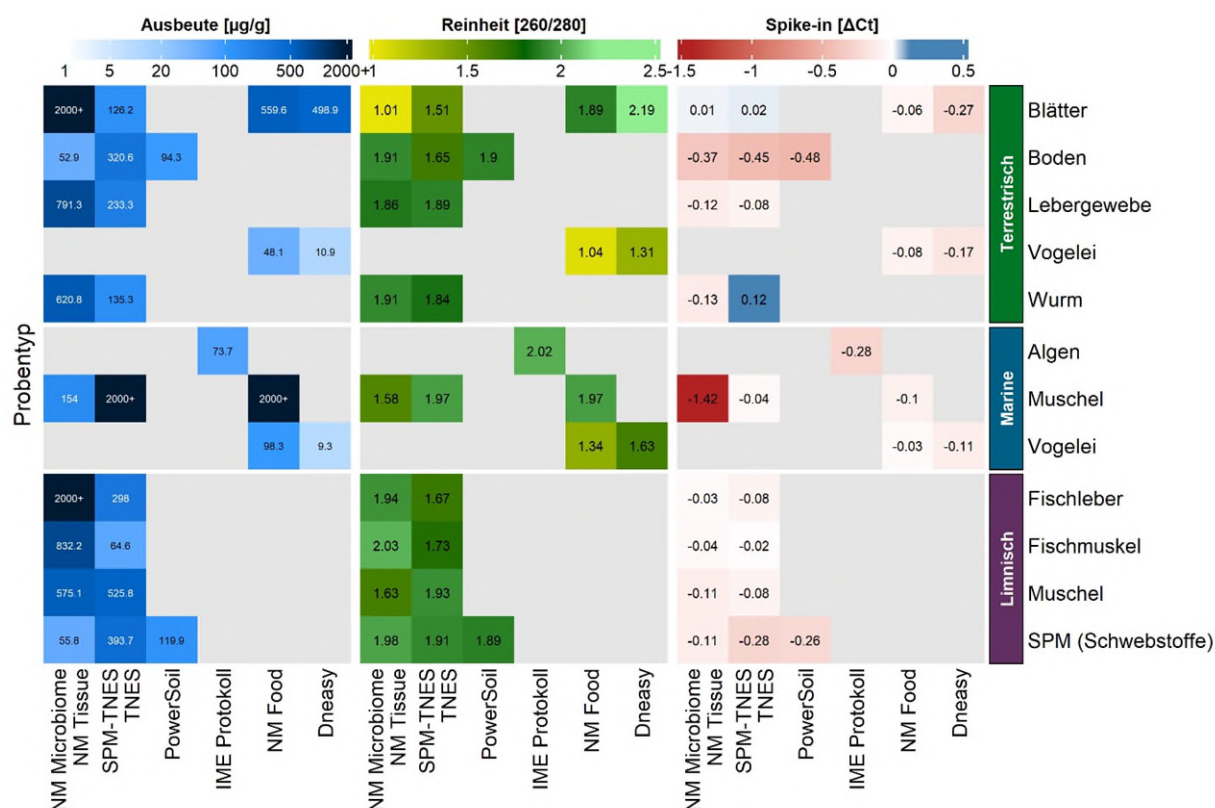
1. DNA-Konzentration und Extraktionsausbeute: Für übliche molekularbiologischen Protokolle wird eine Mindestmenge DNA benötigt. Die gewählte Isolationsmethode sollte daher mindestens eine DNA-Konzentration von 10 ng/µl in der finalen Lösung ergeben. Gemessen wurde die Extraktionsausbeute in Mikrogramm DNA je Gramm eingesetztes Probenmaterial.
2. Reinheit der isolierten DNA: Für die Verwendung in der Molekularbiologie sollte eine isolierte DNA möglichst rein sein, d.h. keine Kontamination durch andere Moleküle beinhalten. Das Verhältnis der Absorption von 260 nm und 280 nm Licht im Nanodrop

wurde als Reinheitsindikator für die DNA-Proben verwendet. Ein Wert von 1,8 gilt als optimal, ein niedrigerer Wert deutet auf Kontaminationen mit z. B. Proteinen hin.

- Existenz von PCR-Inhibitoren: Kontaminationen in einer DNA-Isolation können die folgende PCR inhibieren oder komplett verhindern. Das Vorhandensein solcher Inhibitoren wurde mittels einer quantitativen PCR geprüft. Dabei wird eine PCR-Reaktion mit der Isolation vorgenommen und die Amplifikationseffizienz gegen eine Kontrollprobe (Spike) gemessen. Abgeleitet wird der Parameter „Spike- $\Delta C_t$ “. Ein positiver Wert weist auf eine Inhibition hin.

Die drei Qualitätsparameter wurden für die verschiedenen getesteten Extraktionsmethoden für terrestrische, marine und limnische Probenarten ermittelt. Die Parameter umfassen DNA-Ausbeute ( $\mu\text{g/g}$ ), Reinheit ( $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis) und Spike- $\Delta C_t$ , dargestellt als separate Heatmaps innerhalb der Matrix (**Abbildung 7**). Die Farbverläufe zeigen die Ausprägung jedes Parameters: höhere DNA-Ausbeuten werden in Blau, Reinheitsverhältnisse nahe 1,8 in Grün und Abweichungen im Spike- $\Delta C_t$  in Rot/Blau dargestellt. Insgesamt zeigen die Ergebnisse methoden- und matrixspezifische Unterschiede in der Extraktionseffizienz. Jedoch waren für die meisten Probenarten Ausbeute und Reinheit in einem guten Bereich, wobei einige terrestrische Matrices (z. B. Böden) sowie DNA aus Eiern mit dem Qiagen-Kit geringere Ausbeuten zeigten. Für Details siehe **Anhang A.1**.

**Abbildung 7: Heatmap-Diagramm der DNA-Extraktionsleistung über verschiedene Probentypen der UPB und Protokolle hinweg**

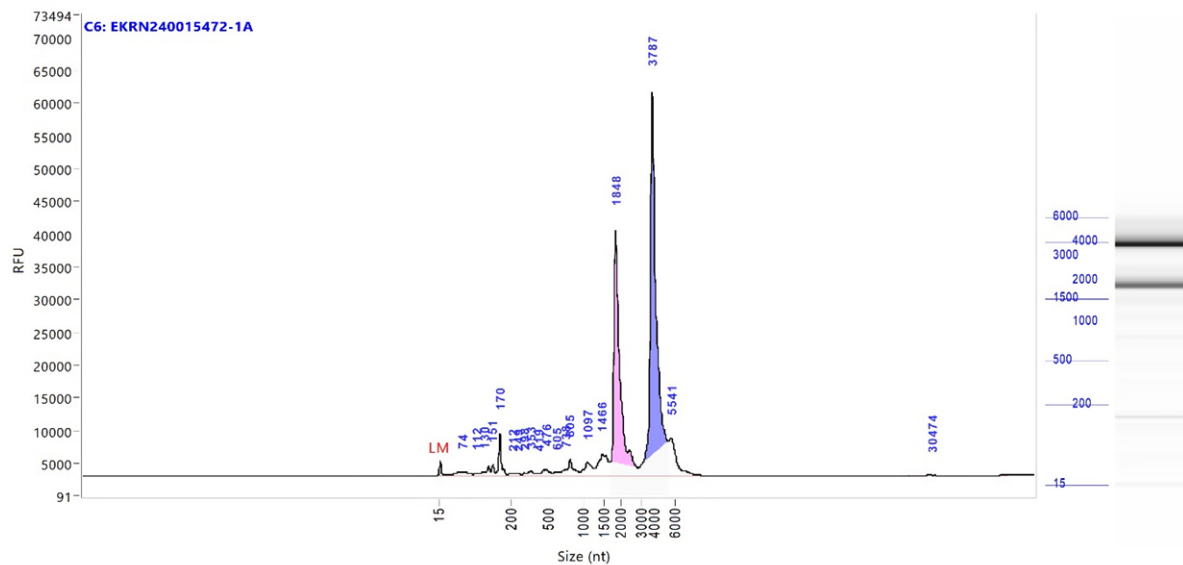


Die Daten zeigen, dass grundsätzlich aus allen Proben mit mindestens einer Methode hohe Ausbeuten erhalten wurden. Eine Übersicht der Protokolle befindet sich im Anhang A.1. Quelle: eigene Darstellung, F-IME.

Zur Analyse der Eignung von Biotaproben zur RNA-Isolation wurde das Qiagen RNeasy Mini-Kit mit Proben der Aalmutter genutzt. Die Isolationen mit diesem Kit wiesen gute RNA-Ausbeuten auf. Da RNA-Moleküle, im Gegensatz zu DNA, sehr instabil sind, wurden die Extraktionen auf Fragmentierung geprüft. Die dazu notwendige Qualitätsanalyse wurde mit einem Bioanalyzer

der Firma Agilent vorgenommen. Die Analyse basiert auf dem Verhältnis der Mengen der ribosomalen 28S zur 18S rRNA und wird als RNA-Integritäts-Nummer (RIN) angegeben. Die Skala reicht von 1 (schlechte RNA-Qualität) bis 10 (perfekt intakte RNA). Werte zwischen 8 und 10 werden als intakte RNA bezeichnet. Diese Werte konnten mit den RNA-Isolationen der Aalmutter-Leberhomogenate erzielt werden (Tabelle 1).

**Abbildung 8: Exemplarische Übersicht der erfolgreichen RNA-Extraktion aus Leberhomogenat einer Aalmutterprobe (Biotaprobe)**



Es handelt sich um eine Probe aus dem Jahr 2010 aus Varel Mellum. Die Messung wurde mit einem Agilent 2100 Bioanalyzer durchgeführt. Der Graph zeigt die Größenverteilung der Fragmente in Basenpaaren (Size (nt)) und die Intensität der Banden in relativer Fluoreszenz (RFU). Die markierte Spitze „LM“ ist das künstlich zugegebene untere Minimum von 15 Basenpaaren. Die zwei Peaks im Chromatogramm bei den Längen 1848 bp und 3787 bp entsprechen der 18S rRNA und 28S rRNA. Diese sind auch rechts auf dem virtuellen Gelelektrophoresebild gezeigt. Quelle: eigene Darstellung, UT.

- Im Rahmen des Projekts konnte für alle Probentypen ein geeignetes Protokoll zur Extraktion von DNA gefunden sowie erfolgreich RNA aus den Biotaprobe isoliert werden; die SOPs der UPB gewährleisten die Integrität der Proben für DNA- und RNA-basierte Analysen.

Weitere automatisierbare Versionen von DNA-Isolationsprotokollen, insbesondere zur Extraktion von DNA aus Boden oder aus Schwebstoffen wurden getestet und validiert und sind hier verfügbar: <https://www.protocols.io/view/inhibitor-free-dna-extraction-from-soil-and-sedime-bp2l6957zlqe/v3>.

Neben den oben getesteten technischen Voraussetzungen (Menge, Qualität, Inhibition) wurde geprüft, ob aus den Proben auch die gewünschte Ziel-eDNA detektiert werden konnte. So sollte für die Fallstudien z. B. aus Blattproben eDNA von Gliederfüßern analysiert werden. Die absolute DNA der Blattzellen war hier irrelevant, es war allein ausschlaggebend, ob Gliederfüßer-eDNA mit gruppenspezifischen Primern amplifiziert werden konnte. Gleiches galt für die gesammelte eDNA durch aktive Filtrierer (Miesmuschel, Dreikantmuschel). Hier musste geprüft werden, ob neben der Wirts-DNA (Muschel) auch eDNA der filtrierten Organismen amplifiziert werden konnte (z. B. Phyto-/ Zooplankton). Ein Ansatz dazu ist die Verwendung gruppenspezifischer Primer, um die DNA von Tieren und Bakterien aus einer Blasentang- oder Blattprobe zu isolieren. Im Projekt wurden Amplifikationstests an Miesmuschel-, Dreikantmuschel-, Blasentang- und Blattproben durchgeführt. In allen Fällen konnte erfolgreich die Ziel-eDNA vervielfältigt werden.

**Tabelle 1: RNA-Ausbeute und Qualität (RIN) der Aalmutter-Leberhomogenate, gemessen auf einem Agilent 2100 Bioanalyzer**

| Probe             | Gesamtmenge (ng) | RIN |
|-------------------|------------------|-----|
| Darss 1994        | 804,62           | 8,9 |
| Dars 1999         | 369,33           | 9,4 |
| Darss 2005        | 3910,75          | 9,1 |
| Darss 2012        | 1459,24          | 9,2 |
| Darss 2017        | 550,08           | 9,3 |
| Darss 2019        | 2879,59          | 9,7 |
| Darss 2021        | 707,71           | 9,7 |
| Varel Mellum 2010 | 4773,37          | 9,1 |
| Varel Mellum 2012 | 453,12           | 8,7 |
| Meldorf 1994      | 163,23           | 8,4 |
| Meldorf 2005      | 282,19           | 8,9 |
| Meldorf 2010      | 209,60           | 8,8 |
| Meldorf 2017      | 318,19           | 9,2 |
| Meldorf 2019      | 268,50           | 9,1 |

Auch für die Eignung von Proben für die Populationsgenomik gibt es Einschränkungen: Populationsgenomische Analysen basieren auf der Analyse der räumlichen und zeitlichen Variation des Genoms einer Art und nicht alle Biotaproben bilden diese Information ab. Beispielsweise zeigten Dreikantmuscheln keine räumliche Variation, da sie vor ihrer Deposition in den jeweiligen Flüssen im Bodensee auf Plattenstapeln angezogen wurden. Bei anderen Proben, wie den Baumproben, fehlt wiederum die zeitliche Variation, da die Bäume sehr langlebig sind und seit Jahrzehnten weitgehend unverändert an den Probenahmestellen stehen. Anders verhält es sich bei Aalmutter, Brassen, Miesmuscheln, Blasentang und Regenwürmern. Diese eignen sich gut für populationsgenomische Untersuchungen mittels Pool-Sequenzierung, da diese Methode erst bei großen Stichproben effizient ist. Bei Rehproben, die Material von nur knapp 10 Individuen enthalten, gerät diese Methode an die Grenzen ihrer Genauigkeit. Für Eier von Vögeln gilt es noch zu untersuchen, ob diese ausreichend genomische DNA enthalten, um damit populationsgenomische Untersuchungen vorzunehmen.

**Tabelle 2: Übersicht der in AP1 vom Projektteam vorgenommenen Arbeiten zur Auswahl und Eignung von verschiedenen genetischen Verfahren zur Untersuchung von Proben**

| <b>Methode</b>                                                    | <b>Anforderung an die Probe</b>                                                                | <b>Vorgehensweise</b>                                                                                                                        | <b>Ziele</b>                                                                                                                                                                                                                                     | <b>Geeignete Probenarten</b>                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DNA-Metabarcoding                                                 | Assoziation mit einer komplexen Gemeinschaft, z. B. einem Mikrobiom oder interagierenden Arten | Anreicherung von DNA-Spuren der assoziierten Artengemeinschaft mittels PCR von Markergenen                                                   | Qualitative Rekonstruktion komplexer Artengemeinschaften und ihrer zeitlichen Veränderung; Identifikation von Mustern und Treibern des Biodiversitätswandels                                                                                     | Limnisch: Schwebstoffe, Dreikantmuscheln;<br>Marin: Miesmuschel, Blasentang;<br>Terrestrisch: Blätter von Bäumen, Boden, Regenwürmer und ihr Kot |
| Metagenomik                                                       | Assoziation mit einer komplexen Gemeinschaft, z. B. einem Mikrobiom oder interagierenden Arten | Anreicherung der gesamten DNA aus einer probenassoziierten Gemeinschaft mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung                                  | Quantitative Rekonstruktion komplexer Artengemeinschaften und ihrer zeitlichen Veränderung; funktionelle Charakterisierung der Artengemeinschaften mittels funktioneller Gene; Identifikation von Mustern und Treibern des Biodiversitätswandels | Limnisch: Schwebstoffe;<br>Terrestrisch: Boden, Regenwurm Kot                                                                                    |
| Populationsgenomik, Transkriptomik und Epigenomik                 | Enthält DNA oder RNA einer Population aus vielen Individuen derselben Art                      | Sequenzierung der gesamten Genome, Transkriptome der Mischprobe                                                                              | Nachweis schneller, evolutionärer Anpassungen an Umweltveränderungen; Messung von Stressantworten von Arten in der Genexpression und Genom-Methylierung; Identifikation der temporären Dynamik von Hybridisierungsprozessen                      | Limnisch: Brassen;<br>Marin: Aalmutter; Miesmuschel; Blasentang;<br>Terrestrisch: Regenwürmer                                                    |
| Kultivierung von probenassoziierten Arten (insb. Mikroorganismen) | Assoziation mit einer komplexen Gemeinschaft, z. B. einem Mikrobiom oder interagierenden Arten | Kultivierung von probenassoziierten Arten, z. B. Bakterien, Pilzen, Nematoden aus der Probe und experimentelle Manipulation der Gemeinschaft | Experimentelle Messung der Stressantworten von Artengemeinschaften in den letzten Jahrzehnten                                                                                                                                                    | Limnisch: Schwebstoffe, Dreikantmuschel;<br>Marin: Miesmuschel, Blasentang;<br>Terrestrisch: Blätter von Bäumen, Regenwürmer und ihr Kot, Boden  |

Übersicht der in AP1 vom Projektteam vorgenommenen Arbeiten zur Auswahl und Eignung von verschiedenen genetischen Verfahren zur Untersuchung von Proben. Die Tabelle zeigt die verwendeten genetischen Methoden, die Anforderungen, die eine Probe für die Analyse mit dieser Methode erfüllen muss, die Ziele der Analyse, sowie die für das Verfahren geeigneten Probenarten.

## 2.3 Datenmanagement

Alle relevanten Metadaten der Proben, inklusive chemische Messdaten, sind in dem digitalen Informationssystem der Umweltprobenbank (IS UPB) hinterlegt. Für die genetischen Daten des Pilotprojekts ist eine Lösung zur nachhaltigen Datenhaltung erforderlich. Die systematische Einbindung der Arten, OTU- und ESV-Listen in das Datenbanksystem erfolgt über eine Importschnittstelle nach definierten Datenformaten, die Einbindung ist in Arbeit. Auch die Langzeitspeicherung der Rohdaten (mehrere Terabyte) in die Datenumwelt der UPB ist erforderlich. Jedoch können hierfür auch externe Lösungen gesucht werden, bspw. externe, öffentliche Repositorien. Wichtig ist ein übergreifender Lösungsansatz, der eine Nachnutzung gemäß den FAIR-Prinzipien ermöglicht – also die Daten auffindbar (*Findable*), zugänglich (*Accessible*), interoperabel (*Interoperable*) und wiederverwendbar (*Reusable*) macht (Takahashi et al., 2024; Wilkinson et al., 2016). Im Kontext dieser FAIR-Prinzipien haben sich Nukleotid-Datenbanken etabliert. Systeme wie das European Nucleotide Archive (ENA) des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) European Bioinformatics Institute (EBI), und das National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Archive (SRA) der National Library of Medicine (NLM) des National Institutes of Health (NIH) sind beispielsweise zwei der größten internationalen und öffentlich finanzierten Sequenzarchive. Vereint unter der International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) wird die Synchronisation und der Austausch von Rohsequenzdaten zwischen den großen Archiven umgesetzt (Cochrane et al., 2011). Angesichts der politischen Veränderungen in den USA mit Blick auf Umweltdaten sind derzeit Datenarchive in Europa zu empfehlen. Die Einheit aus internationaler Kooperation, die absolute Verfügbarkeit der Rohsequenzdaten für die (Fach-)Öffentlichkeit unter dem Schirm der Europäischen Institution, machen das ENA-SRA zu einer idealen Lösung für die erzeugten Sequenzdaten. Weiterhin darf nicht unterschätzt werden, dass einzelne Arbeitspakete des TrendDNA-Projektes von Gigabyte bis zu Terabyte an Rohsequenzdaten erzeugen müssen, um die jeweiligen Fragestellungen und Ziele der Fallstudien bearbeiten zu können. Der benötigte Speicherplatz, die Überprüfung der Up- und Download-Prozesse und die einzigartigen Eigenschaften von Sequenzdaten, ergeben spezielle Anforderungen an diese Daten und an die Datenbanken, in denen sie gelagert werden.

Das TrendDNA-Projekt ist zu dem Schluss gekommen, dass insbesondere das europäisch etablierte Datenbanksystem ENA für die erzeugten Rohsequenzdaten geeignet ist, da es die erforderlichen Anforderungen an die Lagerung erfüllt und uneingeschränkten öffentlichen Datenzugang bietet (siehe auch **Kapitel 9**). Weitere wichtige Schritte, um globale Interoperabilität und Wiederverwendbarkeit genetischer Biodiversitätsdaten zu gewährleisten, sind:

- ▶ Bereitstellung von Metadaten, die den Datenerzeugungsprozess dokumentieren. Hierzu bietet das FAIR-eDNA-Projekt eine dedizierte Checkliste, die bestehende Datenstandards und Vokabulare (Genomics Standards Consortium [GSC] MlxS, Biodiversity Information Standards [TDWG]: Darwin Core) erweitert. Pflicht-, Empfehlungs- und Zusatzfelder siehe: <https://fair-edna.github.io/download.html>
- ▶ Angabe der OTUs als grobe Schätzwerte von Arten und/oder ESV-Sequenzen für alle Taxa in den Metadaten bzw. den Veröffentlichungen.



- ▶ Nutzung öffentlich zugänglicher DNA-Referenzdatenbanken (z. B. BOLD, mitofish, unite, Midori2, PR2, Silva) zur taxonomischen Zuordnung. Wenn interne Datenbanken genutzt werden, müssen sie offen zugänglich gemacht oder zumindest verlinkt werden.
- ▶ Dokumentation der Strategie zur taxonomischen Zuordnung von OTUs/ESVs in den Protokollen oder Skripten.

### 3 Operationalisierung

Die Ergebnisse aus AP 1 belegten die Eignung aller Probentypen für genetische Analysen und liefern konkrete molekulargenetische Verfahrensanweisungen. Ziel von AP 2 war die Integration genetischer Analysemethoden in den Betriebsablauf der UPB inklusive der Identifikation kritischer Arbeitsabläufe und Fragen der Qualitätssicherung. Hierbei ist die Tatsache wichtig, dass für die UPB seit Jahrzehnten Umweltproben nach hochstandardisierten Verfahrensanweisungen gesammelt, prozessiert und archiviert werden. Diese Stetigkeit und Standardisierung zeichnet Umweltprobenbanken aus und macht sie zu einer wertvollen Ergänzung anderer Umweltbeobachtungsprogramme. Bei der Veränderung der Probenahmeprotokolle müssen mögliche Auswirkungen auf die Analyseergebnisse der Langzeitreihen daher genau geprüft werden. Um die Eignung der existierenden Abläufe für genetische Analysen zu prüfen, wurden in dem Arbeitspaket „Operationalisierung“ drei Aspekte bearbeitet:

1. Sicherstellung der Reinheit der Proben, um mögliche Kontaminationsquellen im Betriebsablauf der UPB festzustellen und zu überprüfen, sowie die Artreinheit der gesammelten Proben aus dem Feld sicherzustellen.
2. Optimieren spezifischer molekularer Protokolle zur Probenprozessierung, um reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Entsprechend wurden verwendete molekulare Protokolle umfassend mit Blick auf einzusetzende Probemenge, Anzahl der Replikate, Sequenziertiefe und weitere Aspekte getestet.
3. Bestimmen des Mehrwerts unterschiedlicher Analysestrategien. Hierbei ging es um den spezifischen Vergleich der Jahresproben mit den Monatsproben für die Probenarten „Schwebstoffe“ und „Miesmuscheln“. Während die Proben weiter als Jahres- und Monatsmischproben archiviert werden, ist eine Entscheidung für die kommenden genetischen Routineuntersuchungen erforderlich.

#### 3.1 Sicherstellung der Probenreinheit

##### 3.1.1 Untersuchung potenzieller Kontaminationen während Probenahme und -prozessierung

Zur Sicherstellung der Reinheit der Proben wurden verschiedene Schritte des Arbeitsablaufs überprüft. Die Verfahren sind bereits so organisiert, dass feste Arbeitsgruppen für verschiedene Probentypen und Arbeitsprozesse verantwortlich sind: Bundesanstalt für Gewässerkunde, BfG: SPM-Probenahme, UT: Biota-Probenahme, und F-IME: Bodenprobenahme, Probenprozessierung sowie Probenarchivierung. Während der Arbeitsprozesse ergeben sich viele Möglichkeiten der Kreuzkontamination mit genetischem Material, die für schlüssige Biodiversitätsanalysen auf ein Minimum reduziert werden müssen. Zu den bestehenden Routinen gehört die Reinigung aller Gerätschaften, die bei der Prozessierung der Proben eingesetzt werden. Um zu überprüfen, ob die bestehenden Reinigungsmaßnahmen ausreichend sind, um die Übertragung genetischer Reste zu verhindern, wurden zunächst DNA-Abstriche von allen Gerätschaften und Oberflächen genommen, die während der Probenahme und -prozessierung zum Einsatz kommen. Die genetische Untersuchung der Abstriche ergab, dass Kreuzkontaminationen auf den Gerätschaften der UPB und der Arbeitsoberflächen in den Laboren nach der Reinigung entweder gar nicht oder nur in sehr geringen Spuren nachzuweisen waren (**Anhang A.2**).

- Die bestehenden qualitätssichernden Maßnahmen zur Vermeidung von Kreuzkontamination durch die Übertragung genetischer Spuren von einer Probe auf die andere durch kontaminierte Arbeitsgeräte und -flächen sind ausreichend.

### 3.1.2 Untersuchung potenzieller Kontaminationen in UPB-Proben durch Nutzung der Kryomühle

Bei der Probenprozessierung werden unterschiedliche Probenarten in der Kryomühle vermahlen, häufig am selben Tag oder an direkt aufeinanderfolgenden Tagen. Zur Quantifizierung des Kontaminationsrisikos wurde die eDNA von baumassoziierten Insektengemeinschaften verschiedener Baumarten am selben Tag oder an direkt aufeinanderfolgenden Tagen in der Kryomühle prozessiert. Da jede Baumart mit spezifischen monophagen Insektenarten assoziiert ist (Stothut et al., 2024), sollten diese nur in den Blattproben der entsprechenden Baumart gefunden werden. Im Fall einer Kreuzkontamination durch die Kryomühle würde beispielsweise die eDNA einer abundanten Insektenart der Rotbuche auch in einer Pappelprobe nachweisbar sein, die nach der Rotbuchenprobe prozessiert wurde. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten keine Hinweise auf Kontamination (**Anhang A.2**). Daher ist davon auszugehen, dass eine Beeinflussung der Biodiversitätsanalysen durch Kreuzkontamination in der Kryomühle unwahrscheinlich ist (Krehenwinkel, Weber, Broekmann, et al., 2022).

- Die bestehenden Betriebsabläufe zur Dekontamination der Kryomühle sind gut geeignet, um Kontaminationen zu vermeiden.

### 3.1.3 Untersuchung zur Kombination von eDNA- und regulären UPB-Probenahmen

Für eine vollständigere Erfassung des Biodiversitätswandel ist es wichtig, auch die Integration neuer Probenarten, beispielsweise Wasserproben in den Probenablauf zu prüfen. Aus diesen Wasserproben kann über eDNA-Metabarcoding die Artengemeinschaft von Gewässern bestimmt werden. Eine Möglichkeit, die eDNA-Wasserprobenahme in den regulären Beprobungsprozess der UPB zu integrieren, ist die Entnahme einer Schöpfprobe während der Fischbeprobung. Anders als Schwebstoff-Monatsproben oder Wasser-Mischprobensammler sind Schöpfproben aber nur eine Momentaufnahme der lokalen Biodiversität und daher in ihrer Aussagekraft begrenzt. Dennoch können sie Erkenntnisse für spezifische Fragen liefern. Da in der eDNA-Prozessierung auch kleinste Spuren von DNA nachgewiesen werden können, ist eine Beprobung im Umfeld der Fischprobenahme besonders anfällig für Kreuzkontaminationen. Es wurden vor, während und nach einer Fischprobenahme Wasserproben entnommen, gefiltert und mit Metabarcoding-Verfahren die Fischbiodiversität untersucht. Die Daten zeigen, dass bei einer Wasserprobenahme in der Nähe von Stellnetzen die eDNA der in den Netzen gefangenen Fische angereichert ist (**Anhang A.2**). Es ist daher empfehlenswert die Probennahme vor dem eigentlichen Fischfang zu planen. Werden diese Bedingungen beachtet, lässt sich eine ad hoc eDNA-Wasserprobenahme problemlos mit den regulären Fischprobenahmen kombinieren. Für ein systematisches Langzeitmonitoring sind jedoch Proben erforderlich, die längere Zeiträume integrieren.

- Wasser-Schöpfprobenahmen können im Umfeld der Fischprobenahmen umgesetzt werden

### 3.1.4 Untersuchung der taxonomischen Reinheit verschiedener Probenarten

Für jegliche Untersuchungen der Biotaproben der UPB muss gewährleistet werden können, dass die verwendeten Proben taxonomisch rein sind, also keine weiteren Arten enthalten. Für einzelne Probentypen, beispielsweise Rehe, Aalmutter und Brassen, kann dies durch eine einfache morphotaxonomische Inspektion gewährleistet werden. Für andere, vergleichsweise schwerer zu bestimmende Arten ist es jedoch angebracht, die taxonomische Reinheit zu überprüfen, da es nah-verwandte morphologisch ähnliche Arten gibt, die mit ihnen koexistieren

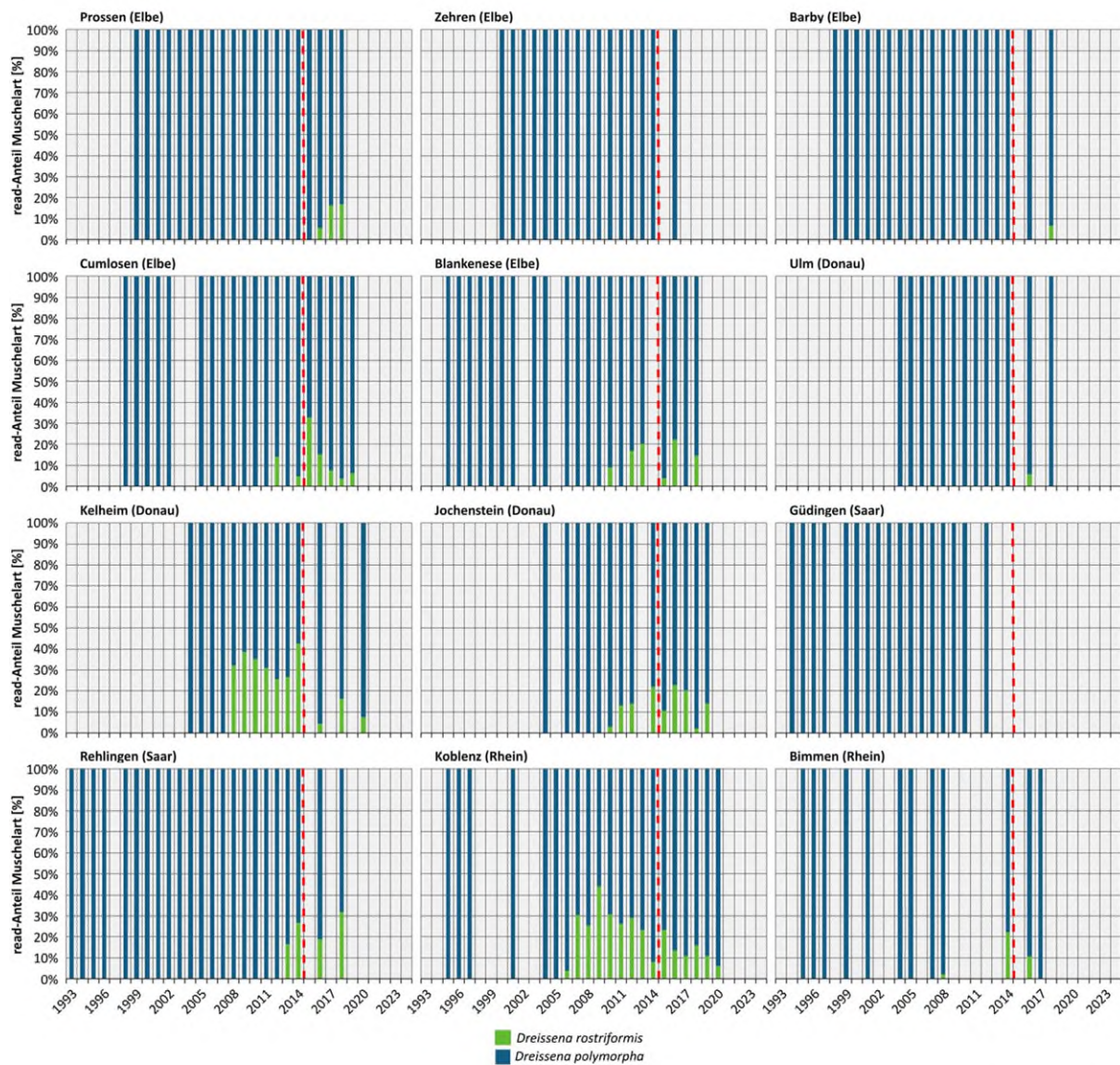
können (Bickford et al., 2007; Jourdan et al., 2023). Im AP 3 wurde die taxonomische Reinheit von drei Biotaproben überprüft: Miesmuscheln, Dreikantmuscheln und Regenwurm:

1. Die Miesmuschel *Mytilus edulis* wird in Nord- und Ostsee beprobt. Während in der Nordsee lediglich die Zielart *Mytilus edulis* vorkommt, ist in der östlichen Ostsee die Pazifische Miesmuschel *Mytilus trossulus* verbreitet, die wesentlich toleranter gegenüber geringen Salzgehalten ist und mit *Mytilus edulis* hybridisieren kann (Strelkov et al., 2017). Die Ostsee-Miesmuscheln der UPB stammen von der Darsser Schwelle, einer wichtigen biogeographischen Barriere, östlich derer ein erheblicher Abfall der Salinität zu verzeichnen ist. An dieser Probestelle war nicht bekannt, ob hier nur die Zielart *M. edulis* vorkommt, oder ob beide *Mytilus*-Arten sympatrisch (im gleichen Gebiet) vorkommen und möglicherweise hybridisieren. Zur Überprüfung wurde daher eine Sonderprobenahme an der Darsser Schwelle durchgeführt und weitere Proben von Kooperationspartnern aus dem östlichen Finnland analysiert (**siehe Anhang A.3**). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Muschelarten in der Ostsee tatsächlich hybridisieren, der genetische Hintergrund der Proben von der Darsser Schwelle scheint jedoch überwiegend *Mytilus edulis* zu sein. Unsere Ergebnisse deuten auf das Vorhandensein einer Hybridzone östlich der Darsser Schwelle hin. Folgeuntersuchungen werden die genaue Lokalisation und Breite der Hybridzone charakterisieren.
2. Die Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha* wird in unseren Flüssen vielerorts von der invasiven Quaggamuschel *Dreissena rostriformis* verdrängt (Paulus et al., 2014). Beide Arten sind morphologisch kaum unterscheidbar, mit Ausnahme eines morphologischen Merkmals, das Teubner et al. (2016) ermittelt haben. Entsprechend ist eine Verunreinigung der Dreikantmuschelproben durch Quaggamuscheln bei der Probenahme nicht auszuschließen. Um die potenzielle taxonomische Verunreinigung der Proben zu prüfen, wurde ein Metabarcoding-Assay entwickelt, mit dem die beiden Arten aus Mischproben isoliert, identifiziert und quantifiziert werden können. Zur Optimierung der quantitativen Analyse wurde mit Mischproben definierter Menge der beiden Muschelarten, sogenannten Mock-Communities, gearbeitet. Die Analysen zeigten einerseits, dass einige der Dreikantmuschelproben durch Quaggamuscheln verunreinigt sind. Andererseits wurde aber auch deutlich, dass das seit 2015 genutzte morphologische Merkmal hilft, den Anteil von Quaggamuscheln in den Proben zu minimieren. Durch die Analysen konnte nicht nur die Kontamination der Proben quantifiziert, sondern auch das Auftreten der Quaggamuschel in deutsche Flüsse analysiert werden (**siehe Abbildung 9**). Die Daten unterstützen eine nicht-lineare Ausbreitung der Muscheln entlang des Flussverlaufs und weisen auf multiple Verschleppungsereignisse hin.
3. Studien zu Regenwürmern haben gezeigt, dass es innerhalb der Gattung *Lumbricus* mehrere morphologisch ähnliche Arten gibt (Martinsson & Erséus, 2017). Um sicherzustellen, dass die UPB ausschließlich *L. terrestris* sammelt, wurden verschiedene genetische Untersuchungen vorgenommen: Zunächst wurden einige Regenwurmhomogenate mittels DNA-Metabarcoding prozessiert. Diese Untersuchung zeigte zu über 99% Sequenzen von *L. terrestris*, sehr selten *L. rubellus*. Allerdings wurden an vier Probestellen sehr divergente, d. h. genetisch durch viele Mutationen charakterisierte ESVs *L. terrestris* ESVs gefunden. Diese könnten Teil einer ungewöhnlich hohen innerartlichen Variation sein, aber auch auf weitere Arten hinweisen (Bickford et al. 2007). Um den Artstatus der divergenten Linien zu klären, wurden an vier Probenahmestellen der UPB 228 einzelne Regenwürmer gesammelt (**siehe Anhang A.4**). Zusätzlich wurden Sequenzen von *L. terrestris* aus weiteren europäischen Ländern in die Analyse aufgenommen, um die europaweite genetische Struktur der Art abzubilden. Für jedes Individuum wurde jeweils ein mitochondriales Gen sowie für 75



Proben zusätzlich das gesamte Genom sequenziert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *L. terrestris* in ganz Europa eine Art darstellt und dass die Proben damit überwiegend artrein sind. Die beobachteten divergenten ESVs liegen mitunter heteroplasmisch – also mit zwei mitochondrialen Varianten – im selben Individuum vor, sind also Teil der natürlichen Variation der Art. Lediglich drei Entnahmestellen im Saarland zeigten neben einem divergenten mitochondrialen Genom auch eine Differenzierung im Kerngenom. Hier müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um herauszufinden, ob es sich bei diesen Linien um getrennte Arten handelt.

**Abbildung 9: Nachweis von Quaggamuscheln in den Dreikantmuschel-Proben**



Die Diagramme zeigen die relative Read-Abundanz (Y-Achse) der Quagga- und Zebromuschel über die Zeit (X-Achse) und dokumentieren damit die Einwanderung der Art in unsere Flüsse. Die rote Linie zeigt den Beginn der Nutzung des morphologischen Merkmals zum Ausschluss der Quaggamuschel für Proben der UPB. Quelle: Richter, UT (2025).

- Die Untersuchungen zeigen probentypspezifische Hinweise auf Verunreinigungen durch morphologisch ähnliche Arten (Dreikantmuschel) sowie Hinweise auf Hybridisierungen (*Mytilus edulis* in der Ostsee). Diese Probenotypen müssen besonders analysiert und künftig weiter auf Qualität/Artreinheit geprüft werden.

## 3.2 Optimierung molekularer Protokolle

AP 1 konnte die grundsätzliche Eignung von Methoden belegen. Für eine erfolgreiche Integration sind jedoch neben der grundsätzlichen Eignung und Kontaminationsprüfung auch weitere Validierungsschritte erforderlich, die in SOPs münden und so Reproduzierbarkeit und Genauigkeit sicherstellen. Diese Überprüfung muss auf verschiedenen Ebenen geschehen. Die erste Ebene ist die Ebene der Probe selbst. Hier musste zuerst überprüft werden, ob die Proben groß genug sind, um die probenassoziierte Biodiversität repräsentativ abzubilden. Biotaprobten der UPB umfassen oftmals hunderte Individuen einer Art. Diese Mischproben werden in der Kryomühle homogenisiert und in kleine Teilproben zu je 10 g aufgeteilt. Zur Überprüfung wurden Baumproben untersucht, die im Lauf der Zeit in immer kleineren Probengewichten genommen wurden. Während bei den ersten Probenahmen in den 80er Jahren noch gut 10 kg Blattmaterial gesammelt wurden, liegt die Probenmenge inzwischen nur noch bei 1 kg. Die statistische Untersuchung, die zu diesem Thema vorgenommen wurde, zeigt, dass 1 kg Blätter ausreicht, um die mit Baumkronen assoziierte Biodiversität abzubilden.

### 3.2.1 Analyse der notwendigen Probenmenge in der DNA-Extraktion

Nach der Probennahme werden die Proben in der Kryomühle homogenisiert. Es wird aber nur ein Teil des Homogenats für die weiteren Analysen verwendet. Da durch den Homogenisierungsprozess selbst geringste Spuren von Chemikalien ausreichend verteilt werden, ist anzunehmen, dass dies auch für Spuren der eDNA gilt. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Im ersten Versuch ging es darum herauszufinden, wie viel Homogenat in die DNA-Extraktion eingesetzt werden muss, um die probenassoziierte Artengemeinschaft umfassend abzubilden. Dazu wurden für mehrere Probenarten Homogenat-Gewichtsreihen für die anschließende DNA-Extraktion erstellt. Diese Versuche wurden an Blattproben, Muscheln, Blasentang, Regenwurmkörpern und -kot vorgenommen. Die verwendete Menge an Homogenat, die in der DNA-Extraktion eingesetzt wurde, folgte einer geometrischen Reihe und lag zwischen 100 und 1600 mg. Nach der DNA-Extraktion wurde eine DNA-Metabarcoding-Analyse der Proben durchgeführt. Bildet eine Menge Homogenat die Artenzusammensetzung ausreichend ab, sind geringe Unterschiede zwischen verschiedenen Proben desselben Homogenats zu erwarten. Die Ergebnisse des Versuchs zeigten, dass bereits 200 mg Homogenat ausreichen, um einen Großteil der Artenvielfalt und -zusammensetzung in einer Probe abzubilden, auch wenn mit steigender Menge an Homogenat die  $\alpha$ -Diversität noch steigt (**Abbildung 10**). Dieses Ergebnis belegt, dass eDNA-Spuren beim Vermahlen in der Kryomühle sehr homogen verteilt werden (Krehenwinkel, Weber, Broekmann, et al., 2022). Gleiches gilt für den Blasentang, für den bereits bei 100 mg die Zahl detektierter Arten vergleichbar war (**Abbildung 11**).

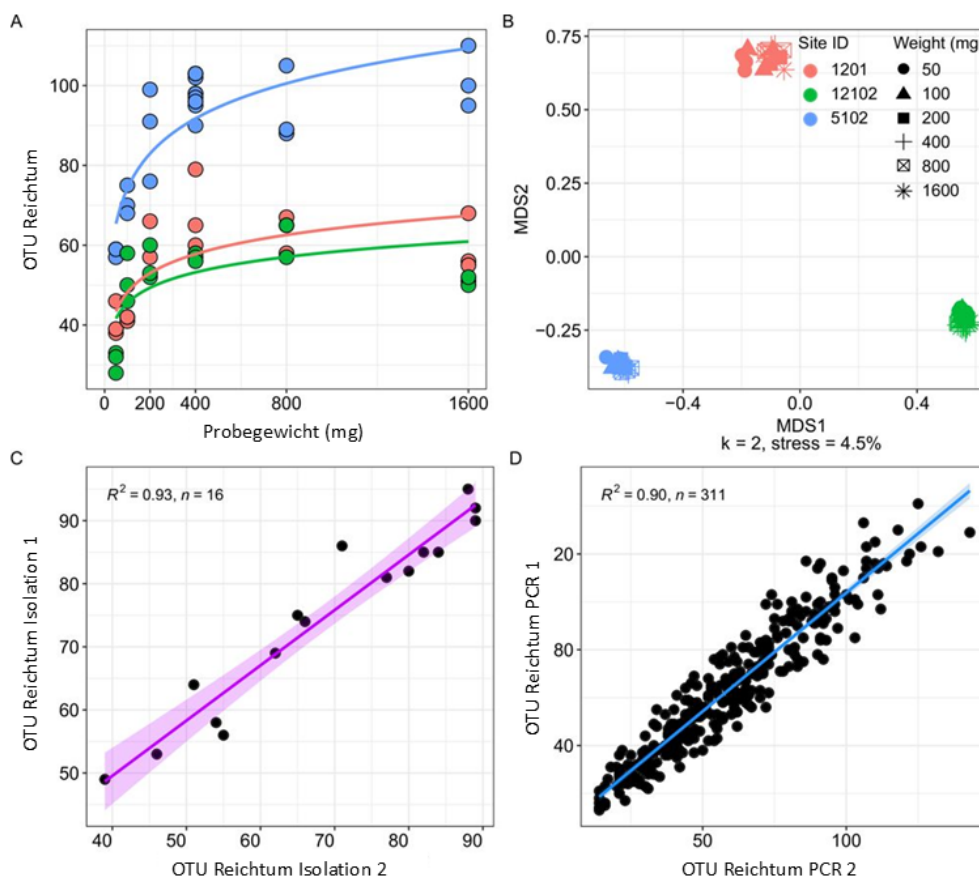
### 3.2.2 Analyse der notwendigen Anzahl von DNA-Extraktions- und PCR-Replikaten

Nicht nur bei der Probennahme, sondern auch bei der DNA-Extraktion und der PCR kann sowohl die Wahl der Methode als auch stochastische Prozesse (PCR-Stochastizität) dazu führen, dass Spuren seltener Arten nicht detektiert werden (Buchner et al., 2021; Deiner et al., 2015; Shirazi et al., 2021). Um diesem Problem entgegenzuwirken, können Replikate bei DNA-Extraktion und PCR verwendet werden. Im AP 3 wurden zwei systematische Tests zur Analyse der nötigen Anzahl von Replikaten an Blattproben (Krehenwinkel, Weber, Broekmann, et al., 2022) sowie an Schwebstoffproben (Schütz et al., 2025) durchgeführt.



**Blattproben:** Da die Proben gut homogenisiert sind, sollten wenige DNA-Extraktionsreplikate ausreichen, um die Artenvielfalt der Probe zu erfassen. Eine größere Rolle spielt hier die Anzahl an PCR-Replikaten. Da seltene DNA-Templates durch Zufall bei der PCR amplifiziert werden, kann eine Erhöhung der PCR-Replikate zu einer Erhöhung der detektierten Artenzahl führen. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass 1–2 Extraktionsreplikate und 2–4 PCR-Replikate ausreichen, um Muster der Biodiversität innerhalb und zwischen Proben gut abzubilden (**Abbildung 12**). Die Trends der Veränderung der Biodiversität sind hervorragend zwischen Isolations- und PCR-Replikaten korreliert. DNA-Extraktions- und PCR-Replikate erlauben zudem die Untersuchung der Reproduzierbarkeit einzelner Arbeitsschritte. Bei einem reproduzierbaren Metabarcoding-Protokoll sollte es zwischen den Replikaten derselben Probe nur wenig Varianz in den nachgewiesenen Artengemeinschaften geben. Die Ergebnisse aus Untersuchungen an Blattproben bestätigen diese Annahme, da die Artenvielfalt zwischen PCR- und Extraktionsreplikaten sehr ähnlich war (Krehenwinkel et al., 2022; **Abbildung 12**). Um aber die gesamte Artenzahl abzubilden, die mit einer Blatthomogenatprobe assoziiert ist, sind weitere Replikate notwendig. Die maximale Artenzahl wird erst bei ca. 20 PCR-Replikaten erreicht.

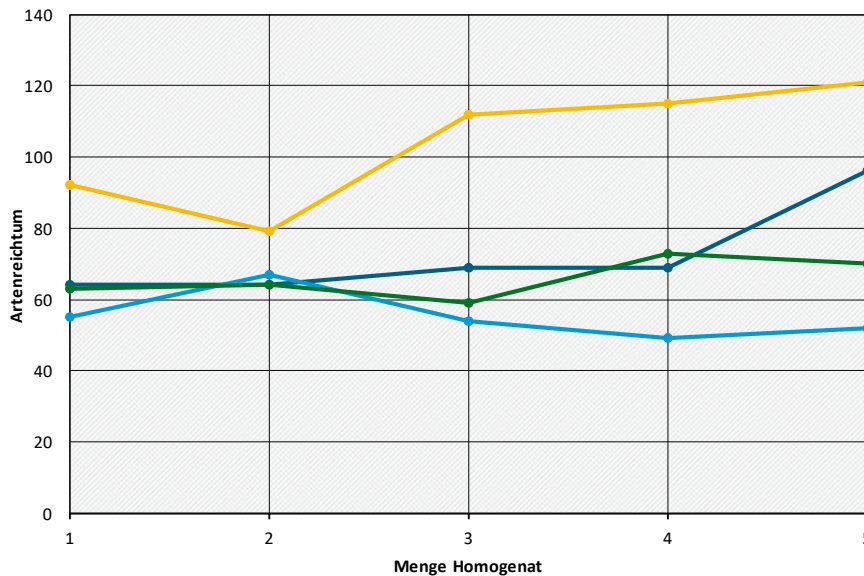
**Abbildung 10: Effekt verschiedener in der DNA-Extraktion eingesetzten Homogenatmengen, sowie Isolations- und PCR Replikation auf die nachgewiesene  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diversität**



$\alpha$ -Diversität (hier: OTU-Vielfalt) und Betadiversität (Bray-Curtis-Unähnlichkeit) von blattassoziierten Insektengemeinschaften. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei Blattproben. A) Zusammenhang zwischen Probengewicht (X-Achse) und der Anzahl an detektierten OTUs als Äquivalent für die Artenvielfalt (Y-Achse). Die Kurven zeigen, dass die nachgewiesene Artenvielfalt zwischen 200 mg und 400 mg Homogenat saturiert. B) Analyse der Standortunterschiede basierend auf Bray-Curtis-Unähnlichkeit in einer nicht-metrischen multidimensionalen Skalierungsanalyse (NMDS). Die Abbildung zeigt, dass die Homogenatmenge bei einer DNA-Extraktion keinen Effekt auf die nachgewiesene Artenzusammensetzung hat. Jeder Standort weist eine einzigartige Artengemeinschaft auf, unabhängig von der

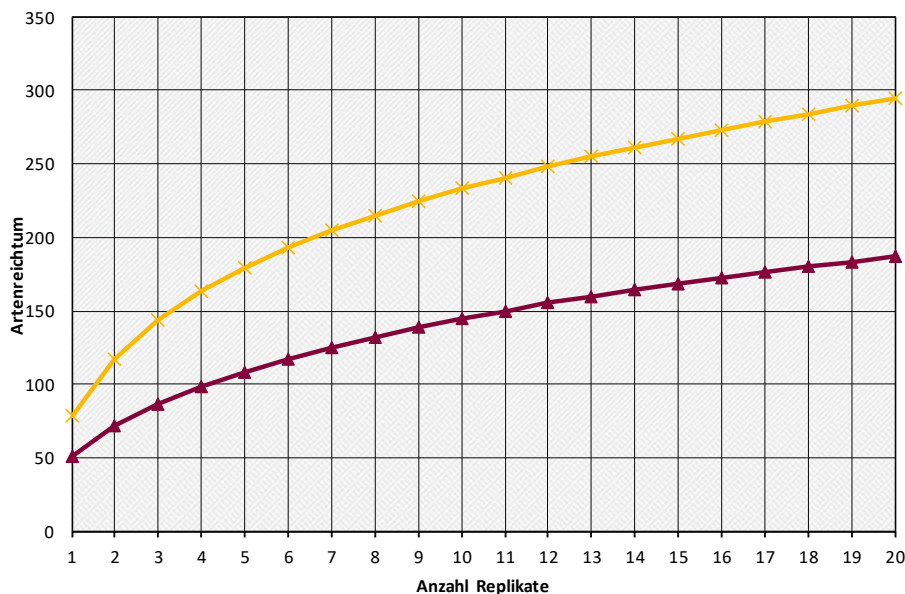
eingesetzten Homogenatmenge („weight“). C) & D) Effekt von Extraktions- und PCR-Replikation auf die Blattproben-Biodiversität. Sowohl zwischen den Extraktionsreplikaten der gleichen Homogenatprobe (C) als auch zwischen den PCR-Replikaten aus derselben Isolation (D) ist die als OTU-Reichtum angegebene Artenvielfalt sehr ähnlich. Quelle: Krehenwinkel et al. (2022).

**Abbildung 11: Anzahl der nachgewiesenen Metazoen-OTUs aus vier Blasentangproben, die mittels eines metazoenspezifischen Primers amplifiziert wurden**



Es wurde eine geometrische Reihe von Homogenatmengen (X-Achse: 1: 100 mg, 2: 200mg, 3: 400 mg, 4: 800 mg und 5: 1600 mg) zur Isolation von DNA genutzt. Die Abbildung zeigt, dass bereits mit 100 mg Homogenat die vorhandene  $\alpha$ -Diversität (Y-Achse) in der Probe gut abgebildet wird. Die vier Farben stellen vier unterschiedliche Blasentangproben dar. Quelle: Brink, UT (2023).

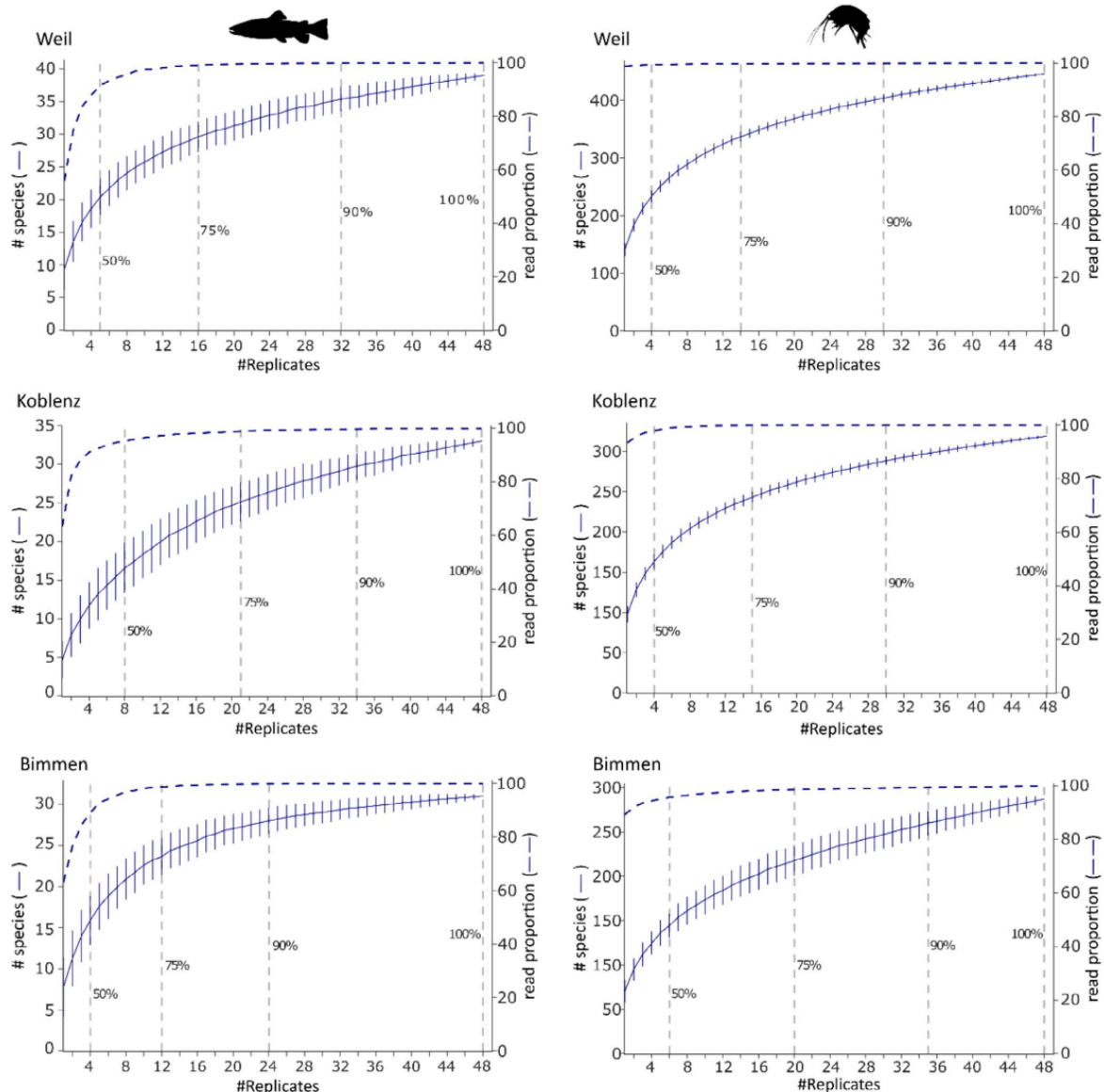
**Abbildung 12: Verhältnis nachgewiesener Insektenarten in den Blatthomogenaten in Abhängigkeit der Anzahl von PCR-Replikaten**



Die nachgewiesene Artenzahl folgt einer logarithmischen Verteilung. Die vollständige probenassoziierte Diversität wird erst nach über 20 Replikaten erreicht. Dagegen bilden schon deutlich weniger Replikate die Muster der Artenvielfalt zuverlässig ab. Dargestellt sind zwei ausgewählte Blattproben der UPB. Quelle: Krehenwinkel et al. (2022).

**Schwebstoffproben:** In der im TrendDNA-Projekt durchgeführten Analyse (Schütz et al., 2025) wurde untersucht, wie sich die eDNA der Schwebstoffproben für das Biodiversitätsmonitoring in Flüssen optimieren und operationalisieren lässt. Dazu wurden SPM-Proben von drei Rhein-Standorten analysiert. Sie wurden mit verschiedenen Replikationsstufen (Unterproben, Extraktions- und PCR-Replikate) und teils mit zusätzlicher mechanischer Homogenisierung („*Grinding*“) verarbeitet und mittels Metabarcoding auf Fische (12S) und Wirbellose (COI) untersucht. Ziel war es, die wichtigsten Faktoren für zuverlässige Artnachweise zu identifizieren. Die Ergebnisse zeigten, dass die Homogenisierung der Proben keinen entscheidenden Mehrwert brachte – sie erhöhte den Aufwand deutlich, während Verbesserungen nur in Einzelfällen auftraten. Viel entscheidender war die Replikation (**Abbildung 13**). Frühzeitige Replikation auf Unterproben- oder Extraktionsebene erhöhte die Artenerkennung deutlich stärker als zusätzliche PCR-Replikate oder eine höhere Sequenziertiefe. Besonders für Fische und Wirbellose war eine ausreichende Zahl technischer Replikate essenziell, um zufällige Nicht-Nachweise zu vermeiden. Bereits vier bis acht Replikate erfassten etwa die Hälfte aller nachweisbaren Arten, die zugleich über 90 % der Reads ausmachten. Spätere oder zusätzliche Replikation brachte nur geringen Zugewinn.

**Abbildung 13: Abhängigkeit der Artnachweise aus Schwebstoffproben (Y-Achse) von der Anzahl der Replikate für Fischarten (links) und Wirbellosenarten (rechts)**



Sättigungsanalyse (Rarefaction) mit 1000 Wiederholungen über alle 48 Replikate einer Probe. Die Prozentwerte geben an, welcher Anteil der insgesamt nachgewiesenen Arten bei der jeweiligen Replikatzahl erfasst wurde. Die gestrichelte Kurve zeigt den Anteil der Sequenzen der nachgewiesenen Arten im Gesamtdatensatz. Quelle: Schütz et al. (2025).

- Zur bestmöglichen Erfassung der Artenvielfalt über eDNA ist eine Replikation der SPM-Proben nötig, z. B. Analyse von zwei Aliquots, zwei Unterproben, zwei Extraktionen einer Probe oder zumindest PCR-Replikation (Minimum 2); diese Aspekte sind wichtiger als Homogenisierung in Kryomühle und sehr große Sequenziertiefen

### 3.2.3 PCR-Primer-Wahl

Wie in AP 1 erwähnt, spielt auch die Wahl der Primer für das DNA-Metabarcoding eine wichtige Rolle bei Biodiversitätsanalysen. Für die verschiedenen Probenotypen musste geeignete PCR-Primer identifiziert werden, die jeweils spezifische taxonomische Gruppen aus den Umwelt- oder Biotaproben amplifizieren (Krehenwinkel et al., 2019). Für das Projekt wurden einerseits bereits publizierte Primer genutzt und andererseits neue Primer entwickelt. Bereits publizierte

Primer wurden sowohl für die Analyse von Fisch- (Taberlet et al., 2018) und Makrozoobenthos-Gemeinschaften (Vamos et al., 2017) aus Schwebstoffproben als auch für die Analyse von Pilz- und Bakteriengemeinschaften aus Biotapproben verwendet. Für die Analyse von eukaryotischem Plankton, sowie Tieren aus Blattproben, Muscheln und Blasentang wurden dagegen neue Primer entwickelt (**Tabelle 3**). Die Schwierigkeit war hier, die DNA der Probenart auszuschließen und nur die probenassoziierte Gemeinschaft (Zielorganismen) zu amplifizieren, also z. B. nur die Insekten aus einer Blattprobe. Zu diesem Zweck wurden die Sequenzen von Probenarten und Zielorganismen verglichen und diagnostische Stellen identifiziert, an denen sich beide unterscheiden. Anschließend wurden Primer entwickelt, die an diesen Stellen nur an die Sequenzen der Zielorganismen, aber nicht an die der Probenart binden. So kann die Amplifikation von Sequenzen der nicht Nicht-Zielorganismen erheblich reduziert werden und geringste Spuren von eDNA der assoziierten Gemeinschaft aus einer Biotaprobe angereichert werden (Krehenwinkel, Weber, Künzel, et al., 2022; Stadhouders et al., 2010). Die im TrendDNA-Projekt genutzten und entwickelten Primer wurden umfassend bioinformatisch und experimentell auf ihre Effizienz bei den entsprechenden Probentypen getestet. Als ein Beispiel sind hier die Primer für die Amplifikation von Fisch-eDNA anzuführen. Hier wurde die Effizienz der Primer mithilfe künstlich-erstellter „Mock-Communities“ validiert (**Abbildung 14**) (Macher et al., 2023). Die Ergebnisse der im GeDNA-Projekt initiierten Validierung führten zur Wahl der Primerkombination tele02 f/r (Taberlet et al., 2018) für die Analyse der Schwebstoffproben.

**Tabelle 3: Verwendete Primerkombinationen und Zielgene der jeweiligen Proben**

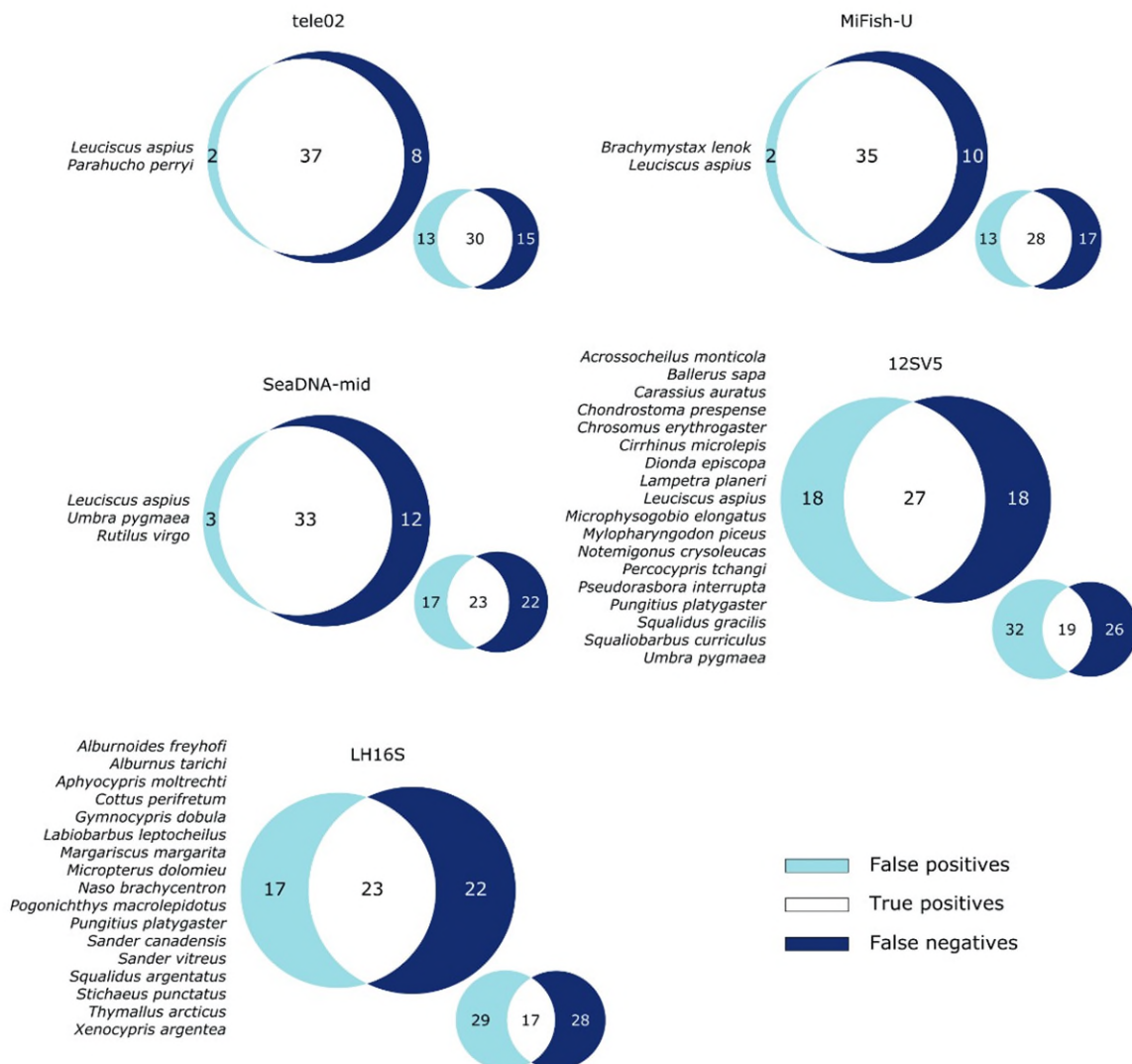
| Probe                                                                                | Gen       | Primer F (5' to 3')                             | Primer R (5' to 3')                                                                                                                       | Referenz                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Blätter Bäume ( <i>Fagus sylvatica</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Populus nigra</i> ) | COI mtDNA | NoPlantF_270<br>RGCHTTYCCHCGWATAAA<br>YAAYATAAG | mlCOIintR_W<br>GRGGRTAWACWGTTCAW<br>CCWGTNCC                                                                                              | Krehenwinkel et al. (2022)                                            |
| Blätter Bäume ( <i>Fagus sylvatica</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Populus nigra</i> ) | ITS1      | ITS1f<br>CTTGGTCATTAGAGGAA<br>GTAA              | ITS2<br>GCTGCGTTCTTCATCGATGC                                                                                                              | ITS1f: Gardes & Bruns (1993)<br>ITS2: White et al. (1990)             |
| Blätter Bäume ( <i>Fagus sylvatica</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Populus nigra</i> ) | 16S rDNA  | 799F1<br>CAGGATTAGATACCCTGG<br>TAGTCCA          | 1193R1<br>ACGTCATCCCCACCTTCC                                                                                                              | 799F1: Chelius & Triplett (2001)<br>1193R1: Bodenhausen et al. (2013) |
| Dreikantmuschel ( <i>Dreissena polymorpha</i> )                                      | 18S rDNA  | NonMetazoaF1<br>CTGTGATGCCCTTAGATGT<br>YCT      | 1:1 mixture of 2 reverse primers:<br>DreissDiet_GAG_R<br>GARACCTTGTTACGACTTCT<br>CCTT<br>DreissDiet_GTG_R<br>GAAACCTTGTTACGACTTC<br>ACCTT | Weber et al. (2023)                                                   |
| Dreikantmuschel ( <i>Dreissena polymorpha</i> )                                      | 18S rDNA  | BW_18S_F2<br>GTCCCTGCCCTTTGTACAC                | 1:1 mixture of 2 reverse primers:<br>DreissDiet_GAG_R<br>GARACCTTGTTACGACTTCT<br>CCTT<br>DreissDiet_GTG_R<br>GAAACCTTGTTACGACTTC<br>ACCTT | Weber et al. (2023)                                                   |



|                                                 |          |                                        |                                                                                                                                           |                                                                       |
|-------------------------------------------------|----------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Dreikantmuschel ( <i>Dreissena polymorpha</i> ) | 18S rDNA | EukF1<br>CAATAACAGGTCTGTGATGC          | DreissDiet_TAA_R<br>CGRAAACCTTGTTACGACTTTACTT                                                                                             | Weber et al. (2023)                                                   |
| Dreikantmuschel ( <i>Dreissena polymorpha</i> ) | 18S rDNA | BW_18S_F2<br>GTCCTGCCCTTTGTACAC        | DreissDiet_TAA_R<br>CGRAAACCTTGTTACGACTTTACTT                                                                                             | Weber et al. (2023)                                                   |
| Dreikantmuschel ( <i>Dreissena polymorpha</i> ) | 16S rDNA | MS-27F<br>AGAGTTTGATCCTGGCTCAG         | MS-338R<br>TGCTGCCTCCCGTAGGAGT                                                                                                            | Donia et al. (2011)                                                   |
| Blasentang ( <i>Fucus vesiculosus</i> )         | 18S rDNA | EukF1<br>CAATAACAGGTCTGTGATGC          | Metazoa_TAA_R<br>CGRAAACCTTGTTACGACTTTA                                                                                                   | Weber et al. (2023)                                                   |
| Blasentang ( <i>Fucus vesiculosus</i> )         | 16S rDNA | 799F1<br>CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA     | 1193R1<br>ACGTCATCCCCACCTTCC                                                                                                              | 799F1: Chelius & Triplett (2001)<br>1193R1: Bodenhausen et al. (2013) |
| Miesmuschel ( <i>Mytilus edulis</i> )           | 18S rDNA | NonMetazoaF1<br>CTGTGATGCCCTTAGATGTYCT | 1:1 mixture of 2 reverse primers:<br>NonMetazoaDiet_GAG_R1<br>CGGARACCTTGTTACGACTTCTC<br>NonMetazoaDiet_GTG_R1<br>CGGAAACCTTGTTACGACTTCAC | Weber et al. (2023)                                                   |
| Miesmuschel ( <i>Mytilus edulis</i> )           | 16S rDNA | MS-27F<br>AGAGTTTGATCCTGGCTCAG         | MS-338R<br>TGCTGCCTCCCGTAGGAGT                                                                                                            | Donia et al. (2011)                                                   |
| Schwebstoffe Flüsse (Wirbellose)                | COI      | fwhF2<br>GGDACWGGWTGAACWGTWTAYCCHCC    | fwhR2n<br>GTRATWGHCCDGCTARWACWGG                                                                                                          | Vamos et al. (2017)                                                   |
| Schwebstoffe Flüsse (Wirbeltiere)               | 12S rDNA | Tele02-fw<br>AAACTCGTGCCAGCCACC        | Tele02-rv<br>GGGTATCTAATCCCAGTTTG                                                                                                         | Taberlet et al. (2018)                                                |
| Schwebstoffe Flüsse (Prokaryoten)               | 16S rDNA | F515<br>GTGCCAGCMGCCGCGGTAA            | R806<br>GGACTACHVGGGTWTCTAAT                                                                                                              | Caporaso et al. (2011)                                                |



**Abbildung 14: Durchgeführte Primer-Validierung für das eDNA-Metabarcoding von Schwebstoff-Proben zum Nachweis von Fischen- und Rundmäulern**



Basierend auf der durchgeführten Mock-Community-Studie wurde für mitteleuropäische Fische der 12S tele02-Marker (Taberlet et al., 2018) als günstigster Marker (primer: tele02 f/r) gewählt. Quelle: Macher, Schütz et al. (2023).

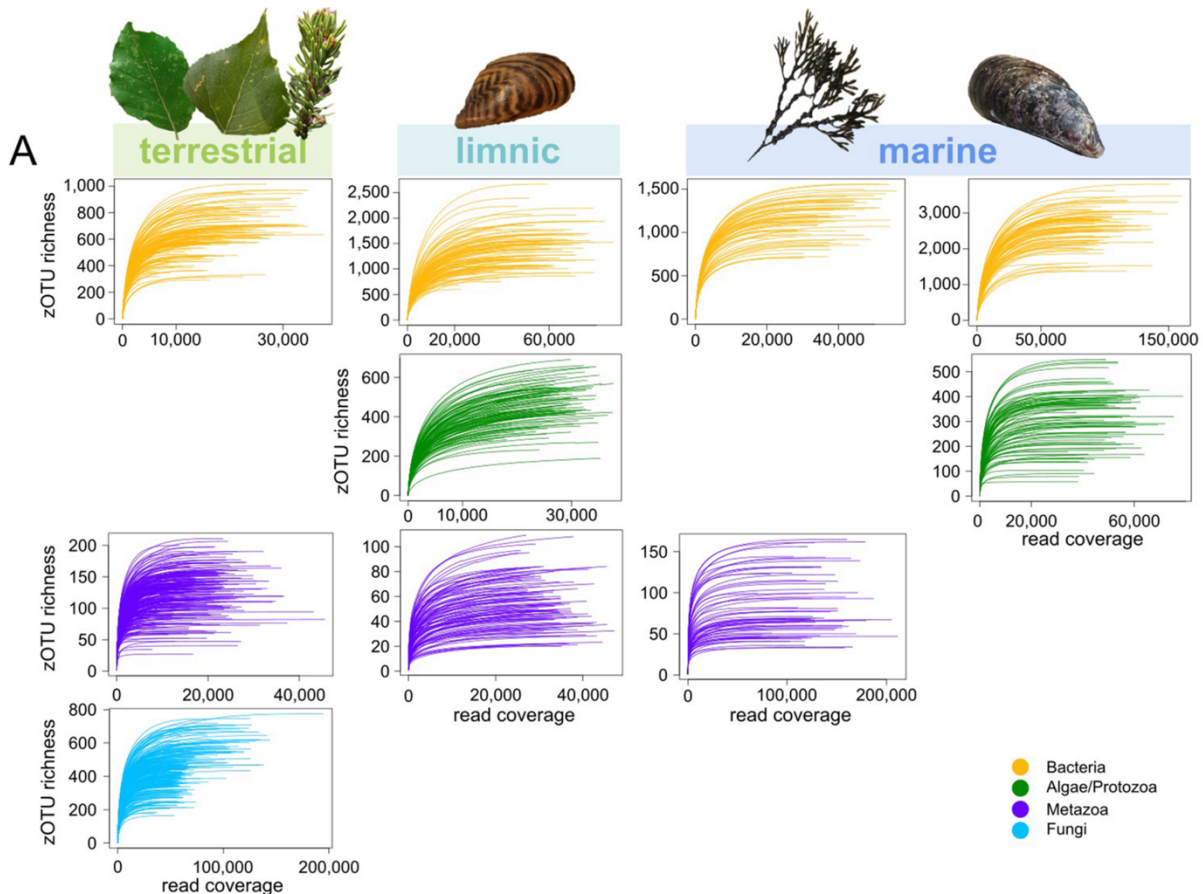
### 3.2.4 Analyse der notwendigen Sequenziertiefe

Neben der notwendigen Replikation in DNA-Isolationen und PCR musste auch die notwendige Sequenziertiefe für die untersuchten Proben und Artengemeinschaften überprüft werden. Das bedeutet, dass untersucht werden musste, wie viele DNA-Sequenzen pro Probe generiert werden müssen, um den Großteil der Artenvielfalt dieser Probe abzubilden.

Artengemeinschaften zeigen oftmals eine komplexe Zusammensetzung aus wenigen häufigen und zahlreichen, aber seltenen Arten. Wird eine Probe nicht tief genug sequenziert, fallen seltene Arten aus der Analyse heraus und die Artenliste ist unvollständig. Da die Kosten für die Sequenzierung stetig fallen, kann eine große Sequenziertiefe für überschaubare Kosten generiert werden. Im Rahmen des Projekts wurde die notwendige Sequenziertiefe für die verschiedenen Probenarten mittels sogenannter Rarefaction-Kurven überprüft und somit sichergestellt, dass sich alle Proben im Bereich der Saturierung der nachgewiesenen Diversität befinden (**Abbildung 15**).

- Die notwendige Sequenziertiefe liegt je nach Probenart und taxonomischer Zielgruppe zwischen 20 000 und 100 000 Sequenzen. Wichtiger ist Replikation insgesamt wichtiger, jedoch sollten als Zielwert 100 000 Reads je Replikat angestrebt werden.

**Abbildung 15: Saturierung der Diversität aus verschiedenen Proben mit der Sequenziertiefe**



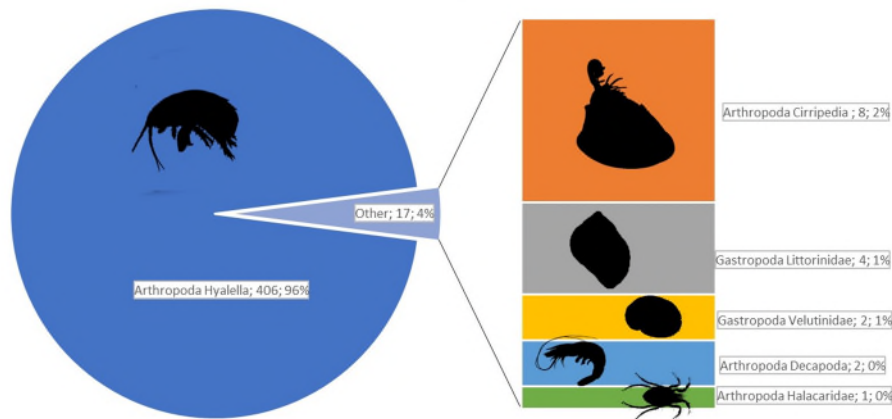
Die Abbildung zeigt die Sequenziertiefe (X-Achse, „read coverage“) gegen die nachgewiesene ESV-Diversität (Y-Achse, „zOTU richness“). Quelle: Junk et al. (2025).

### 3.2.5 Test der Genauigkeit des Nachweises von Biodiversitätsmustern

Damit die Proben für die Erforschung des Biodiversitätswandels genutzt werden können, musste die Genauigkeit der nachgewiesenen Biodiversitätsmuster überprüft werden. Hierzu wurden mehrere Versuche vorgenommen: Zunächst wurde für verschiedene Datensätze überprüft, ob die nachgewiesenen Arten für die jeweiligen Probenahmeflächen plausibel sind. Beispielsweise sollten in den Schwebstoffproben typische Fische der Brassenregion vorkommen. Die Ergebnisse der Überprüfung zeigten eine sehr gute Übereinstimmung der nachgewiesenen Fischgemeinschaften mit den Erwartungen. Außerdem sollten monophag Insekten vorwiegend auf ihren jeweiligen Wirtsbäumen vorkommen. Auch hier führte die Überprüfung zu plausiblen Ergebnissen, da sich die Insektengemeinschaften der einzelnen Baumarten sehr deutlich voneinander unterschieden. Als weitere Überprüfung wurde zusätzlich eine Handsammlung von Insekten auf Rotbuchen vorgenommen. Das Ergebnis zeigte große Ähnlichkeiten zwischen der durch Absammlung von Blättern erfassten Insektengemeinschaft und der Gemeinschaft, die in den Proben nachgewiesen wurde (Krehenwinkel, Weber, Broekmann, et al., 2022).

Ähnlich verhielt es sich auch bei den Blasentangproben. Typische mit Blasentang assoziierte Arten, die nach Absammlung mikroskopisch identifiziert wurden (z. B. Amphipoden der Gattung *Hyaletta*), konnten auch in den UPB-Proben detektiert werden (Masterarbeit Brink, 2023; **Abbildung 16**). Die taxonomische Zusammensetzung ist sehr ähnlich zu der mit DNA-Analysen gefundenen Artenzusammensetzung (siehe Junk et al., 2025 für eine detaillierte Übersicht).

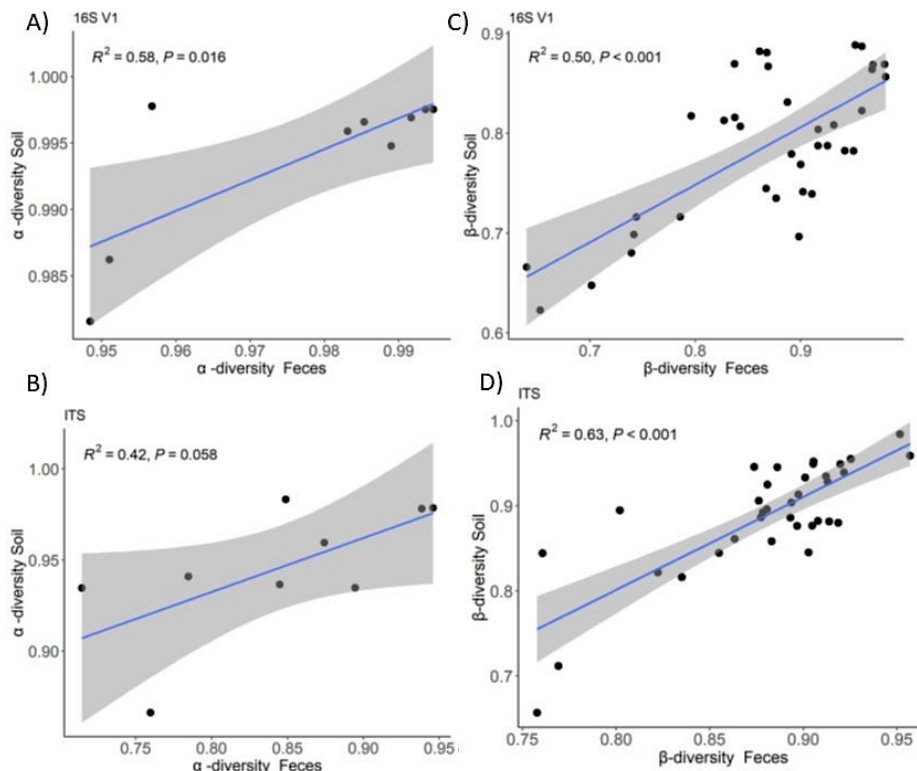
**Abbildung 16: Tiere, die von Blasentang-Thalli gesammelt und mikroskopisch bestimmt wurden**



96% aller 423 gesammelten Tiere gehörten zur Amphipodengattung *Hyaletta* (dunkelblauer Teil des Kreisdiagramms). Die restlichen 4% zu unterschiedlichen Tiergruppen (rechts). Quelle: Brink, UT (2023).

Es wurde zusätzlich geprüft, ob Regenwürmer gute eDNA-Sammler für die Bodendiversität darstellen. Dazu wurden Regenwürmer in verschiedenen Bodentypen gesammelt und im Anschluss sowohl direkte Bodenproben als auch der Kot der Würmer durch DNA-Metabarcoding analysiert (Opala 2023, **Abbildung 17**). Bakterielle Gemeinschaften wurden mittels 16S-Metabarcoding und Pilzgemeinschaften mittels ITS2-Metabarcoding charakterisiert. Zusätzlich wurden Regenwürmer in verschiedenen Böden gehältert, um die in ihrem Kot detektierte Biodiversität mit der Diversität des Bodens zu vergleichen. Die Ergebnisse zeigen, dass der Kot eines Regenwurmes ein sehr gutes Abbild der Bodendiversität darstellt. Die Regenwurm Kotproben der UPB stellen damit vielversprechende Sammler für Bodenbiodiversität dar (Opala 2023).

**Abbildung 17: Vergleich von Biodiversitätsmustern aus dem Boden und dem Kot von Regenwürmern aus demselben Boden**

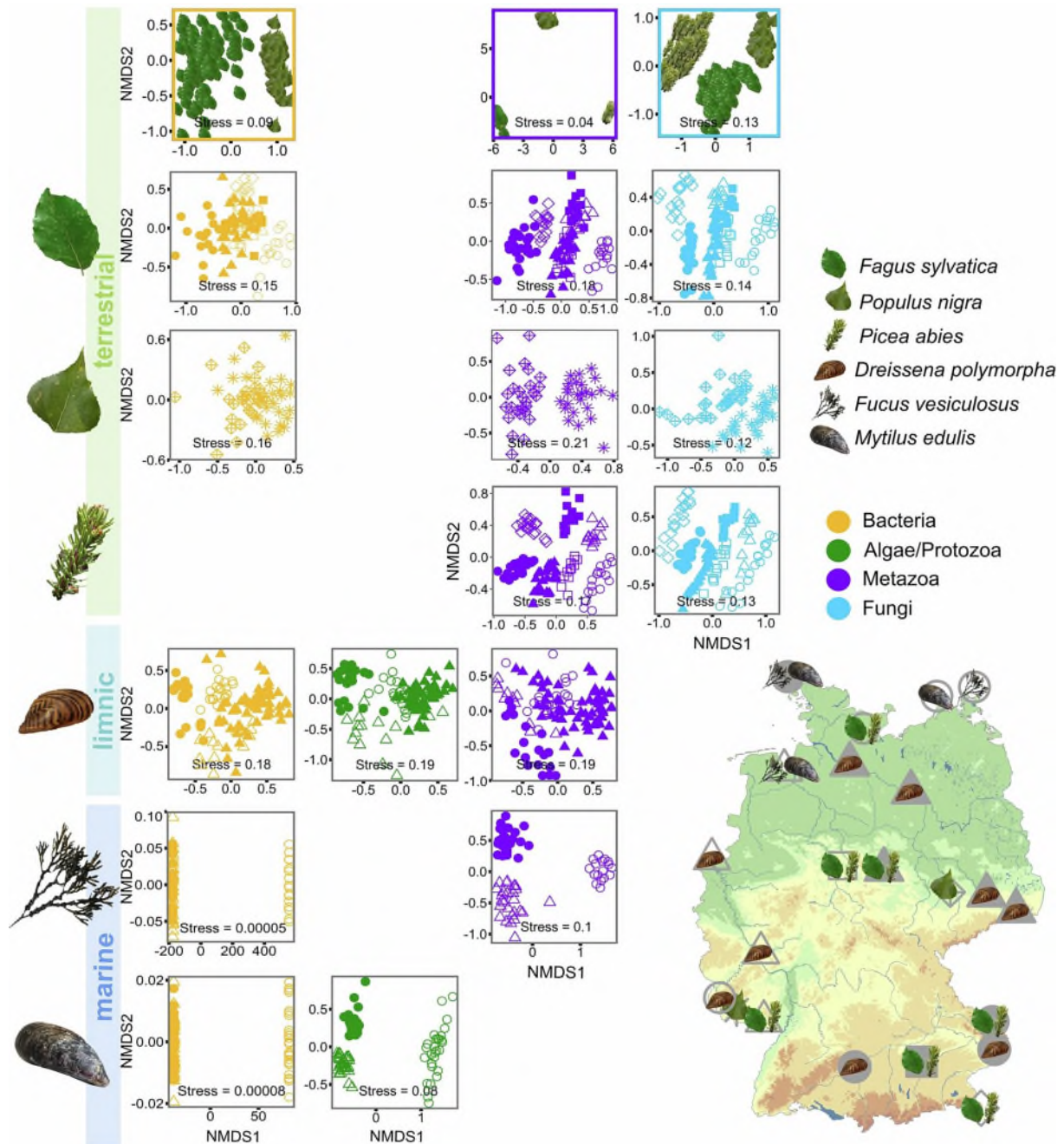


A) Simpson-Index für bakterielle Gemeinschaften, B) Simpson-Index für Pilzgemeinschaften, C) Jaccard-Distanz für bakterielle Gemeinschaften, D) Jaccard-Distanz für Pilzgemeinschaften. Es zeigt sich, dass Biodiversitätswerte des Bodens und des Wurmekotes gut korrelieren. Quelle: Opala, Masterarbeit, UT (2023).

Die vergleichende Analyse von eDNA-Metabarcoding-Ergebnissen über unterschiedliche Probenotypen (pro- und eukaryotische eDNA-Spuren in Blattproben, Miesmuscheln, Blasentang und Dreikantmuschel) zeigt über die Jahre hinweg klare standortspezifische Muster in den Lebensgemeinschaften und belegt die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Messung (**Abbildung 18**).



**Abbildung 18: NMDS-Diagramme der aus Proben nachgewiesenen Artengemeinschaften über den Stammbaum des Lebens**



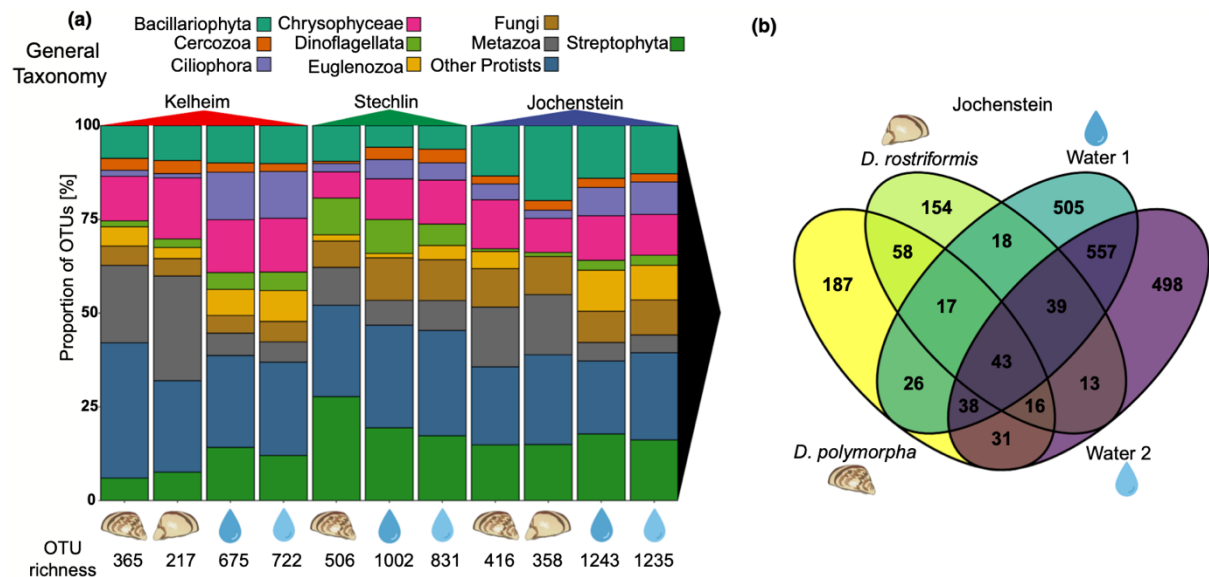
Jedes unterschiedliche Legendensymbol entspricht einem Standort und der assoziierten Artengemeinschaft. Die Nähe zweier Punkte zueinander zeigt die Ähnlichkeit der Gemeinschaften. Die Abbildung zeigt deutlich, dass Artengemeinschaften über die Jahre hinweg (mehrere gleiche Symbole) standortspezifisch sind. Quelle: Junk et al. (2025).

### 3.2.6 Vergleich aquatischer Nachweise in UPB-Proben im Vergleich zu Wasserproben

Eine weitere Überprüfung der Plausibilität der nachgewiesenen Daten fand über den Vergleich von UPB-Proben mit zusätzlich gesammelten eDNA-Wasserproben statt. Dieser Test wurde zunächst für Dreikantmuscheln durchgeführt, die als gute eDNA-Sammler gelten. Die Ergebnisse des Tests zeigten auf der Ebene taxonomischer Großgruppen eine sehr ähnliche Gemeinschaft zwischen Muschel- und Wasserproben. Auch die grundsätzlichen Muster der Biodiversität, die beide Probenarten zeigten, waren vergleichbar. Interessanterweise unterschieden sich aber die

Artenlisten beider Probenarten recht deutlich (**Abbildung 19**). Daher kann die Untersuchung der mit Dreikantmuscheln assoziierten Biodiversität nicht als Ersatz für eDNA-Wasserproben genutzt werden, sondern stellt ein Komplement zu diesen Proben dar.

**Abbildung 19: Nachweis von Artengemeinschaften aus Dreikant- und Quaggamuschelproben und eDNA-Wasserproben**



A) Auf Ebene taxonomischer Großgruppen weisen Muschelhomogenate und Wasserproben ähnliche Gemeinschaften auf und auch die detektierten Biodiversitäts-Trends sind ähnlich. B) Allerdings ist der Anteil der in beiden Methoden nachgewiesene Arten gering. Muscheln erfassen stärker die lokale Biodiversität als eDNA-Proben. Sie können somit die Erfassung komplementieren aber Wasser-eDNA nicht ersetzen. Quelle: Weber et al. (2023).

Zur Überprüfung der Homogenität der Schwebstoffproben innerhalb der Setzkästen wurden Kerne an drei Stellen innerhalb der Kästen genommen. Die Diversität dieser Kerne wurde anschließend verglichen, um die flächige Homogenität der eDNA-Signale zu überprüfen. Außerdem wurde die Tiefenschichtung untersucht, um die vertikale Homogenität der Kerne zu testen. Dazu wurden für die Proben 12S- (Fische), COI- (Wirbellose) und 16S-Metabarcoding (Bakterien) durchgeführt. Zusätzlich wurden 15 Wasserproben (je 1 L) am Einlass der Setzkästen über den Monat verteilt gefiltert, um einen direkten Vergleich zwischen Wasserproben und Schwebstoffproben zu ziehen. Alle drei Marker zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei beprobten Kernen, was für eine gute flächige Homogenität der DNA-Signale spricht. Die Signale aus unterschiedlichen Schichttiefen zeigten teilweise signifikante Unterschiede, was durch die lange Akkumulation (ein Monat) zu erwarten war. Hier gab es allerdings keinen systematischen Unterschied. Dies zeigt, dass vor der Analyse von Schwebstoffproben eine gute horizontale Durchmischung erzeugt werden sollte, um über den Gesamtzeitraum der Probenahme zu integrieren. Auch zwischen den Wasserproben und den Schwebstoffproben ließ sich ein signifikanter Unterschied feststellen. Grundsätzlich wurden mehr ESVs in den Schwebstoffproben als in den Wasserproben nachgewiesen. Auch dies war zu erwarten, da die Wasserproben nur eine Momentaufnahme darstellen, während die Schwebstoffproben über einen Monat kontinuierlich akkumulieren. Außerdem betrifft der Vergleich 15 Wasserproben (je ein Liter) gegen 56 SPM-Teilproben (~200 mg).

- Die Analysen belegen einen deutlichen Mehrwert der Analyse von eDNA aus Wasser zusätzlich zur Dreikantmuschel.

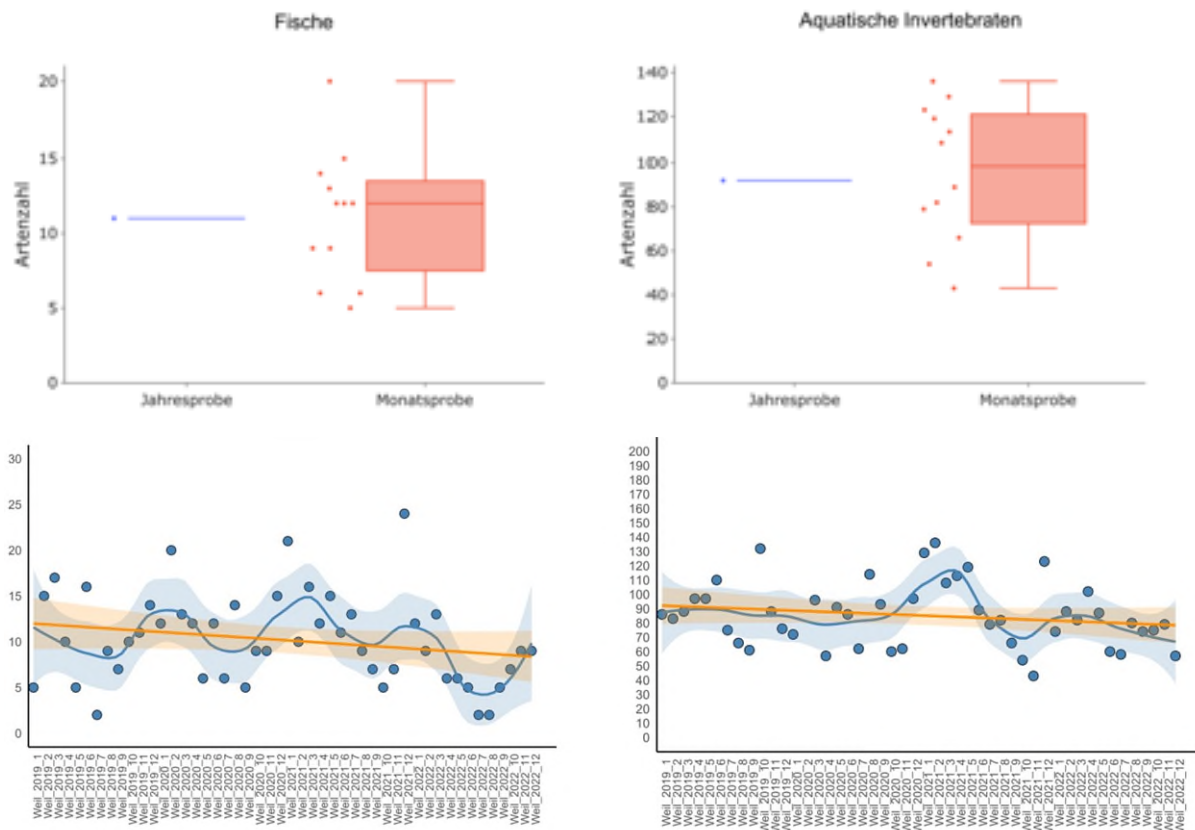


### 3.3 Bestimmung des Mehrwerts von Monats- vs. Jahresproben

#### 3.3.1 Schwebstoffe

Für die Schwebstoffe wurde geprüft, ob die Analyse von Monatsproben einen Mehrwert gegenüber Jahreshomogenaten bietet, da der Mehraufwand für monatliche Proben höher ist. Zur Analyse wurde jede Monatsprobe jeweils so behandelt wie ein Jahreshomogenat (Schütz et al., 2025). Es wurden 2 Extraktionsreplikate mit jeweils 4 PCR-Replikaten erstellt. Im Median wurden etwas mehr Arten mit den einzelnen Monatsproben gefunden, die Jahresproben gaben allerdings bereits eine gute Übersicht über die durchschnittliche Diversität (**Abbildung 20**). Die Monatsproben zeigen saisonale Schwankungen in der Artenzahl vor allem bei Fischen. Bei Addition aller 12 Monatsproben eines Jahres konnten deutlich mehr Arten als im Jahreshomogenat nachgewiesen werden. Es gilt abzuwägen, ob man ein Jahreshomogenat oder einige Monatsproben (z. B. vierteljährlich) analysiert, um dadurch zumindest einen Teil der Saisonalität abzubilden.

**Abbildung 20: Vergleich der detektierten Artenzahlen von Jahres- und Monatsproben**



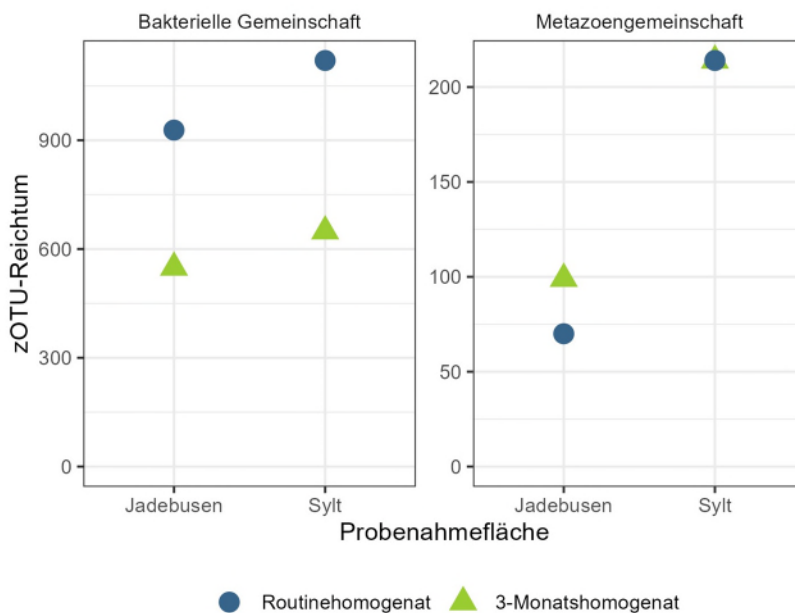
Analyse am Beispiel von Jahres- und Monatsproben an der Stelle Weil am Rhein. Vergleich der Jahre 2019-2022. Oben: links Fische via 12S-, rechts aquatische Wirbellose via COI-Metabarcoding. Unten: Trendanalyse der Monatsproben zeigen zeitliche Änderungen zwischen Monaten (links Fische via 12S-, rechts aquatische Wirbellose via COI-Metabarcoding). Quelle: eigene Darstellung, UDE.

- Während Jahresproben den Jahresdurchschnitt gut repräsentieren, erlauben Analysen von Monatsproben Analysen der jahreszeitlichen Dynamik; zudem ist die Gesamtzahl detektierter Arten durch Analyse der Monatsproben höher.

### 3.3.2 Blasentang und Miesmuscheln

Am Blasentang wurde an den Probenahme­flächen Eckwarderhörne (Jadebusen) und Sylt im April, August und Dezember zusätzlich zur Routineprobe eine Sonderprobe gesammelt und zu einem Jahreshomogenat verarbeitet. Dieses „Sonderhomogenat“ besteht im Gegensatz zum Routinehomogenat aus nur 3 statt den regulären 6 Monatsproben. Die Homogenate beider Probenahme­flächen wurden auf die assoziierte Bakterien- und Metazoengemeinschaft untersucht. Erste Ergebnisse zeigen, dass vor allem bei den Bakterien (**Abbildung 21, links**) die Anzahl der einzigartigen Gensequenzen (ESVs) im Routinehomogenat deutlich höher ist als im Sonderhomogenat. Bei den Metazoen gab es nur einen geringeren Unterschied (**Abbildung 21, rechts**); hier zeigt das Sonderhomogenat von Eckwarderhörne sogar eine höhere Artenvielfalt als das Routinehomogenat. Daraus lässt sich schließen, dass mit einer geringeren Zahl an Subproben vor allem in Bezug auf Mikroorganismen ein großer Teil der Diversität unter dem Radar bliebe. Die Analyse von Jahreshomogenaten der Miesmuschel wird im Jahr 2026 durchgeführt.

**Abbildung 21: Vergleich der detektierten Zahlen einzigartiger Sequenzen (ESVs, hier „zOTUs“) aus regulären Jahreshomogenaten (Anzahl Monatsproben n = 6) und Jahreshomogenaten aus nur 3 Monatsproben von Blasentang beider Nordseestandorte für Bakterien (links) und Metazoa (rechts)**



Quelle: eigene Darstellung, UT.

**Tabelle 4: Übersicht der in AP2 vom Projektteam vorgenommenen Arbeiten zur Integration genetischer Analysemethoden in den Betriebsablauf der UPB, zur Identifikation kritischer Arbeitsabläufe und zur Qualitätssicherung. Die Tabelle zeigt die verfolgten Ziele, die angewandte Methodik und die entsprechenden Ergebnisse (siehe Anhang A.3)**

| Ziel                                                                                   | Test                                                                      | Vorgehensweise                                                                                                  | Ergebnisse                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sicherstellung der Reinheit von Proben                                                 | Untersuchung potenzieller Kontaminationen während der Probenahme          | Nehmen von Abstrichen von den Gerätschaften, die während der Probenahme und Vorprozessierung genutzt werden     | Kreuzkontaminationen bei der Probenahme und Vorprozessierung sind vernachlässigbar; die Proben sind für genetische Analysen der Biodiversität geeignet                                                |
|                                                                                        | Untersuchung potenzieller Kontaminationen während der Probenprozessierung | Nehmen von Abstrichen von den Gerätschaften, die während der finalen Prozessierung der Proben genutzt werden    | Kreuzkontaminationen bei der Probenprozessierung sind vernachlässigbar; die Proben sind für genetische Analysen der Biodiversität geeignet                                                            |
|                                                                                        | Untersuchung potenzieller Kontaminationen in Proben                       | Untersuchung der Abundanz typischer probenassoziierter Arten in konsekutiv vermahlenden Proben in der Kryomühle | Typische probenassoziierte Arten sind in nachfolgend prozessierten Arten nicht mehr nachweisbar                                                                                                       |
|                                                                                        | Untersuchung zur Kombination von eDNA- und regulären Probenahmen          | eDNA-Wasserproben wurden vor, während und nach einer Fisch Probenahme genommen                                  | eDNA-Wasserproben zeigen vor dem Fischfang keine Kontamination; Fischfang führt zu Anreicherung von Fischen im Netz in der eDNA-Probe                                                                 |
|                                                                                        | Untersuchung taxonomischer Reinheit der Probenarten                       | Die Artreinheit von Mies- und Dreikantmuschel- sowie von Regenwurm Kotproben wurde überprüft                    | Miesmuschel: Proben weitgehend artrein; Dreikantmuschel: Proben nach Einführung eines zusätzlichen Merkmals weitgehend artrein; Regenwurm: Proben weitgehend artrein, hohe innerartliche Variabilität |
| Optimierung molekularer Protokolle zum Nachweis probenassoziierter Artengemeinschaften | Analyse der notwendigen Homogenatmenge in der DNA-Extraktion              | Erstellung von Art-Akkumulationskurven aus DNA-Extraktionen, bei denen die Homogenatmenge variiert wurde.       | Eine Homogenatmenge von 200 mg ist ausreichend                                                                                                                                                        |

|                                                              |                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Analyse der notwendigen Anzahl von DNA-Extraktionsreplikaten | Erstellung von Art-Akkumulationskurven von DNA-Extraktions-Replikaten verschiedener Probenarten     | 1–2 Replikate sind ausreichend                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Analyse der notwendigen Anzahl von PCR-Replikaten            | Erstellung von Art-Akkumulationskurven von PCR-Replikaten verschiedener Probenarten                 | 2–3 Replikate sind ausreichend                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| PCR-Primer-Auswahl                                           | Design und Test von PCR-Primern zur Anreicherung verschiedener taxonomischer Gruppen aus den Proben | Für alle Probentypen konnten entsprechende Primer gefunden oder entwickelt werden                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Analyse der notwendigen Sequenziertiefe                      | Proben wurden tief sequenziert und Art-Akkumulationskurven berechnet                                | Die notwendige Sequenziertiefe liegt. Je nach Probe, zwischen 20 000 und 100,000 Reads/Probe                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Test der Genauigkeit von Biodiversitätsmustern aus Proben    | Biodiversitätsmuster aus Proben mit konventionellen Probennahmen vergleichen                        | <p>Fischgemeinschaft aus Schwebstoffproben: gute Genauigkeit</p> <p>Insektengemeinschaft aus Blattproben: gute Genauigkeit</p> <p>Blasentangassoziierte Gemeinschaft: gute Genauigkeit</p> <p>Bodendiversität aus Regenwurmkot: gute Genauigkeit</p> <p>Gewässerbiodiversität aus Muschelproben: Übereinstimmung auf Großgruppenebene und bei grundsätzlichen Biodiversitätsmustern, bei Artenlisten wenig Übereinstimmung zu eDNA-Beprobung; Komplementärer Nutzen</p> |

## 4 Arbeitspaket 3 – Generation und Datenauswertung der eDNA-Zeitreihendaten

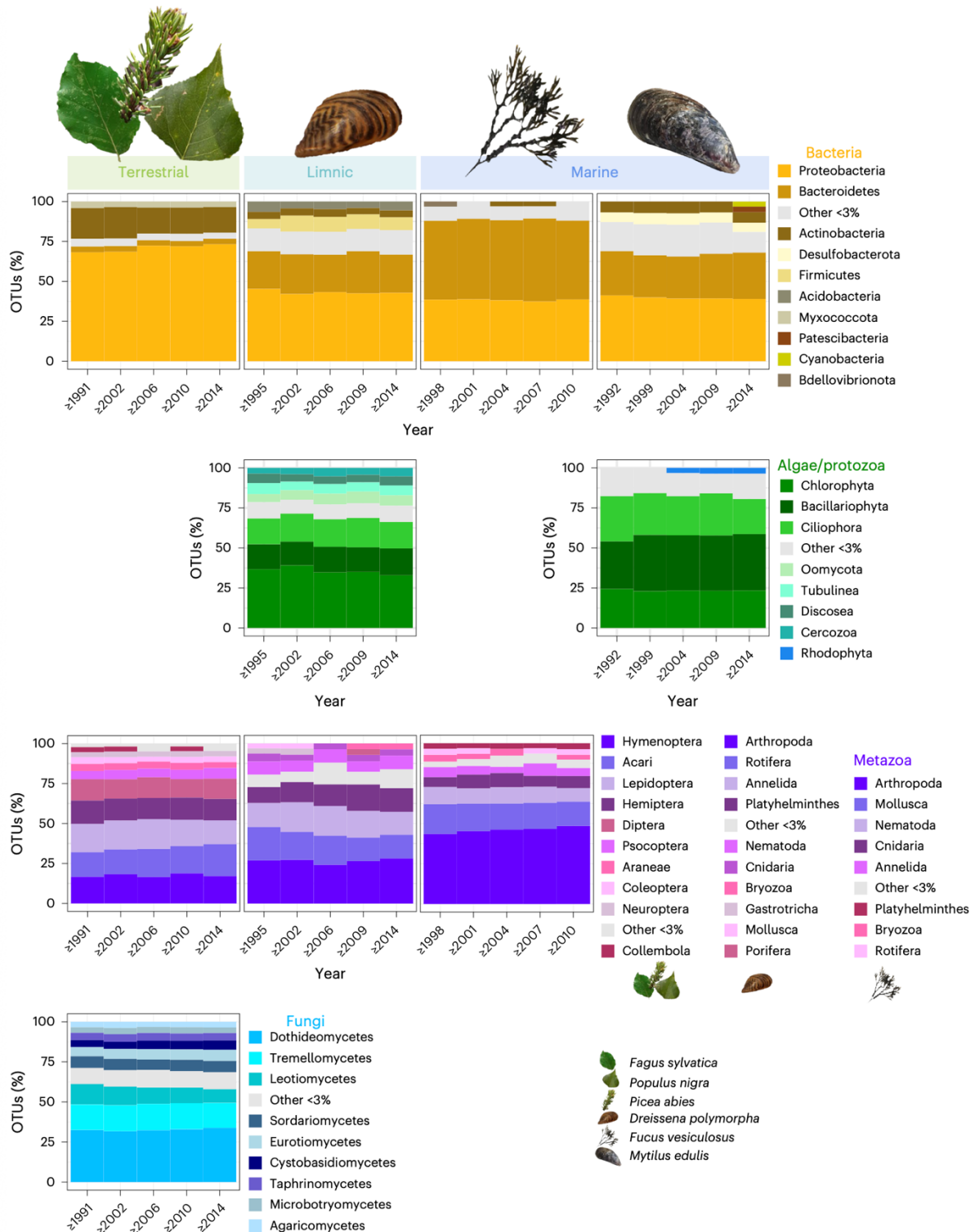
Nach Optimierung der molekularen Protokolle wurden Daten generiert, mit denen die Veränderung der Biodiversität über die Zeit analysiert werden sollte. Die Datengenerierung basierte auf den in AP1–3 validierten und plausibilisierten Labor- und Datenanalyseroutinen. Die Biodiversitätsdaten deckten alle limnischen, marinen und terrestrischen Lebensräume ab und umfassten mehrere Jahrzehnte. Der Schwerpunkt der Analysen lag gemäß der Leistungsbeschreibung auf den Veränderungen von Lebensgemeinschaften (Artendiversität) in Raum und Zeit. Mit DNA-Metabarcoding wurden Biota- und Schwebstoffproben analysiert, die auf unterschiedliche Weise als eDNA-Sammler fungieren. Außerdem wurden Bodenproben metagenomisch und Regenwurm- sowie Aalmutterproben populationsgenomisch untersucht. Zusätzlich wurde eine Zeitreihe von Genexpressionsdaten aus Aalmuttern generiert (transkriptomische Untersuchung). Im Folgenden werden diese Zeitreihen und Analyseverfahren kurz vorgestellt und beschrieben. Die Zeitreihen wurden in den unter AP4 dargestellten Fallstudien (Kapitel 5) weiterverwendet.

### 4.1 Biodiversität auf Ebene von Artengemeinschaften und Ökosystemen

#### 4.1.1 Miesmuscheln – marin – Metabarcoding

Miesmuscheln leben als Filtrierer im Küstenbereich und reichern durch ihre Filtrationsaktivität eDNA aus der sie umgebenden Wassersäule in ihrem Verdauungstrakt an. Sie eignen sich daher als eDNA-Sammler für assoziierte Lebensgemeinschaften. Es wurden drei Zeitreihen für den Zeitraum von 1985–2020 an den zwei Probenahmeflächen der Nordsee und einer der Ostsee erarbeitet. In den Muscheldaten konnten verschiedene taxonomische Gruppen erfasst werden: Mit 16S-Metabarcoding wurden die prokaryotische Lebensgemeinschaft sowie mit 18S-Metabarcoding die nicht-tierischen Eukaryoten angereichert, die insbesondere aus Phytoplankton bestanden, das der Muschel als Nahrung dient. Für die Analysen wurde ein spezifischer Primer genutzt („NonMetazoa\_Diet“, siehe **Tabelle 3**), der Tiere, inklusive der Miesmuschel, von der Amplifikation ausschließt, andere Eukaryoten aber amplifiziert. Die Analyse wurde über OTUs vorgenommen. Insgesamt wurden 21 266 Bakterien-OTUs aus 180 Ordnungen und 47 Phyla sowie 3551 OTUs von nicht-tierischen Eukaryoten aus 160 Ordnungen und 20 Phyla nachgewiesen (siehe **Abbildung 22** für eine Übersicht).

**Abbildung 22: Taxonomische Zusammensetzung der mit terrestrischen, marinen und limnischen UBP-Probenorganismen assoziierten Lebensgemeinschaften zu verschiedenen Zeitpunkten**



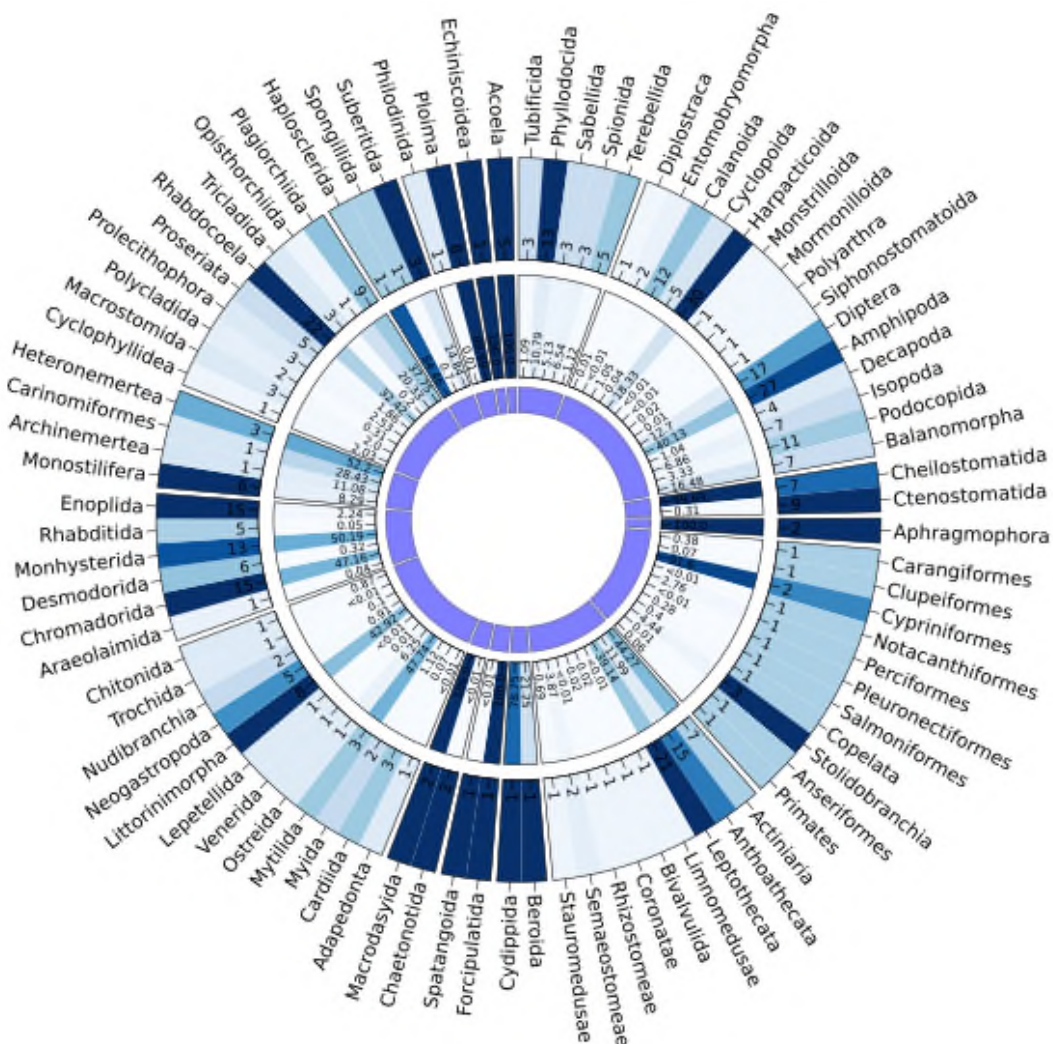
In der Abbildung ist für Bakterien, Phytoplankton und aquatische Metazoa die Ebene des Stammes, für terrestrische Metazoa die Ebene der Ordnung und für blattassoziierte Pilze die Ebene der Klasse dargestellt. Quelle: Junk et al. (2025).



#### 4.1.2 Blasentang – marin – Metabarcoding

Blasentang ist eine bestandsbildende Braunalge, die entlang der europäischen Küste vorkommt und einen Lebensraum für zahllose Tiere und Mikroorganismen bildet. Die DNA dieser Organismen kann für genetische Analysen angereichert werden. Die untersuchten Blasentangproben stammten von den gleichen drei Probenahmegebieten in Ost- und Nordsee wie die Miesmuschelproben und umfassen einen Zeitraum von 1985–2021. Zur Analyse des Mikrobioms wurde, ähnlich wie bei der Miesmuschel, die 16S-rDNA amplifiziert. Für den Nachweis von Tieren wurden spezifische 18S-rDNA-Primer verwendet, die Braunalgen-DNA nicht amplifizieren. Insgesamt wurden 5474 Bakterien-OTUs aus 101 Ordnungen und 25 Phyla und 787 Tier-OTUs aus 78 Ordnungen und 18 Phyla nachgewiesen (**Abbildung 22** für generelle Übersicht, **Abbildung 23** für spezifische Darstellung der mit der 18S detektierten Tiergruppen).

**Abbildung 23: Übersicht über die Anzahl der in den Blasentangproben erfassten Arten von und wirbellosen Tieren**



Äußerer Kreis: Anzahl Arten der jeweiligen Gruppen, innerer Kreis: Anteil der Sequenzen (Reads).

Quelle: eigene Darstellung, UT.

#### 4.1.3 Dreikantmuscheln – limnisch – Metabarcoding

Dreikantmuscheln stellen eine invasive Art dar, die sich bereits im 19. Jahrhundert über die großen europäischen Flüsse ausgebreitet hat. Aufgrund ihrer Filteraktivität sind

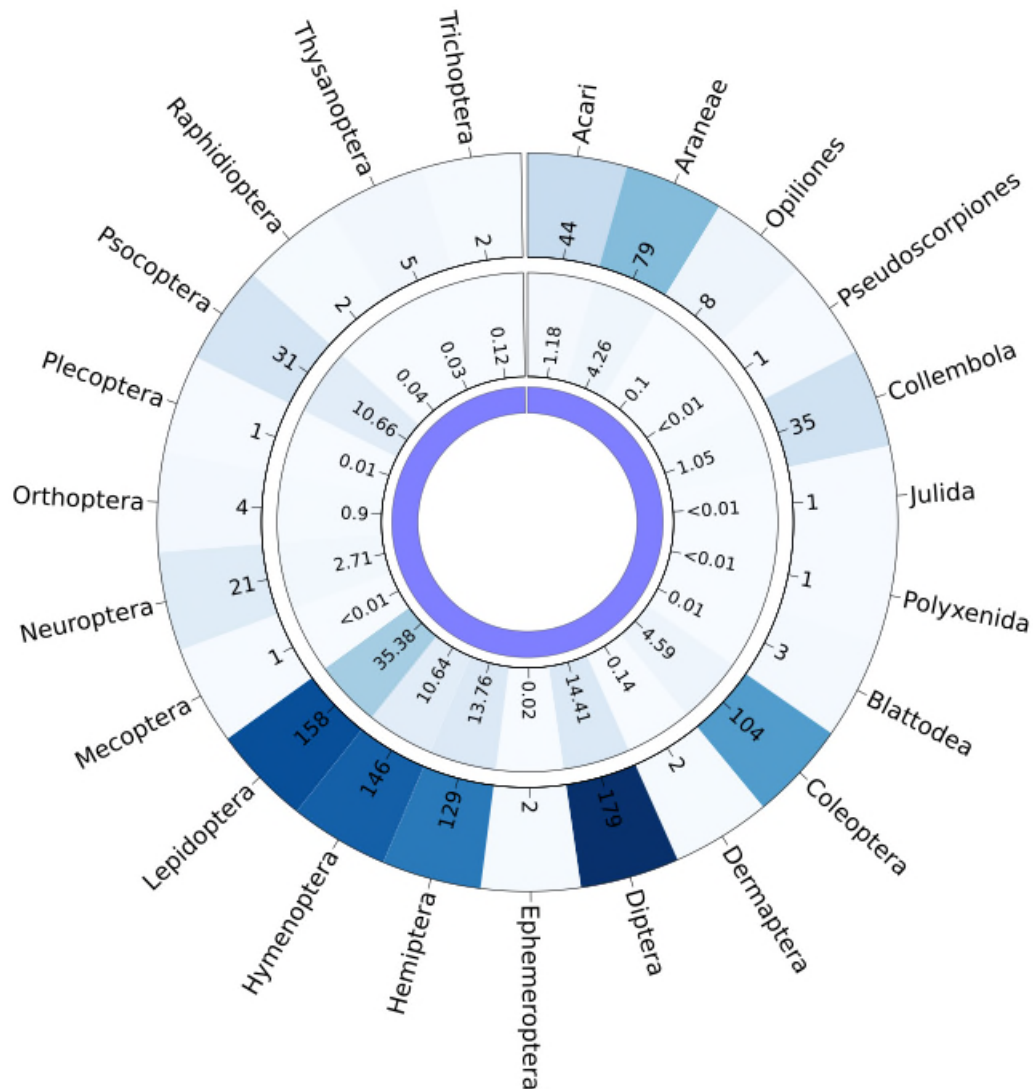
Dreikantmuscheln vielversprechende Sammler von eDNA. Es wurden Dreikantmuschel-Zeitreihen von 9 Probenahmeflächen in 4 Flüssen von 1994–2020 untersucht. Für die Dreikantmuscheln wurden analog zu den Miesmuscheln ein 16S-Marker verwendet, um die bakteriellen Gemeinschaften zu untersuchen. Zusätzlich wurden ein 18S-Primer genutzt, der die Dreikantmuschel spezifisch blockiert, aber andere Tiere amplifiziert und so die muschellosoziierte Tierlebensgemeinschaft charakterisiert. Zuletzt wurde mittels eines weiteren 18S-rDNA Primers eukaryotisches Phytoplankton aus den Muschelproben angereichert. Insgesamt wurden 14 292 Bakterien-OTUs aus 184 Ordnungen und 34 Phyla, 5587 OTUs von nicht-tierischen Eukaryoten aus 173 Ordnungen und 20 Phyla und 523 Tier-OTUs aus 71 Ordnungen und 16 Phyla nachgewiesen.

#### 4.1.4 Blätter von Bäumen – terrestrisch – Metabarcoding

Blätter aus den Kronen von vier typischen Forstbäumen in Deutschland wurden als Sammler für Luftschadstoffe 1985 etabliert, und schrittweise an 16 Probenahmeflächen umgesetzt, die einen Landnutzungsgradienten von urbanen und landwirtschaftlichen Gebieten zu Forsten und Nationalparks abbilden. Die Blätter beinhalten DNA-Spuren der baumassoziierten Mikroorganismen, aber auch der Tiere, die die Baumkrone bewohnen. Insbesondere Gemeinschaften von Gliederfüßern (also Insekten, Spinnentiere, Tausendfüßer und Krebstiere, wie z. B. Asseln) hinterlassen viel nachweisbare eDNA in ihrem Lebensraum. Es wurden mit 16S-rDNA die bakteriellen Gemeinschaften der Blattproben charakterisiert. Außerdem wurden mit dem nukleären ITS1-Marker die baumassoziierte Pilzgemeinschaft erfasst und die Gliederfüßerdiversität über einen COI-Marker bestimmt (**Abbildung 24**). Insgesamt wurden 5183 Bakterien-OTUs aus 94 Ordnungen und 16 Phyla, 6250 Pilz-OTUs aus 113 Ordnungen und 5 Phyla und 3271 Gliederfüßer-OTUs aus 24 Ordnungen nachgewiesen. Daneben fanden sich im COI-Datensatz DNA Spuren verschiedener Wirbeltierarten, insbesondere Vögel (19 Arten) und Säugetiere (10 Arten). Diese Tiergruppen wurden bislang noch nicht weiter untersucht. Hier bietet sich aber eine interessante Option für zukünftige Analysen.

Für alle Insekten- und Pilz-OTUs sollte zudem eine ökologische Annotation vorgenommen werden. Für die Pilz-OTUs wurde eine Datenbank verwendet, mit der die Ökologie vieler Arten charakterisiert werden kann. Für die nachgewiesenen Insektenarten wurden mittels einer umfassenden Literaturrecherche bestimmte Merkmale wie Körpergröße, Mobilität, ökologische Spezialisierung und die Position im Nahrungsnetz charakterisiert. Diese Analyse kann die Trendaussagen verbessern und beispielsweise zeigen, ob bestimmte Ökotypen/Merkmale besonders von Veränderungen betroffen sind. Neue Erkenntnisse deuten z. B. darauf hin, dass spezialisierte Insekten deutlich stärker vom Insektensterben betroffen sind als generalistische Arten (Habel et al. 2026). Fast alle nachgewiesenen Arten konnten, zumindest für einige Parameter, ökologisch annotiert werden. Die Ergebnisse zeigen eine ökologisch sehr diverse Artengemeinschaft (**Abbildung 25**). Alle wichtigen Nahrungsökologien der Insekten sind in den Daten repräsentiert. Darunter befinden sich viele spezialisierte Arten, die nur eine oder wenige Nahrungsressourcen nutzen (Mono- und Oligophage), aber auch diverse Generalisten (Polyphage). Ein weiterer wichtiger Faktor für das Verständnis des Insektensterbens ist die Körpergröße der Tiere. Klimawandel selektiert möglicherweise für immer kleinere Insektenarten (Gardner et al., 2011). Dieser Trend sollte sich aus den Zeitreihen ablesen lassen. Eine detaillierte Analyse der ökologischen Annotationen der Insekten und ihrer Bedeutung mit Blick auf einen Verlust von Diversität wird bis Ende 2026 erfolgen.

**Abbildung 24: Übersicht über die Anzahl der in den Blattproben der Bäume erfassten Arten von und wirbellosen Tieren mithilfe des COI-Gens**



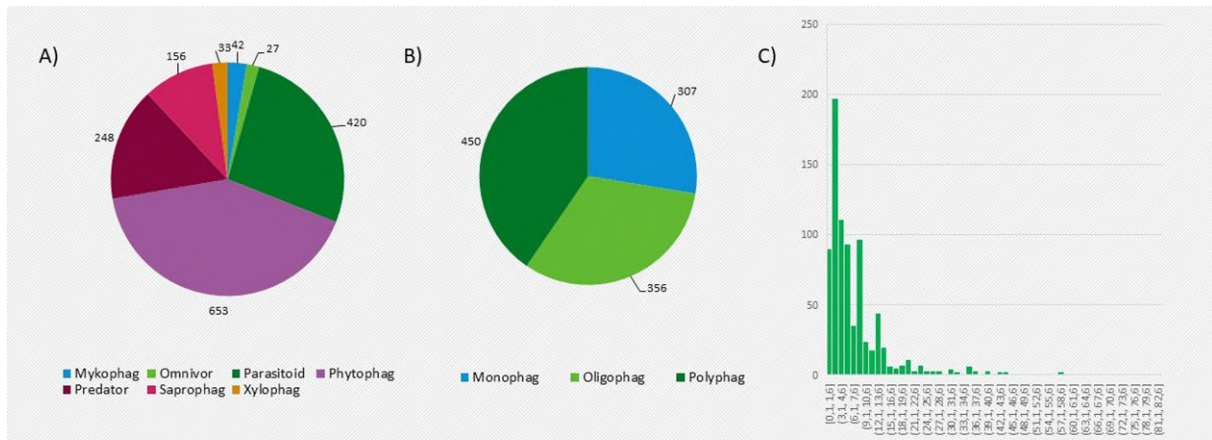
Äußerer Kreis: Anzahl Arten der jeweiligen Gruppen, innerer Kreis: Anteil der Sequenzen (Reads).

Quelle: eigene Darstellung, UT.

Für weitergehende Analysen wurden 117 Individuen von 21 ausgewählten Spinnenarten gesammelt, die in Baumkronen der untersuchten Gebiete vorkommen, und ihr Darminhalt charakterisiert. Das Ziel dieser Untersuchung war es, ein Nahrungsnetz zu rekonstruieren und mögliche Veränderungen dieses Netzwerkes über die Zeit zu verfolgen. In den Spinnendärmen konnten 496 OTUs (130 sicher bestimmte Arten) detektiert werden, die die Nahrung dieser Spinnen abbilden. Allerdings war die Schnittmenge der Nahrungslisten zu klein, um ein umfassendes Nahrungsnetz zu rekonstruieren. Von 130 in den Spinnen nachgewiesenen Beuteinsekten wurden nur 26 auch in den UPB-Daten gefunden. Der gefundene Überlapp ist allerdings vielversprechend. Zur Vervollständigung des Nahrungsnetzes wird 2026 versucht an einigen Probenahmestandorten gezielt Spinnen zu fangen, um das Nahrungsnetz zu vervollständigen.



**Abbildung 25: Beispiel für eine ökologische Annotation der aus Baumkronen nachgewiesenen Gliederfüßer**



A) Anteil verschiedener Nahrungsökologien für 1604 Gliederfüßerarten, B) trophische Spezialisierung für 1113 Arten, C) Verteilung der Körpergrößen für 811 Arten. Quelle: eigene Darstellung, UT.

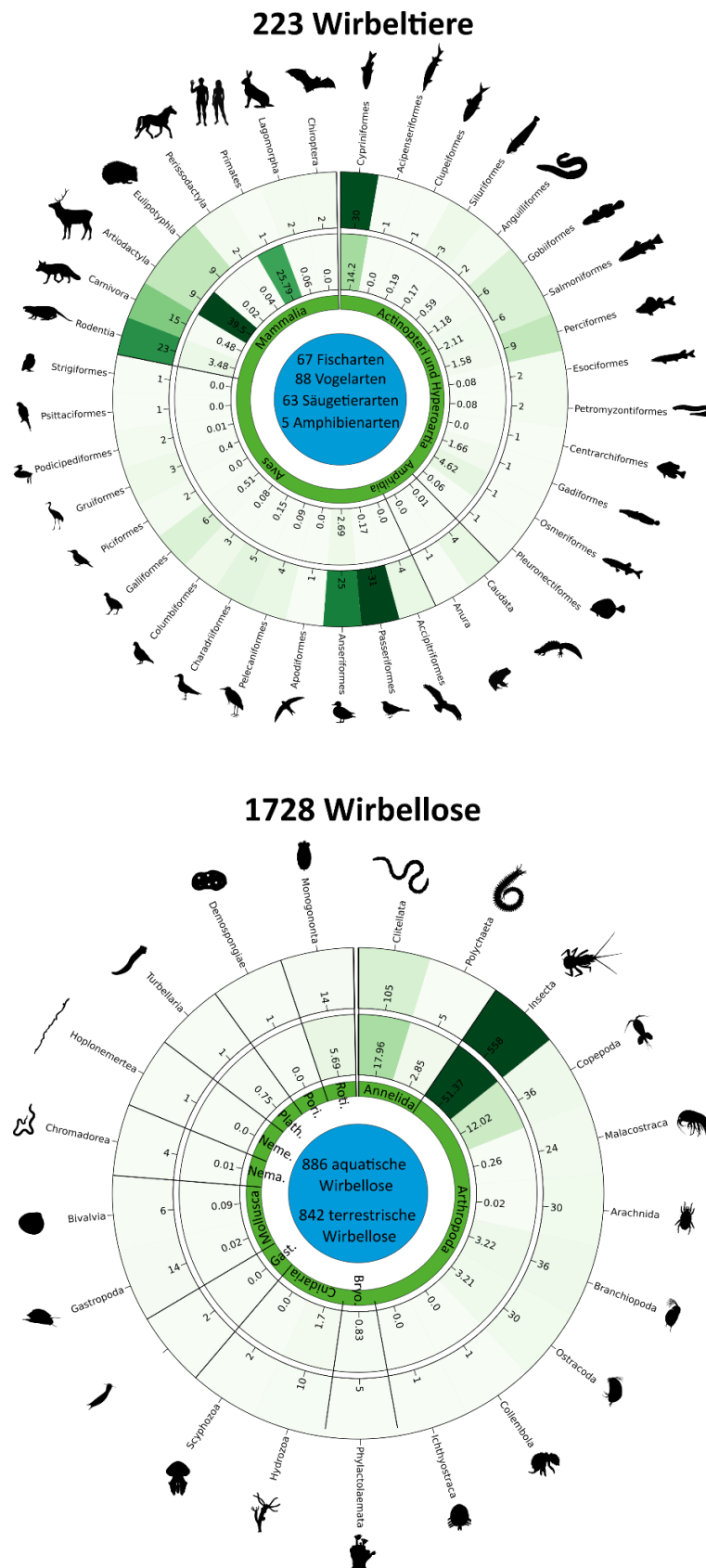
#### 4.1.5 Schwebstoffe – limnisch – Metabarcoding

Die BfG sammelt für die UPB an den großen Flüssen Deutschlands Schwebstoffproben, die beispielsweise für die Untersuchung von Schadstoffen und Elementen aus der Wassersäule verwendet werden. Die untersuchten Schwebstoffe wurden seit 2005 in 6 Flüssen an 13 Probestellen monatlich entnommen und zu Jahresmischproben aggregiert. Sie wurden auf DNA-Signale von Fischen und Makrozoobenthos untersucht und Zeitreihen von 2005 bis 2021 für diese Organismengruppen generiert. Während zur Charakterisierung der Fischgemeinschaft ein kurzes Fragment der mitochondrialen 12S-rDNA amplifiziert wurde, wurde für das Makrozoobenthos ein Fragment des mitochondrialen COI-Genes verwendet. Zunächst wurden OTUs generiert und diese dann Arten zugewiesen und analysiert. Insgesamt konnten im Datensatz 63 Fischarten sowie 891 Arten aquatischer Wirbelloser nachgewiesen werden. Außerdem wurden eDNA-Signale zahlreicher Säugetier-, Vogel-, Amphibien- sowie terrestrischer Wirbellosenarten detektiert, die bisher nicht weiter analysiert wurden (**Abbildung 26**). Die Zeitreihe für Bakterien (16S) liegen ebenfalls vor uns eine Übersicht ist in **Anhang A.5** dargestellt. Eine detaillierte Analyse wird erst Mitte 2026 im Rahmen einer Masterarbeit an der UDE ausgewertet werden können.

#### 4.1.6 Regenwurmkörper – terrestrisch – Metabarcoding

Regenwürmer haben als Ökosystemingenieure eine essenzielle Funktion für die Bodengesundheit und werden seit 1994 an 5 Probenahme Flächen in Deutschland beprobt. Sie sind mit einem komplexen Mikrobiom assoziiert, das wichtige Funktionen für die Fitness der Tiere übernimmt und damit eine große Rolle für ihre Ökosystemfunktion spielt. Zur Charakterisierung des bakteriellen Mikrobioms wurden die Proben mit 16S-rDNA-Metabarcoding untersucht. Eine Untersuchung des Pilzmikrobioms mittels ITS1-Metabarcoding findet erst ab Mitte 2026 statt. Aufgrund der umfangreichen taxonomischen Nachuntersuchung des Regenwurms (SGN, UT) hat sich die Analyse der Daten verzögert. Eine detaillierte Auswertung der generierten mikrobiellen Daten ist erst nach Projektabschluss zu erwarten.

Abbildung 26: Übersicht über die Anzahl der in den Schwebstoffproben erfassten Arten von Wirbeltieren und wirbellosen Tieren



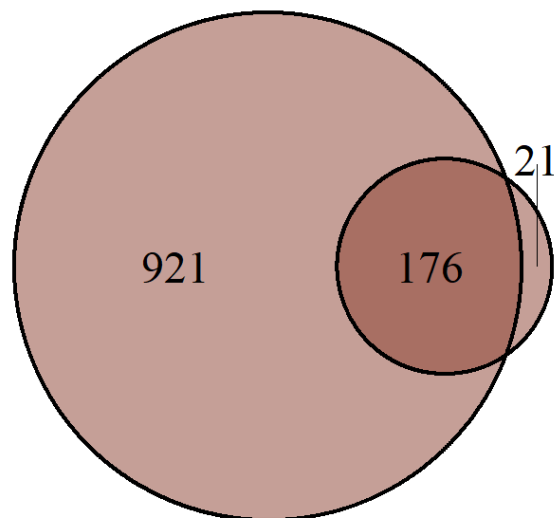
Äußerer Kreis: Anzahl Arten der jeweiligen Gruppen, innerer Kreis: Anteil der Sequenzen (Reads).  
 Quelle: eigene Darstellung, UDE.

#### 4.1.7 Regenwurm Kot – terrestrisch – Metabarcoding:

Neben dem Körper der Regenwürmer wird auch ihr Kot gesammelt und separat archiviert. Regenwürmer graben sich permanent durch den Boden und nehmen bei ihrer Grabtätigkeit organisches Material auf. Die Proben beinhalten den Kot von hunderten von Regenwürmern und sollten daher ein integratives Bild der Biodiversität einer Probenahme fläche liefern. In einer Teststudie wurde der Regenwurm Kot ausgewählter Proben mit mehreren Markern amplifiziert, um verschiedene taxonomische Gruppen zu charakterisieren. Dazu wurden nukleäres ITS1 für Pilze, 16S-rDNA für Bakterien und 18S-rDNA für eukaryotische Organismen genutzt. Die Ergebnisse waren sehr vielversprechend – der Wurm Kot bildet eine weitgehend andere Artengemeinschaft ab, als der Körper der Tiere. So zeigt die Untersuchung von 18S-rDNA fast 1000 ESVs, die ausschließlich im Kot vorkommen und nur knapp 200 im Körper. Die ESVs im Kot stammen vermutlich aus der Umwelt des Wurms, bzw. dem Boden (**Abbildung 27**). Daher sollen nun alle zur Verfügung stehenden Kotproben mit diesen Markern analysiert werden. Zuvor wird allerdings noch eine Strategie zur Probenprozessierung entwickelt, da die meisten Regenwurm Kotproben noch nicht kryovermahlen sind.

**Abbildung 27: Vergleich der eukaryotischen OTUs, die in Proben von Regenwurm Kot (links) und Regenwurm Körper (rechts) gefunden wurden**

---



Die Abbildung zeigt die Anzahl eukaryotischer ESVs, die aus dem Homogenat von Körpern (rechts) und Kot (links) des Regenwurms *Lumbricus terrestris* nachgewiesen wurden. 176 ESV wurden in beiden Probenotypen gemeinsam nachgewiesen. Die Abbildung zeigt eine große Biodiversität von über 1000 ESVs in den Homogenaten des Regenwurmkots. Quelle: Opala 2023, UT.

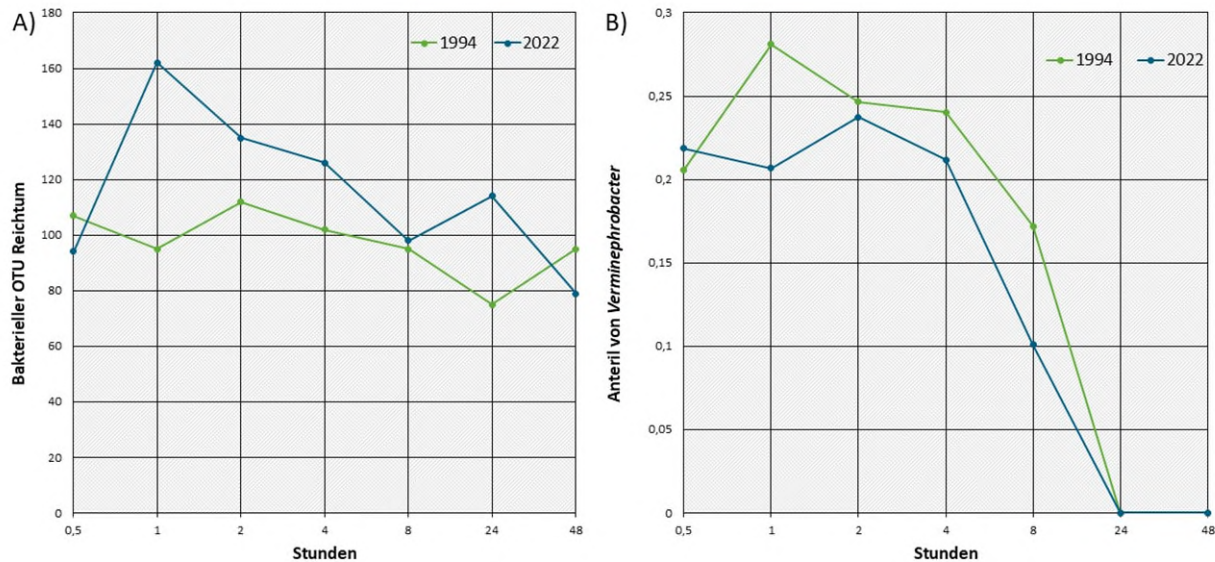
#### 4.1.8 Regenwurm Körper – terrestrisch – Kultivierung

In einer weiteren Pilotstudie wurden die Proben der Regenwurm Körper verwendet, um zu evaluieren, ob Mikroorganismen aus den Proben wieder zum Leben erweckt und anschließend experimentell untersucht werden können. Dazu wurden zwei Regenwurmproben (1994 und 2022) über einen unterschiedlich langen Zeitraum (0,5/1/2/4/8/24/48 h) in Nährmedien kultiviert. Mittels 16SrDNA-Metabarcoding wurden die kultivierten Gemeinschaften dann taxonomisch charakterisiert. Die Kultivierung zeigte, dass diverse Bakterien den Prozess des Einfrierens und der anschließenden Langzeitlagerung auf Flüssigstickstoff überleben. ESVs hunderter typischer Bodenbakterien sowie der spezifische Symbiont des Regenwurms *Verminephrobacter* (Lund et al., 2014), konnten wiedererweckt werden. Die nachgewiesene



Artenvielfalt nahm mit der Kultivierungsdauer stetig ab, vermutlich weil konkurrenzstarke Bakterien unter Laborbedingungen andere Arten auskonkurrieren. Das zeigt das Beispiel des Symbionten *Verminephrobacter*, der nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar war (**Abbildung 28**). Zurzeit sind Versuche mit anderen Probenarten der UPB in Vorbereitung, mit denen das Potenzial der Proben für die Kultivierung umfassend getestet werden soll. Auch wenn die Bakteriengemeinschaften der Proben nicht vollständig kultivierbar sind, zeigt die Pilotstudie eindrucksvoll das Potenzial der Proben, um auch die physiologische Integrität und Anpassungsprozesse der Organismen selbst über lange Zeiträume untersuchen zu können.

**Abbildung 28: Kultivierung von Bakterien aus Regenwurmhomogenaten**



A) Anzahl bakterieller OTUs, deren Träger aus den Regenwurmhomogenaten von 1994 und 2022 wieder zum Leben erweckt werden konnten. Es zeigt sich eine Abnahme der Artenvielfalt mit längerer Kultivierungszeit. B) Anteil von *Verminephrobacter*, einem spezifischen Symbionten des Regenwurms, an den bakteriellen Sequenzen. Der Anteil von *Verminephrobacter* nimmt mit zunehmender Kultivierungszeit ab und ist nach 24 h nicht mehr detektierbar. Quelle: eigene Darstellung, UT.

#### 4.1.9 Boden – terrestrisch – Metagenomik

Bodenproben werden seit 2002 an 11 Probenahmeflächen der neun Probenahmegebiete alle vier Jahre genommen. Die Bodenproben wurden mit Metagenomik-Verfahren analysiert. Dazu wurde genomische DNA aus der jeweiligen Bodenprobe isoliert und sequenziert. Im Anschluss wurden taxonomisch informative Sequenzen aus dem genomischen Datensatz gefiltert. Für die Analyse wurden Zeitreihen für Bakterien, Pilzen und Tieren generiert. Aus den Metagenomen dieser Zeitreihen konnten 3889 bakterielle Taxa (unterhalb der Domänenebene), 228 Pilztaxa und 287 tierische Taxa identifiziert werden.

### 4.2 Biodiversität innerhalb einzelner Arten

#### 4.2.1 Regenwürmer – terrestrisch – Populationsgenomik

Regenwurmproben wurden stellvertretend für die Untersuchung der Eignung der unterschiedlichen biologischen Probenarten der UPB für populationsgenomische Untersuchungen genutzt. Diese Proben setzen sich aus Hunderten von Regenwürmern zusammen, weswegen sie gut für die Methode der Poolsequenzierung geeignet sind. Darüber hinaus umfassen die Regenwurmzeitreihen fast 40 Jahre. Populationsgenome für 89

Regenwurmproben von 5 Probenahmeflächen generiert, die zwischen 1990 und 2021 gesammelt wurden. Wie bei der Darstellung der Ergebnisse der Eignungsanalyse erläutert (**Kapitel 3**), wurden divergente mitochondriale ESVs gefunden, die darauf hindeuten könnten, dass es sich bei den Regenwurmproben um Mischproben verschiedener Arten handelt, wobei Artreinheit an den meisten Standorten in Kapitel 3 belegt wurde. Hierzu sollen finale Untersuchungen 2026 erfolgen.

#### **4.2.2 Aalmutter – marin – Populationsgenomik**

Die Aalmutter ist eine in Nord- und Ostsee weit verbreitete Fischart und Indikatororganismus für Schadstoffbelastungen an der Küste. Archivierte Aalmutterproben gibt es seit 1992 an drei Probenahmeflächen in Nord- und Ostsee. Sie bestehen aus zahlreichen Individuen (47–309 in der Nordsee und 39–127 in der Ostsee). Der Unterschied in der Probengröße innerhalb und zwischen Nord und Ostsee ergibt sich durch die sehr unterschiedlichen Größen der Tiere in beiden Meeren. Aalmuttern aus der Ostsee sind wesentlich größer, so dass weniger Tiere notwendig sind, um das Zielgewicht von 1,1 kg pro Probe zu erreichen. Auch nimmt die Aalmutter in den letzten Jahren in ihrer Körpermasse ab, was zu einer erhöhten Probenzahl führt. Dank einer Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft wurden neben den Regenwurmproben auch Aalmutterproben populationsgenomisch untersucht. Zusätzlich wurden Aalmutterzeitreihen von der schwedischen und dänischen Probenbank sowie weiterer Programme anderer Nord- und Ostsee Länder in die Studie integriert. Insgesamt wurden Populationsgenome von 20 Probenahmeflächen für den Zeitraum von 1992–2022 generiert. Die Ergebnisse werden gerade zu einer Publikation zusammengefasst, die 2026 erscheinen soll.

#### **4.2.3 Aalmutter – marin – Transkriptomik**

Die Aalmutter ist eine kälteangepasste Fischart, die empfindlich auf den Klimawandel reagiert. Um genetische Signaturen von klimabedingtem Stress in natürlichen Aalmutterpopulation detektieren zu können, wurden Transkriptome von verschiedenen Sammelzeitpunkten sequenziert und analysiert. Dazu wurden jeweils 8 Aalmutterleberproben der 3 Nord- und Ostseeprobenahmeflächen verwendet. Insgesamt deckt die transkriptomische Zeitserie 30 Jahre ab und umfasst 24 Proben. Ergänzend wurde ein Experiment durchgeführt, in dem Aalmuttern in Aquakultur thermischem Stress ausgesetzt wurden. Dieser Versuch diente dem Vergleich von Genexpressionsantworten auf experimentellen und natürlichen Stress. Finanziert wurde dieser Versuch über ein DFG-Projekt.

**Tabelle 5: Übersicht über in AP 3 generierte Zeitreihendaten**

Die Tabelle zeigt die verwendete Probenart und ihre Herkunft, das genutzte molekulare Protokoll, das Ziel der Analyse, die untersuchten taxonomischen Gruppen und die erzielten Ergebnisse.

| Probenart       | Herkunft     | genetische Methode  | Ziel                                                             | Untersuchte Organismen                        | Länge der Zeitserie  | Ergebnis                                                                                                        |
|-----------------|--------------|---------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Schwebstoffe    | limnisch     | DNA-Metabarcoding   | Nachweis aquatischer Lebensgemeinschaften                        | Fische, Makrozoobenthos, Bakterien            | 2005–2021            | Ausbreitung von Neozoen bei Fischen und Wirbellosen, standortspezifische Bakteriengemeinschaften                |
| Boden           | terrestrisch | Metagenomik         | Nachweis terrestrischer Lebensgemeinschaften                     | Bakterien, Pilze, Boden-invertebraten         | 17 Jahre (2002–2019) | Keine Änderung der Artenvielfalt, aber kompositionelle Umstrukturierung der Lebensgemeinschaften                |
| Dreikantmuschel | limnisch     | DNA-Metabarcoding   | Nachweis muschelassoziiierter Lebensgemeinschaften               | Bakterien, aquatische Mikro-eukaryoten, Tiere | 1994–2020            | Kein klarer Trend der Artenvielfalt, aber signifikante Änderung der Artenzusammensetzung                        |
| Dreikantmuschel | limnisch     | DNA-Metabarcoding   | Vergleich von DNA und RNA zur Nahrungsrekonstruktion             | aquatische Mikro-eukaryoten, Tiere            | 1999–2018            | RNA deutlich sensitiver (höherer Artenreichtum) als DNA; Unterscheidung von Endobionten und Beute nicht möglich |
| Miesmuschel     | marin        | DNA-Metabarcoding   | Vergleich von DNA und RNA zur Nahrungsrekonstruktion             | Aquatische Mikro-Eukaryoten                   | 1985–2020            | RNA sensitiver (höherer Artenreichtum) als DNA, Unterscheidung von Endobionten & Beute nicht möglich            |
| Miesmuschel     | marin        | DNA-Metabarcoding   | Nachweis aquatischer Lebensgemeinschaften                        | Bakterien, aquatische Mikro-eukaryoten        | 1985–2020            | Kein klarer Trend der Artenvielfalt, aber signifikante Änderung der Artenzusammensetzung                        |
| Miesmuschel     | marin        | Genom-Sequenzierung | Hybridisierung zwischen <i>M. edulis</i> und <i>M. trossulus</i> | Miesmuschelpopulationen                       | 25 Jahre (1994–2019) | An der Darsser Schwelle findet sich ein geringfügiger genetischer Hintergrund von <i>M. trossulus</i>           |
| Blasentang      | marin        | DNA-Metabarcoding   | Nachweis aquatischer Lebensgemeinschaften                        | Bakterien, Tiere                              | 1985–2021            | Kein klarer Trend der Artenvielfalt, aber signifikante Änderung der Artenzusammensetzung                        |

|                    |              |                            |                                                            |                                |                      |                                                                                          |
|--------------------|--------------|----------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aalmutter          | marin        | Genom-Sequenzierung        | Veränderung genetischer Vielfalt und Anpassungspotenzial   | Aalmutterpopulationen          | 30 Jahre (1992–2022) | Salzwasser-Anpassungen im Verbreitungsgebiet; Zeitserien genetisch stabil                |
| Aalmutter          | marin        | Transkriptom-Sequenzierung | Identifikation der Genexpressionsantwort auf Umweltstress  | Aalmutterpopulationen          | 27 Jahre (1994–2021) | Kein akuter Temperaturstress in Zeitserien identifiziert                                 |
| Aalmutter          | marin        | Epigenom-Sequenzierung     | Identifikation der epigenetischen Antwort auf Umweltstress | Aalmutterpopulationen          | 27 Jahre (1994–2021) | Wird 2026 abgeschlossen                                                                  |
| Blätter von Bäumen | terrestrisch | DNA-Metabarcodierung       | Nachweis terrestrischer Lebensgemeinschaften               | Gliederfüßer, Pilze, Bakterien | 1985–2022            | Kein klarer Trend der Artenvielfalt, aber signifikante Änderung der Artenzusammensetzung |
| Regenwürmer        | terrestrisch | DNA-Metabarcodierung       | Nachweis terrestrischer Lebensgemeinschaften               | Bakterien, Pilze               | 28 Jahre (1994–2022) | Ausstehend, wird 2026 abgeschlossen                                                      |
| Regenwürmer        | terrestrisch | Populationsgenomik         | Veränderung genetischer Vielfalt des Regenwurms            | Regenwurm-Populationen         | 31 Jahre (1990–2021) | Ausstehend bis taxonomische Reinheit überprüft ist                                       |
| Regenwürmer        | terrestrisch | Kultivierung von Bakterien | Nachweis terrestrischer Lebensgemeinschaften               | Bakterien                      | 28 Jahre (1994–2022) | Eine Kultivierung von Mikroorganismen aus Homogenaten funktioniert sehr gut              |
| Regenwurm Kot      | terrestrisch | DNA-Metabarcodierung       | Nachweis terrestrischer Lebensgemeinschaften               | Bakterien, Pilze               | 28 Jahre (1994–2022) | Ausstehend                                                                               |

## 5 Arbeitspakete 4 & 7: Fallstudien zur Entwicklung der biologischen Vielfalt inklusive optionaler Studien und Methodenvalidierungsstudien

### 5.1 Struktur der Fallstudien

Basierend auf den im Rahmen von Kapitel 4 (AP 3) generierten Zeitreihendaten wurden fünf Fallstudien durchgeführt, um zentrale wissenschaftliche Fragestellungen zur Veränderung der Biodiversität zu bearbeiten. Ein wesentliches Ziel bestand darin, systematisch zu prüfen, inwieweit sich die Zeitreihendaten der UPB mit weiteren Umweltinformationen verknüpfen lassen, um integrierte Bewertungen zu ermöglichen und damit Wissenschaft, Behörden und Politik bei der Beantwortung aktueller umweltpolitischer Fragestellungen zu unterstützen. Ein besonderer Fokus lag auf der Identifizierung potenzieller Treiber von Biodiversitätsveränderungen. Im Rahmen der Fallstudien zeigte sich, dass die Integration zusätzlicher Datensätze zur Analyse von Biodiversitätsveränderungen in mehreren Fällen anspruchsvoller war als ursprünglich angenommen. Gründe hierfür waren insbesondere eingeschränkte Datenverfügbarkeit, fehlender Zugang sowie das Fehlen etablierter Konzepte zur statistischen Integration heterogener Datensätze. Darüber hinaus war bei den Regenwurm-Biotaprobe auf Grund potenzieller Kontaminationen eine weitergehende methodische Aufarbeitung erforderlich. Entsprechend konnten in diesem Bereich keine detaillierten populationsgenomischen Analysen im Hinblick auf Umwelttreiber durchgeführt werden; stattdessen lag der Schwerpunkt auf der Entwicklung der hierfür notwendigen methodisch-technischen Grundlagen.

Vor diesem Hintergrund gliedern sich die Ergebnisse der Fallstudien wie folgt:

- ▶ **Fallstudie 1:** Analyse von Biodiversitätsveränderungen in deutschen Fließgewässern anhand von Schwebstoffproben (suspended particulate matter, SPM) der UPB; Endpunkte: Fische und Wirbellose (**Kapitel 5.2.1**).
- ▶ **Fallstudie 2:** Analyse von Biodiversitätsveränderungen in deutschen Böden mittels Metagenomik und Metabarcoding (**Kapitel 5.2.2**).
- ▶ **Fallstudie 3:** Analyse von Biodiversitätsveränderungen an deutschen Küsten am Beispiel ausgewählter Seepockenarten unter Einsatz von Metabarcoding (**Kapitel 5.2.3**).
- ▶ **Fallstudie 4:** Integrative Analyse von Biodiversitätstrends in marinen, terrestrischen und limnischen Ökosystemen (**Kapitel 5.2.4**).

Anschließend werden Fallstudien vorgestellt, bei denen stärker explorative Aspekte im Fokus standen. Dabei werden zunächst drei „*Proof-of-Principle*“-Studien ausgeführt, welche am Beispiel der Blattproben unterschiedliche Aspekte prüfen.

- ▶ **Fallstudie 5:** Analyse von Biodiversitätsveränderungen in Pilzen auf Buche und Fichte (**Kapitel 5.3.1**).
- ▶ **Fallstudie 6:** Vergleich von Biodiversitätstrends (Gliederfüßer) zwischen den UPB-Proben aus Deutschland und Südkorea (**Kapitel 5.3.2**).
- ▶ **Fallstudie 7:** Analyse der innerartlichen genetischen Diversität basierend auf COI-Metabarcoding-Daten für Gliederfüßer (**Kapitel 5.3.3**).

Abschließend werden auf Ebene der innerartlichen genetischen Diversität am Beispiel der Biotaproben der Aalmuttern Chancen, Grenzen und mögliche Trends in den UPB-Proben analysiert.

- **Fallstudie 8:** Analyse der innerartlichen genetischen Diversität von Aalmuttern in Nord- und Ostsee zur Detektion von Genfluss, evolutionären Flaschenhälsen und genetischen Anpassungen (**Kapitel 5.4.1**).
- **Fallstudie 9:** Analyse transkriptomischer Muster in Aalmutterproben in Nord- und Ostsee und mögliche physiologische Stressantworten der Art (**Kapitel 5.4.2**).

**Tabelle 6: Hauptergebnisse der Fallstudien**

| Leistung     | Kompartiment                                  | Probentyp                                                                                       | Hauptergebnisse                                                                                                                                                                                        | Team |
|--------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Fallstudie 1 | limnisch (Flüsse)                             | Schwebstoffe                                                                                    | Fisch-/Wirbellosengemeinschaften haben sich in dt. Flüssen stark, insbesondere durch Auftreten von Neobiota, verändert. Keine generellen Ab- oder Zunahmen der Biodiversität                           | UDE  |
| Fallstudie 2 | terrestrisch (Boden)                          | Auflage (O-Horizont)                                                                            | Bodendiversität ist stark durch Landnutzungstyp beeinflusst, keine systematischen Ab- oder Zunahmen von Biodiversität                                                                                  | SGN  |
| Fallstudie 3 | marin                                         | Miesmuscheln                                                                                    | eDNA-Daten belegen die Einwanderung gebietsfremder Seepockenart und anderer kryptischer invasiver Arten, die als Klimawandelgewinner bezeichnet werden können                                          | UT   |
| Fallstudie 4 | integrativ (marin, terrestrisch und limnisch) | Integrativ (marine Miesmuscheln & Blasentang, terr. Blätter von Bäumen, limn. Dreikantmuscheln) | Als Trend der Ökosystemveränderung in ganz Deutschland zeigt sich eine Veränderung der Artenzusammensetzung, die deutlich schneller von statten geht, als ohne anthropogene Störungen zu erwarten wäre | UT   |
| Fallstudie 5 | terrestrisch                                  | Blätter                                                                                         | Baumkronenassoziierte Pilzgemeinschaften von Fichten zeigen deutlich stärkere Veränderungen ihrer taxonomischen Zusammensetzung, als in heimischen Rotbuchen                                           | UT   |
| Fallstudie 6 | terrestrisch                                  | Blätter                                                                                         | Vergleich von Blattproben der deutschen & koreanischen UPB deutet auf ein Insektensterben in Korea, aber nicht in Deutschland                                                                          | UT   |
| Fallstudie 7 | terrestrisch                                  | Blätter                                                                                         | Aus Metabarcodingdaten von Gliederfüßern, können Informationen über innerartliche genetische Vielfalt abgeleitet werden                                                                                | SGN  |
| Fallstudie 8 | marine                                        | Aalmutter                                                                                       | Populationsgenome aus Probenbank-Arten erlauben die Identifikation rezenter                                                                                                                            | UT   |



| Leistung     | Kompartiment | Probentyp | Hauptergebnisse                                                                                                                                                                                  | Team |
|--------------|--------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Fallstudie 9 | marin        | Aalmutter | <p>evolutionärer Anpassungen und die Überwachung der genetischen Vielfalt</p> <p>RNA-Sequenzierung aus Homogenaten erlaubt die Identifikation individueller Stressantworten in Raum und Zeit</p> | UT   |

## 5.2 eDNA-basierte Fallstudien zur Veränderung limnischer, mariner und terrestrischer Lebensgemeinschaften

### 5.2.1 Analyse von Biodiversitätsveränderungen in Flüssen mit Schwebstoffproben

#### Wie haben sich Flusslebensgemeinschaften von Fischen und Wirbellosen mit der Zeit verändert und kann der Nachweis von Neobiota über Schwebstoffproben zuverlässig erfolgen?

- ▶ Fisch- und Wirbellosenbiodiversität in Deutschlands Flüssen können über Schwebstoffproben gut erfasst werden. Der Nachweis von Neobiota und (eingeschränkt) die Ableitung ihrer Ausbreitungswege ist mithilfe dieser Proben möglich.
- ▶ Es wurden signifikante probestellenspezifische Veränderungen in den Lebensgemeinschaften festgestellt; insbesondere eine Artenzunahme und die Verbreitung invasiver Arten. Eine Homogenisierung der Lebensgemeinschaften war nicht generell feststellbar.
- ▶ Die Biodiversitätsdaten können mit chemisch-physikalischen Daten aus dem behördlichen Monitoring kombiniert werden und liefern, zusammen mit diesen, Einblicke in mögliche Treiber des Biodiversitätswandels.

| Institution | Habitat | Probentyp    | Methode                       | # Proben             | Bewertung |
|-------------|---------|--------------|-------------------------------|----------------------|-----------|
| UDE         | Flüsse  | Schwebstoffe | eDNA-Metabarcoding (COI, 12S) | 211 Jahreshomogenate | Erfolg    |

#### Motivation der Fallstudie

Fließgewässer sind stark von anthropogenen Veränderungen betroffen (Arthington et al., 2010; Vörösmarty et al., 2010). Als niedrigste Punkte in der Landschaft sammeln sie alle im Wasser gelösten Stoffe, was zu hohen Schadstofffrachten führen kann (Liess et al., 2021). Entsprechend ist die Fließgewässerbiodiversität global stark zurückgegangen und bedroht (Tickner et al., 2020). Auch in Deutschland lässt sich dies beobachten. Der gute ökologische Zustand – gefordert nach Wasserrahmenrichtlinie (2000/60/EG) – wird in weniger als 10 % der Flüsse erreicht (BMUV/UBA 2022). Eine Sammlung der Wasserrahmenrichtliniendaten belegt, dass sich die im 20. Jahrhundert detektierten Verbesserungen der Wasserqualität und Biodiversität in europäischen Flüssen über die Jahre verlangsamt haben oder zum Stillstand gekommen sind (Haase et al., 2023). Auch die Renaturierungsmaßnahmen sind oft weniger erfolgreich, als erhofft (Haase et al., 2025). Als Gründe dafür werden insbesondere die fehlende Verbindung biologischer Antwortvariablen, physikochemische Stressoren und das Fehlen systematischen Langzeitmonitorings genannt (Haase et al., 2025).

Das Ziel dieser Fallstudie war es daher, das Potenzial der gesammelten Schwebstoffproben (siehe Kapitel 4) für ein eDNA-basiertes Monitoring von Lebensgemeinschaften (insbesondere Fische und Wirbellose) zu prüfen. Fische und Wirbellose spielen eine Schlüsselrolle im Ökosystem, da sie empfindlich auf Umweltveränderungen reagieren und zentrale Funktionen in aquatischen Nahrungsnetzen erfüllen (Karr, 1981; Wallace et al., 1996). Als bioindikatorische Zielorganismen werden sie deshalb auch in gesetzlich verankerten Monitoringprogrammen wie der EU-Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) eingesetzt (Birk et al., 2012). Gleichzeitig sind traditionelle Monitoringprogramme durch hohen Aufwand, begrenzte räumliche Abdeckung und geringe zeitliche Auflösung limitiert (Haase et al., 2018). Daher bietet der Einsatz von eDNA

neue Möglichkeiten, Biodiversität standardisiert, großräumig und kosteneffizient zu erfassen (Beng & Corlett, 2020; Macher et al., 2021). Die Integration solcher molekularen Zeitseriendaten in bestehende Programme verbessert die Auflösung langfristiger Trends und liefert entscheidende Erkenntnisse für das Management und den Schutz aquatischer Ökosysteme (Altermatt et al., 2025). Ziel der Studie war es ebenfalls, die Daten mit anderen abiotischen Daten zu möglichen Stressoren zu kombinieren.

## Methode

Für die Studie wurden insgesamt 211 Schwebstoffproben (Jahresmischproben) aus 13 Langzeitmessstellen der UPB untersucht, die einen Zeitraum von 2005–2021 abdeckten. Zum Vergleich von Jahres- mit Monatsproben wurden zusätzlich Proben aus Weil am Rhein, die von Januar 2019 bis Dezember 2022 monatlich gesammelt wurden, analysiert. Aus den archivierten Proben wurde eDNA extrahiert und für Fische mit 12S-Metabarcoding mit den tele02-Primern (Taberlet et al., 2018) analysiert. Für Wirbellose wurde das Primerpaar fwfF2/FwhR2n (Vamos et al., 2017) verwendet. Jede Probe wurde in zwei Extraktions- und vier PCR-Replikaten in einem eDNA-Labor an der Universität Duisburg-Essen (spezielle UV-Reinigung der Oberflächen, Produktschutzbänke, Schutzkleidung) verarbeitet, um die Detektionswahrscheinlichkeit zu maximieren und die Kontaminationsgefahr zu minimieren (siehe Schütz et al., 2025 und Kapitel 4). Zur Qualitätssicherung wurden 12 Negativkontrollen pro 96-er PCR-Platte mit analysiert. Die amplifizierten Fragmente wurden auf einer Illumina-NovaSeq-Plattform (2 × 150 bp) sequenziert.

Die bioinformatische Auswertung erfolgte mit der Software APSCALE (Buchner et al. 2021), wobei OTUs mit einer Ähnlichkeit von mindestens 97 % geclustert wurden. Die taxonomische Zuordnung erfolgte für Fische mithilfe der Midori-Datenbank (Leray et al., 2022), und für wirbellose Tiere mit der BOLD-Datenbank und der Software BOLDigger 2 (Buchner & Leese, 2020; Ratnasingham & Hebert, 2007). Die Analysen wurden dort, wo es möglich war, auf Artebene durchgeführt. Insbesondere wurde geprüft, wie sich die Artenzahlen und -zusammensetzungen über die Zeit je Probestelle sowie über das Gesamtgebiet änderten. Hierbei wurde die Veränderung über die sog. Nestedness und den Turnover quantifiziert. Nestedness beschreibt, inwieweit die Artenzusammensetzung eines späteren Zeitpunkts im Fluss im Wesentlichen eine Teilmenge früherer Zeitpunkte ist und damit auf einen gerichteten Verlust oder Gewinn von Arten über die Zeit hinweist. Turnover bezeichnet dagegen den zeitlichen Artenaustausch, bei dem Arten zwischen Erhebungszeitpunkten verschwinden und durch andere ersetzt werden, ohne dass sich die Gesamtartenzahl zwingend ändert. Basierend auf dem Vorkommen über die Zeit und die Fläche sowie über die relative Häufigkeit der Metabarcoding-Sequenzen wurden Trends in Ab- und Zunahme berechnet. Dadurch können Aussagen über „Gewinner-“ und „Verliererarten“ mit Blick getroffen werden. Für Fische wurden diese Daten mit existierenden Daten aus den Roten Listen verglichen (Friedrichs-Manthey et al., 2024). Zur Analyse möglicher abiotischer Stressoren, die als die Ursache für Biodiversitätsveränderungen in Frage kommen, wurden Langzeitmessdaten von den Probestellen über die Datenbank der UPB heruntergeladen und Korrelationsanalysen durchgeführt.

## Ergebnisse

- **Hauptaussage 1:** Fisch- und Wirbellosenbiodiversität in Deutschlands Flüssen können über Schwebstoffproben gut erfasst werden. Der Nachweis von Neobiota und (eingeschränkt) die Ableitung ihrer Ausbreitungswege ist mithilfe dieser Proben möglich.

**Fische:** Die Analyse von insgesamt 211 Schwebstoffproben aus 13 Langzeitmessstellen über den Zeitraum 2005–2021 zeigt, dass die Fischdiversität durch DNA-basierte Methoden zuverlässig

erfasst werden kann. Mithilfe eines 12S-Metabarcoding-Ansatzes wurden aus den archivierten Schwebstoffproben insgesamt 63 Fisch- und Neunaugenarten nachgewiesen, die einen großen Teil der in Deutschland vorkommenden Süßwasserfauna darstellen (Schütz et al. 2025). Darüber hinaus konnten weitere 88 Vogelarten, 63 Säugetierarten und 5 Amphibien mit dem genutzten 12S-Ansatz identifiziert werden. Außerdem wurde eine Vielzahl von Speisefischen wie etwa Makrele, Sardine, Sardelle oder Pangasius nachgewiesen, die mit unterschiedlichen Signalstärken Rückschlüsse auf Abwässer und Siedlungen liefern können (Xiong et al., 2022). Diese Signale wurden vom Datensatz entfernt um die Analysen ausschließlich mit Süßwasserfischen, die tatsächlich in den Flüssen leben, durchzuführen. Die Zusammensetzung der detektierten Arten entsprach weitgehend der bekannten Verbreitung und den Datensätzen des behördlichen Monitorings, einschließlich flussspezifischer Endemiten (Friedrichs-Manthey et al., 2024). Auch das Auftauchen und die Ausbreitung von Neobiota, insbesondere invasiver Grundelarten, konnte nachverfolgt werden. So war beispielsweise die Schwarzmundgrundel (*Neogobius melanostomus*) zu Beginn der Zeitreihe 2005 nicht nachweisbar, nahm aber in den Folgejahren sowohl von ihrer Signalstärke als auch von der Anzahl der Stellen mit positivem Nachweis rapide zu. Zudem korrelierten diese Trends der relativen Metabarcoding-Sequenzen („*relative read abundances*“) signifikant mit den räumlichen Auftretensmustern („*site occupancy*“), was im vorliegenden Fall die semiquantitative Aussagekraft der Methode bestätigt (Schütz et al. 2025). Die zeitlichen Muster und Artentrends von Zu- und Abnahme über die Zeitreihe, die aus den eDNA-Daten abgeleitet wurden, zeigten eine hohe Trend-Übereinstimmung (über 73 %) mit Populationstrendergebnissen traditioneller behördlicher Fischmonitoringprogramme (WRRL, IKSRL). Diese Übereinstimmung belegt, dass sich aus den archivierten Schwebstoffproben verlässlich qualitative und semiquantitative Aussagen zur Fischgemeinschaft ableiten lassen. Der Ansatz ermöglicht es, Biodiversitätsmuster und -veränderungen retrospektiv zu rekonstruieren und ist somit ein leistungsfähiges Werkzeug für das langfristige Fischmonitoring in Fließgewässern.

**Wirbellose:** Im selben Datensatz konnten insgesamt 1728 Arten von Wirbellosen nachgewiesen werden (8151 OTUs), von denen 891 Arten eine aquatische Lebensphase (3373 OTUs) haben. Bei den meisten Arten (550) handelte es sich um Insekten, vor allem aus der Ordnung Diptera. Auch die wichtige Indikatorgruppe der EPT-Taxa (Ephemeroptera, Plecoptera und Trichoptera), mit der sich die Gewässergüte ökologisch bestimmen lässt, konnte mit dem Datensatz nachgewiesen werden. Anders als bei den klassischen Analysen des Makrozoobenthos (oft mittels Kick-Samples) beinhaltet der Datensatz auch eine Vielzahl mikroskopischer Organismen sowie pelagische Invertebraten: Ruderfußkrebse (Copepoden), Nesseltiere (Cnidaria), Muschelkrebse (Ostracoda), Rädertierchen (Rotifera) und Kiemenfußkrebse (Branchiopoda). Da die Methode sowohl benthische als auch pelagische Organismen aller Größen erfasst, ist ein direkter Vergleich zu klassischen Monitoringdaten erschwert. Grundsätzlich kommen die gefunden Organismen in Mitteleuropa vor (vgl. etwa GBIF), unter ihnen auch mehrere invasive Arten wie die Chinesische Wollhandkrabbe, die Quaggamuschel, der Höckerflohkrebs, der Süßwasser-Borstenwurm, die Körbchenmuschel oder das Schwammartige Moostierchen. Darüber hinaus sind auch z. B. geschützte Großmuschelarten wie die Gemeine Teichmuschel, die Malermuschel oder die Große Flussmuschel im Datensatz enthalten. Außerdem sind Parasiten wie der Schwimmblasenwurm oder die Karpfenlaus nachweisbar, sowie Vektoren von Krankheiten wie Gnizen der Gattung Culicoides, die die Blauzungenkrankheit und Arboviren übertragen können sowie Stechmücken u. a. *Anopheles claviger* (historischer Malariavektor in Europa). Neben den Wirbellosen mit aquatischer Lebensphase konnten auch eine Vielzahl terrestrischer Wirbelloser nachgewiesen werden wie etwa das Grüne Heupferd, die Brückenkreuzspinne, der Gemeine Regenwurm, der Große Leuchtkäfer oder der Gemeine Fichtensplintbock, die aber für die weitere Analyse der Schwebstoffproben aus dem Datensatz

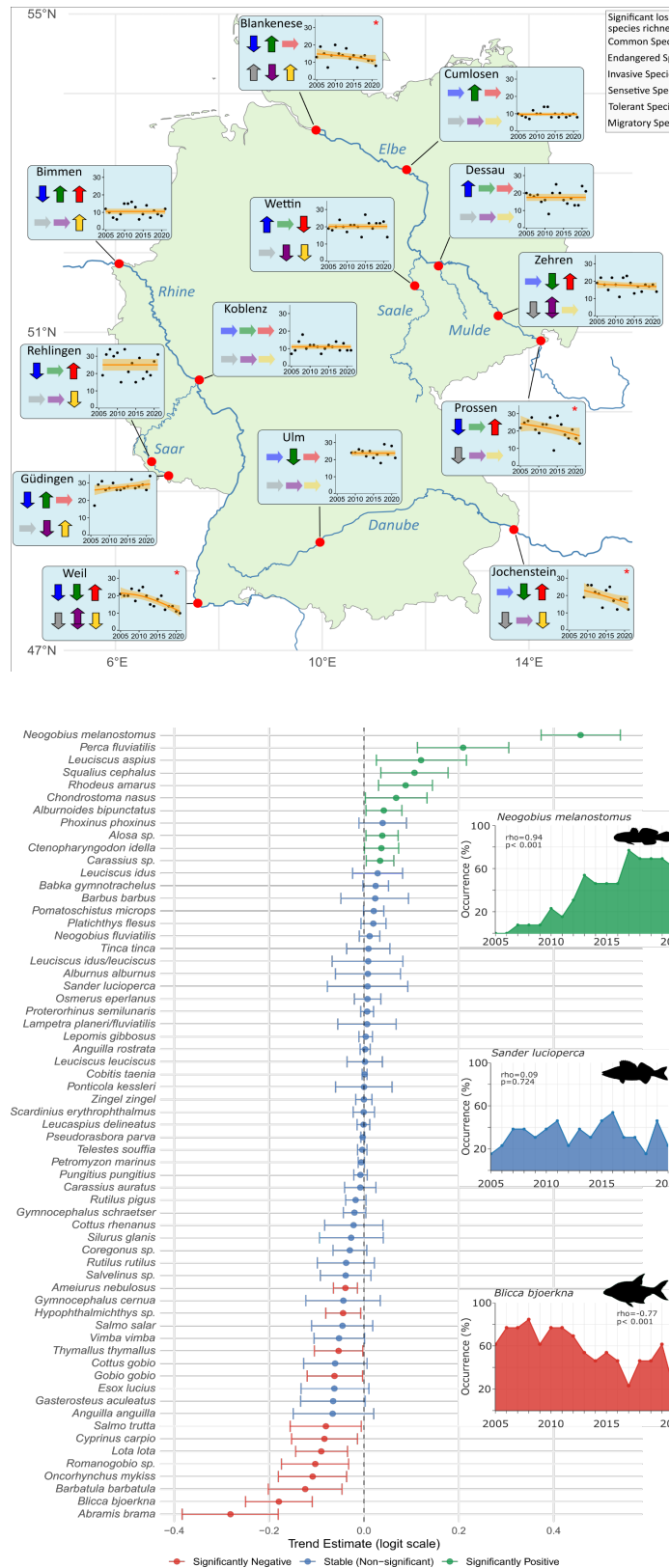
entfernt wurden, da der Fokus hier auf aquatischen Organismen lag. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Analyse der Schwebstoffproben auf Wirbellose ein extrem umfassendes und holistisches Bild dieser großen Gruppe zulässt. Es lassen sich neben klassischen biologischen Zeigearten (EPT) auch pelagische, invasive, gefährdete, pathogene und sogar terrestrische Arten nachweisen, die ein umfassendes Bild über die Diversität in und an den Gewässern liefern kann.

- **Hauptaussage 2:** Es wurden signifikante probestellenspezifische Veränderungen in den Lebensgemeinschaften festgestellt, insbesondere eine Artenzunahme und die Verbreitung invasiver Arten; eine Homogenisierung der Lebensgemeinschaften war nicht generell feststellbar.

**Fische:** Die Ergebnisse zeigen deutliche, jedoch stark standortspezifische Veränderungen in der Fischgemeinschaftsstruktur über den 17-jährigen Untersuchungszeitraum (**Abbildung 29**). Während an mehreren Messstellen (insbesondere Jochenstein – Donau, Weil am Rhein und Prossen – Elbe) ein signifikanter Rückgang der Artenzahl festgestellt wurde, blieben andere Standorte stabil (z. B. Cumlosen, Dessau, Rehlingen) oder zeigten sogar leichte Zunahmen in der  $\alpha$ -Diversität (Rhein bei Koblenz und Saar bei Güdingen). Insgesamt nahm die Unähnlichkeit der Fischgemeinschaften zwischen den Jahren leicht zu, was auf eine zunehmende Differenzierung der lokalen Artzusammensetzungen hinweist. Die Beta-Diversitätsanalysen zeigten, dass diese Veränderungen überwiegend durch Turnover und weniger durch Nestedness bestimmt sind. Damit lässt sich keine generelle Homogenisierung der Fischgemeinschaften feststellen – im Gegenteil, die Unterschiede zwischen den Standorten nahmen im Mittel leicht zu. Auffällig war, dass invasive Arten, insbesondere Grundeln wie *Neogobius melanostomus* oder *Babka gymnotrachelus*, in fast allen Flüssen stark an Häufigkeit und räumlicher Verbreitung (*occupancy*) zugenommen haben. Dennoch verlief diese Ausbreitung nicht gleichmäßig, sondern führte standortspezifisch zu neuen Artmischungen. Diese Heterogenität erklärt, warum die zunehmende Präsenz invasiver Arten (noch) nicht zu einer Vereinheitlichung der Fischgemeinschaften geführt hat. Vielmehr spiegeln die beobachteten Muster eine komplexe Kombination aus lokal differenzierter Neozoen-Etablierung, natürlichen Standortunterschieden und vermutlich fischereilichen Besatzmaßnahmen wider, die die Diversität und Zusammensetzung der Fischgemeinschaften auf lokaler Ebene unterschiedlich beeinflussen.

**Wirbellose:** Zwischen den einzelnen Probestandorten gab es deutliche Diversitätsunterschiede bei den aquatischen Invertebraten. Die artenreichsten Stellen waren die, die am weitesten flussaufwärts bzw. in Nebenflüssen liegen (Mulde, Ulm, Prossen, Weil am Rhein, Güdingen). Nicht nur die Artenzahl, sondern auch die Zusammensetzung der Arten zwischen den Probestellen war signifikant unterschiedlich (Anosim  $R = 0,8$ ,  $p = 0,001$ ). Je nach Probestelle konnten sowohl lineare als auch nicht-lineare Trends der Artendiversität über die Zeit festgestellt werden. So nahm die Artenzahl in Jochenstein (Donau), Wettin (Saale) und Zehren (Elbe) signifikant ab. Auch Prossen (Elbe) und Weil (Rhein) zeigten Abnahmen, die jedoch nicht signifikant waren (**Abbildung 30**). Außerdem konnten auch artspezifische Trends der relativen Anzahl der Sequenzierreads (Signalstärke) nachgewiesen werden. So zeigten 115 Arten abnehmende Trends und 53 Arten eine Zunahme. Die auf der Vornwarnliste geführte Gemeine Teichmuschel (*Anodonta anatina*) zeigte eine signifikant abnehmende Signalstärke an vier Probestellen; die gefährdete und seltene Eintagsfliege (*Caenis pseudorivulorum*) zeigte diesen Trend an zwei Stellen. Zeitgleich nahmen die Anzahl der invasiven Krebse *Chelicorophium robustum* und *Dikerogammarus haemobaphes* an mehreren Stellen zu.

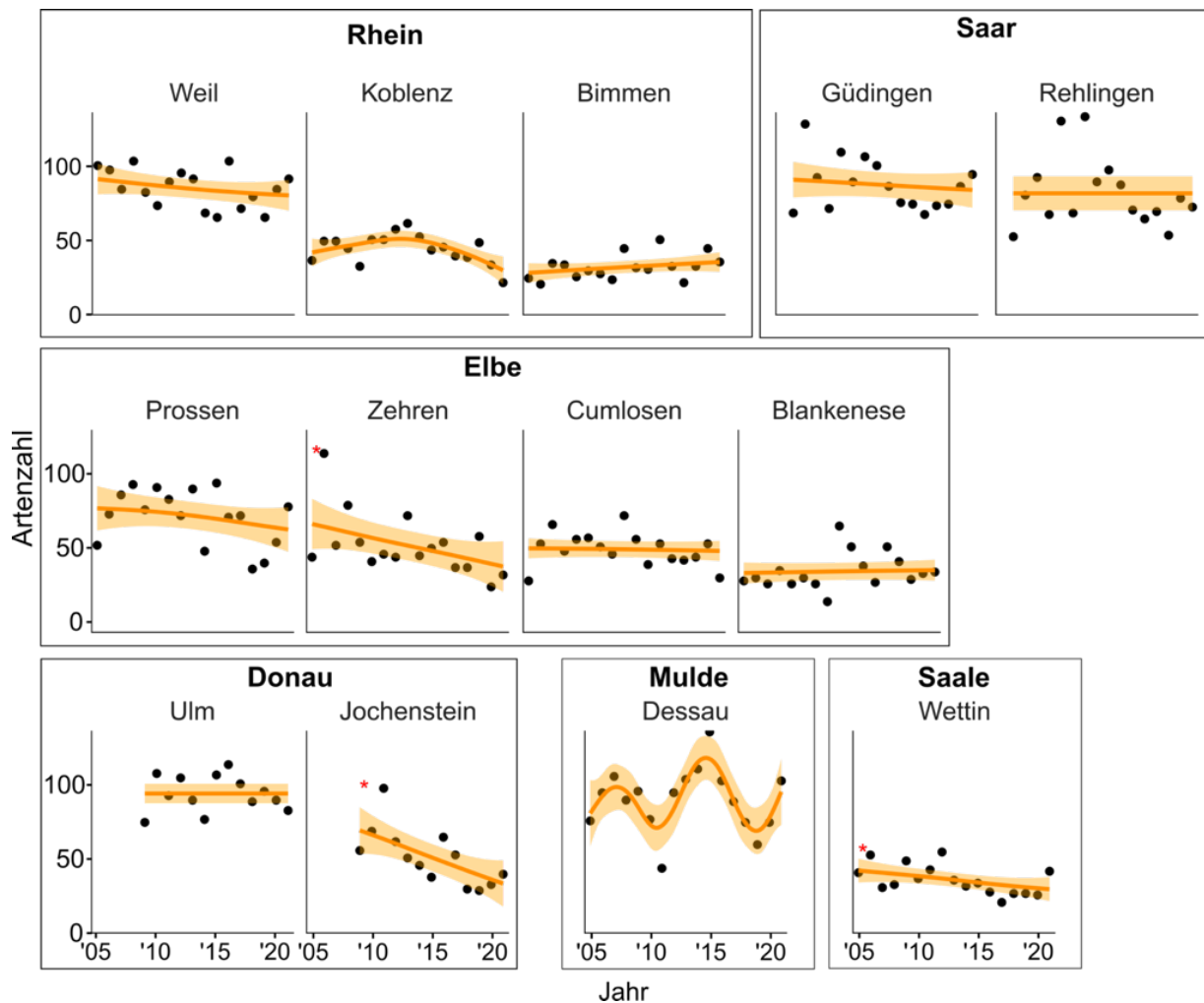
**Abbildung 29: Übersicht zu den Fischdiversitätstrends an den 13 Messstellen der UPB (oben) sowie „Gewinner“ (grün) und „Verlierer“ (rot) mit Blick auf Zu- und Abnahme von Nachweisen über alle Probestellen hinweg (unten)**



Quelle: Schütz et al. (2025).



**Abbildung 30: Generalisierte additive Modelle (GAMs) der eDNA-Zeitreihen für Wirbellose an den verschiedenen Standorten**



Signifikante Trends sind mit einem \* gekennzeichnet. Quelle: eigene Darstellung, UDE.

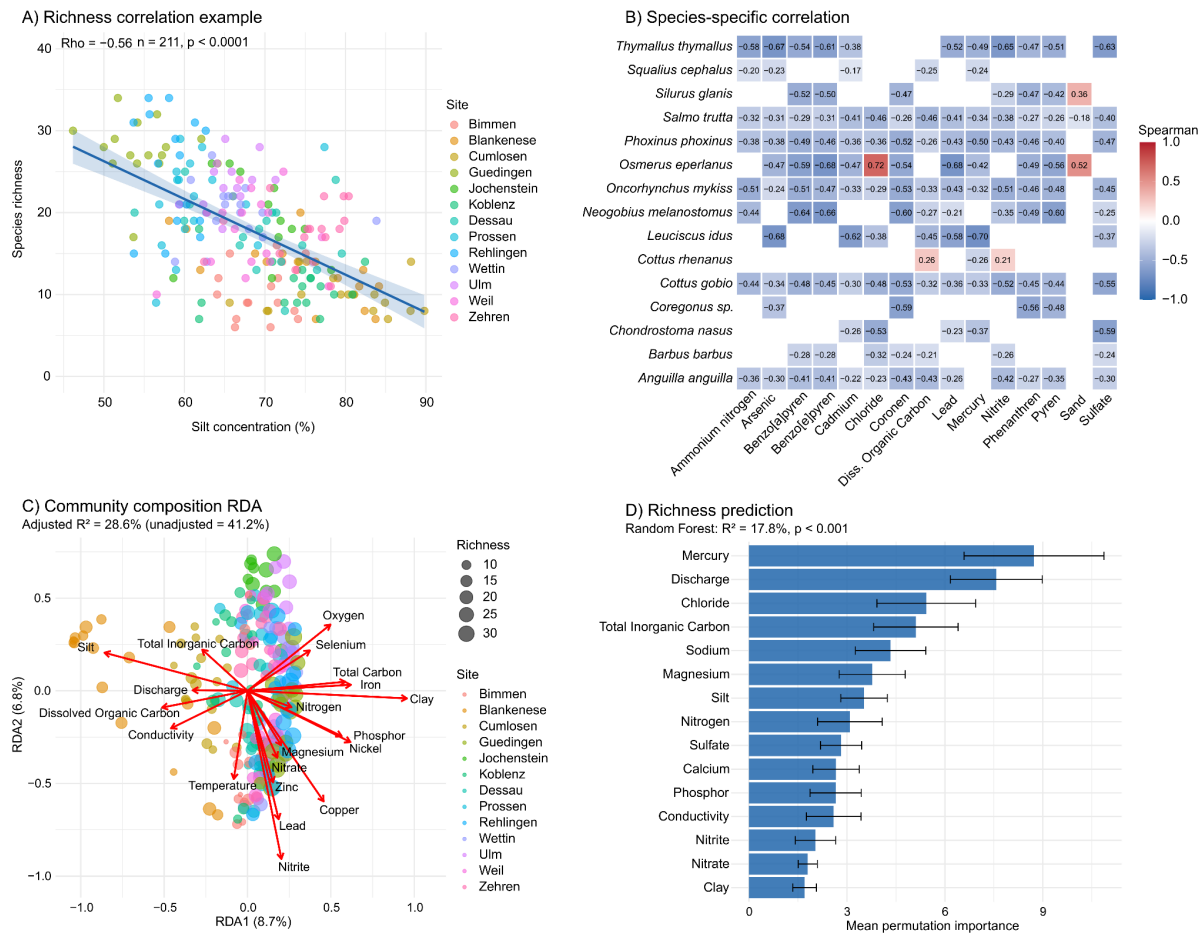
- **Hauptaussage 3:** Die Biodiversitätsdaten können mit chemisch-physikalischen Daten aus dem behördlichen Monitoring kombiniert werden und liefern, zusammen mit diesen, Einblicke in mögliche Treiber des Biodiversitätswandels.

Die Trenddaten der Fische aus den Schwebstoffproben wurden mit Trenddaten einer Langzeituntersuchung der Fischfauna aus dem Routinemonitoring (WRRL sowie Monitoringdaten der Internationalen Kommission zum Schutz des Rheins, IKSR) verglichen. Die WRRL-Daten wurden ebenfalls für die Trendanalysen bei den Rote-Listen-Arten der Fische und Rundmäuler herangezogen (Freyhof et al., 2023; Friedrichs-Manthey et al., 2024). Trotz erheblicher Unterschiede im Probenahmedesign, in der Häufigkeit der Probenahme, den Methoden und den Datentypen zeigte die Analyse eine insgesamt moderate bis starke Übereinstimmung zwischen den Datensätzen. Von den 49 Arten wiesen 36 (73,5 %) dieselbe Trendrichtung auf, sodass beide Datensätze für die Mehrheit der Arten eine vergleichbare Entwicklung der Populationen dokumentieren. Die Spearman-Rangkorrelation war signifikant und zeigte mit  $p = 0,479$  ( $p < 0,001$ ) eine moderate positive Korrelation zwischen den Trendschätzungen. Auch Cohen's Kappa von 0,457 deutet auf eine moderate Übereinstimmung hin, wenn die Trends kategorisiert betrachtet werden (**Abbildung 31**). Der Wilcoxon-Test ergab keinen systematischen Fehler zugunsten eines der beiden Datensätze ( $p = 0,078$ ). Die Bland-

Altman-Analyse zeigte einen geringen mittleren Unterschied von -0,039 zwischen den Trendschätzungen mit relativ engen Grenzen der Übereinstimmung (-0,328 bis 0,250). Die geringe Streuung der Werte um die Nulllinie verdeutlicht die insgesamt gute Kongruenz der Datensätze, wobei nur wenige Ausreißerarten deutliche Abweichungen aufwiesen (**Anhang A.6**).

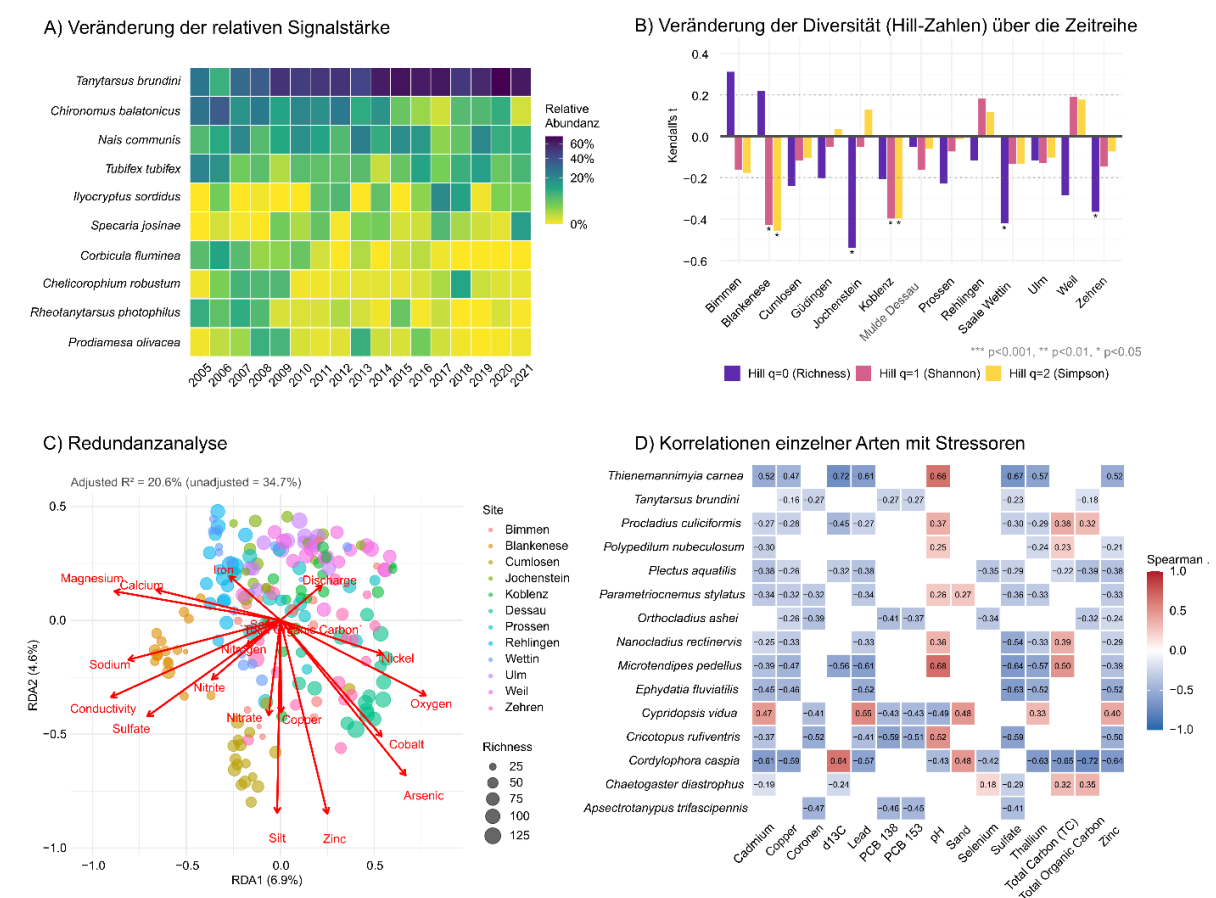
Da die Schwebstoffproben bisher für chemisches Monitoring genutzt wurden, und die Probestellen an Langzeit-Monitoringstellen liegen, sind für die Zeitreihen ebenfalls eine Vielzahl von chemisch-physikalischen Messreihen frei verfügbar (<https://umweltprobenbank.de>). Die Korrelation dieser Daten mit den Daten der Fischdiversität zeigt exemplarisch, dass die gemessenen Parameter mit dem Fischreichtum und auch der Fischzusammensetzung korrelieren (**Abbildung 31**). Insbesondere Faktoren wie Quecksilberkonzentration, durchschnittliche Abflussmenge, Chlorid, aber auch Feinsedimentgehalt, Temperatur oder sogenannte Ewigkeitschemikalien (PFAS) und Pflanzenschutzmittel können das Vorkommen der Fischarten negativ beeinflussen. Für die Wirbellosen wurden ebenfalls signifikante Einflüsse von Umweltparametern, insbesondere chemischen Parametern auf die  $\alpha$ -Diversität sowie spezifische Arten gefunden (**Abbildung 32**). Insgesamt war eine Abnahme der Artendiversität an mehreren Stellen über die Zeit zu finden, wobei weitere Analysen die Abhängigkeit von den zugrundeliegenden Parametern, insbesondere ohne Readabundanz ( $q=0$ ) oder Gewichtung der Readabundanz ( $q=2$ ; **Abbildung 32 B**). Die Zusammensetzung dieser multiplen Stressoren ist dabei vor allem probestellenspezifisch, erklärt also insbesondere das Vorkommen der Arten einer Stelle. Einschränkend ist festzuhalten, dass diese Vergleiche exemplarisch für den Vergleich der Fisch- und Wirbelosendiversität mit Umweltfaktoren sind, da weder die verfügbaren Chemikalienbelastung noch andere abiotische und biotische Umweltfaktoren vollumfänglich in die Studie integriert wurden. Die vorliegenden Korrelationsanalysen zwischen eDNA-Biodiversitätsdaten und abiotischen Messwerten sind als erste explorative Annäherung zu verstehen. Die Verknüpfung der genetischen Zeitreihendaten mit den chemisch-physikalischen Langzeitdaten der UPB-Messstellen und den Gewässerdaten der Bundesländer (WRRL) erwies sich dabei als anspruchsvoller als ursprünglich erwartet: Eingeschränkte Datenverfügbarkeit, unterschiedliche Erhebungsintervalle und das Fehlen etablierter statistischer Konzepte für die Integration heterogener Biodiversitäts- und Umweltdatensätze stellten wesentliche Herausforderungen dar. Für eine belastbare Identifikation kausaler Treiber des Biodiversitätswandels in einer Multi-Stressor-Umwelt sind daher weiterführende ökologisch-statistische Untersuchungen unabdingbar – insbesondere Mehrfachstressor-Analysen unter Einbeziehung eines breiteren Spektrums an Gewässer-, Klima- und Landnutzungsdaten sowie der Einsatz moderner multivariater und KI-gestützter Verfahren. Diese Herausforderung betrifft nicht allein die limnischen Fallstudien, sondern ist als übergreifendes Querschnittsthema des gesamten TrendDNA-Projekts zu verstehen.

**Abbildung 31: Übersicht über getestete Treiber zur Veränderung der Fischdiversität an den SPM-Messstellen.**



A) Korrelation zwischen Feinsedimentanteil (Schluff) und Artenzahl. B) Korrelation zwischen der Signalstärke einzelner Fischarten und der Konzentration von Stressoren. C) Redundanzanalyse (RDA) zur Darstellung der Beziehung zwischen Fischartenzusammensetzung pro Standort und den gemessenen Umweltparametern darzustellen. Die Richtung und Länge der Pfeile zeigt den Einfluss der jeweiligen Variable auf die Artenzusammensetzung. Das Modell erklärt insgesamt 28,6% der Variation in der Zusammensetzung der Fischarten basierend auf den Umweltfaktoren. D) Random-Forest-Modell, das die Artenvielfalt anhand der verschiedenen Umweltfaktoren vorhersagt. Quelle: Schütz et al. (2025).

## Abbildung 32: Diversitätsanalyse und Effekte von Stressoren auf die aquatischen Wirbellosen



A) Veränderung der relativen Readzahl über die Zeit für einzelne Wirbellosenarten. B) Veränderung der  $\alpha$ -Diversität über die Zeit für drei verschiedene Metriken (Hill-Zahlen mit  $q=0$ ,  $q=1$ ,  $q=2$ ). C) Redundanzanalyse (RDA) zur Darstellung der Beziehung zwischen Wirbellosenzusammensetzung pro Standort und den gemessenen Umweltparametern darzustellen. Die Richtung und Länge der Pfeile zeigt den Einfluss der jeweiligen Variable auf die Artenzusammensetzung. Das Modell erklärt insgesamt 20,6% der Variation in der Zusammensetzung der Wirbellosenarten basierend auf den Umweltfaktoren. D) Random-Forest-Modell, das die Artenvielfalt anhand der verschiedenen Umweltfaktoren vorhersagt. Quelle: eigene Darstellung, UDE.

### Herausforderungen und Ausblick

Die Ergebnisse der Fallstudie zeigen, dass eDNA-Metabarcoding von archivierten Schwebstoffproben eine effektive Methode für die langfristige und retrospektive Biodiversitätsbewertung ist. Durch die Kombination von eDNA-Metabarcoding mit chemischen Analysen lassen sich biologische Trends, Belastungen und Umweltparameter aus einem standardisierten Probentyp rekonstruieren. Damit eröffnet sich die Möglichkeit eines integrierten Monitorings, das Biodiversität und Stressoren verbindet und so evidenzbasierte Maßnahmen im Rahmen der WRRRL und weiterer Natur- und Umweltschutzinitiativen unterstützt. Besonders interessant ist, dass basierend auf den Daten des TrendDNA-Projekts (Kapitel 3) ist die künftige Integration und Analyse von Monatsproben sowie von zusätzlich Wasser-eDNA-Proben, da diese Daten komplementäre Informationen liefern. Eine an das TrendDNA-Projekt angelehnte Fallstudie von UDE und UT zeigte, wie über den Stammbaum des Lebens die Phänologie ganzen Organismengruppen an der Wasser-Land-Schnittstelle untersucht werden können. Hier gilt es in künftigen Analysen verstärkt mit ökologischer Statistik, KI und den verfügbaren chemischen Messdaten weitere Untersuchungen durchzuführen. Diese Daten

sowohl für die WRRL, als auch für weitere Messprogramme der Flüsse (IKSR, IKSD, Elbe) von hoher Relevanz.

### Datenverfügbarkeit

Alle Daten zu den Zeitreihen sind über ENA Accessionnummer PRJEB111031 abzurufen und mit Metadaten gemäß FAIR-Prinzipien angereichert. Eine Übersicht über ebenfalls hinterlegte Protokolle und Metadaten (inklusive OTUs und Taxa für alle drei Marker) ist in **Tabelle 8** angegeben.

## 5.2.2 Taxonomische Zusammensetzung und Funktion von Bodengemeinschaften: raumzeitliche Veränderungen

### Wie wirken sich Klimawandel, Pestizidbelastung und Landnutzung auf Artenzusammensetzung, funktionale Diversität (z. B. Stoffkreisläufe) und biotische Interaktionen in Bodenlebensgemeinschaften aus?

- ▶ Der Artenreichtum von Bakterien, Pilzen und Metazoa blieb über die 17 Untersuchungsjahre weitgehend stabil, obwohl sich die Zusammensetzung der Gemeinschaften deutlich veränderte.
- ▶ Die Stabilität der Artenzahl verdeckt tiefgreifende Umstrukturierungen innerhalb der Gemeinschaften, insbesondere bei Bakterien und Pilzen, die Anzeichen einer zunehmenden Homogenisierung zeigen.
- ▶ Die Zusammensetzung der Bodengemeinschaften wurde, je nach Lebensgemeinschaft, vor allem durch Landnutzung (Ökosystemtyp) und den Standort bestimmt. Für die mikrobiellen Taxa war die Landnutzung der wichtigste Faktor, für Metazoa der Standort bzw. die Biogeographie.

| Institution | Habitat | Probentyp            | Methode                                              | # Proben       | Bewertung |
|-------------|---------|----------------------|------------------------------------------------------|----------------|-----------|
| SGN         | Boden   | Auflage (O-Horizont) | Metagenomik, Fokus Boden-Mesofauna, Pilze, Bakterien | 54 Bodenproben | Erfolg    |

### Motivation der Fallstudie

Boden gehört zu den artenreichsten Lebensräumen der Erde (Anthony et al., 2023). Er beherbergt komplexe Gemeinschaften aus Bakterien, Pilzen und wirbellosen Tieren. Diese erfüllen wichtige ökologische Funktionen wie Nährstoffkreislauf, Kohlenstoffspeicherung und Primärproduktion (Osburn et al., 2021). Bodengemeinschaften sind zentral für die Gesundheit terrestrischer Ökosysteme, doch ihre Biodiversitätsmuster – besonders zeitliche Veränderungen – sind noch wenig verstanden (Le Provost et al., 2021). Langzeitdaten zur Bodenbiodiversität sind selten. Dadurch bleiben wichtige Fragen, etwa zur Stabilität oder Veränderung unter globalen Einflüssen wie Landnutzungsintensivierung, Verschmutzung und Klimaerwärmung, offen (Parra-Sanchez et al., 2025). Großräumige Analysen zeigen, dass die lokale Artenzahl vieler Ökosysteme trotz Umweltveränderungen oft stabil bleibt (Blowes et al., 2019; Krehenwinkel, Weber, Broekmann, et al., 2022). Diese Stabilität verdeckt jedoch häufig deutliche Verschiebungen in der Zusammensetzung. Die Entkopplung von Artenzahl und

Zusammensetzung hat das Bewusstsein für eine zunehmende Homogenisierung über Zeit und Raum geschärft (Hillebrand et al., 2018). Die über 17 Jahre (2002–2018/19) an 11 Standorten in Deutschland gesammelten und tiefgefrorenen Bodenproben bieten eine einzigartige Grundlage, um Biodiversitätstrends mithilfe neuer DNA-basierter Methoden zu untersuchen. Mit Metagenomik lassen sich Artenreichtum und -zusammensetzungsänderungen bei Bakterien, Pilzen und Metazoen gleichzeitig erfassen. Damit können zwei wissenschaftliche Fragen beantwortet werden: (1) Ist der Artenreichtum über die Zeit stabil geblieben (Resilienz lokaler Gemeinschaften)? Sowie (2) hat sich die Zusammensetzung durch Homogenisierung verändert (gerichtete Strukturveränderung)? Metagenomik ermöglicht zudem die abundanzbasierten Prozesse hinter diesen Mustern und mögliche Unterschiede zwischen den Taxa zu analysieren.

## Methode

Insgesamt wurden in dieser Fallstudie 54 Proben analysiert. Diese stammen aus der routinemäßigen Bodenprobennahme (Weinfurter & Körner, 2022) an 11 Standorten in neun Regionen in Deutschland, die zwischen 2002 und 2019 alle vier Jahre beprobt wurden. Für die genetische Analyse wurde zunächst die DNA mit dem ZymoBIOMICS™ DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research, Freiburg, Deutschland) extrahiert. Nach der Quantifizierung wurden die DNA-Extrakte zu Hochdurchsatz-Sequenzierbibliotheken verarbeitet und auf einem Illumina NovaSeq 6000 (Novogene, Cambridge, UK) mit einer Tiefe von 2 GB pro Probe sequenziert.

Die taxonomische Zuordnung erfolgte schrittweise mit Kraken2 v2.1.2\*\* (Wood et al., 2019) gegen mehrere Referenzdatenbanken: Mensch (zur Kontrolle möglicher Kontaminationen), Bakterien, Pilze und Pflanzen (kombiniert) sowie Bodenwirbellose (Collins et al., 2023). Die Sequenzdaten sind beim US National Center for Biotechnology Information unter BioProject PRJNA1276286 verfügbar. Zur Untersuchung der taxonomischen Zusammensetzungsänderungen wurden für jede Organismengruppe der Artenreichtum und die zeitlichen Bray-Curtis-Dissimilaritäten zwischen den Jahren an allen 11 Standorten berechnet. Diese Dissimilaritäten wurden weiter aufgeteilt in 1) ausgeglichene Abundanzvariation (Austausch von Individuen zwischen Arten, ein Analogon von Turnover) und 2) Abundanzgradienten (allgemeiner Verlust oder Zugewinn von Individuen über alle Arten hinweg, ein Analogon von Nestedness) (Baselga, 2013). Zusätzlich wurde die RNA-Qualität der UPB-Proben für zukünftige Metatranskriptomikstudien geprüft. RNA wurde mit dem gleichen Kit extrahiert wie die DNA und mit dem QuantiFluor® RNA-System (Promega, Madison, USA) quantifiziert.

## Ergebnisse

Insgesamt wurden 1,4 Milliarden metagenomische Reads sequenziert, von denen nach der Verarbeitung 0,6 Millionen Reads zugeordnet werden konnten: 51 % zu Viridiplantae, 34 % zu Bakterien, 13 % zu Metazoa und 3 % zu Pilzen. Der taxonomische Reichtum von Bakterien, Pilzen und Metazoen lag zwischen 50 (Harz, 2002) und 1449 Taxa (Bornhöved, 2006) und zeigte keine statistisch signifikanten zeitlichen Trends. Der Artenreichtum war an Ackerstandorten bei allen Gruppen am höchsten (**Abbildung 33**).

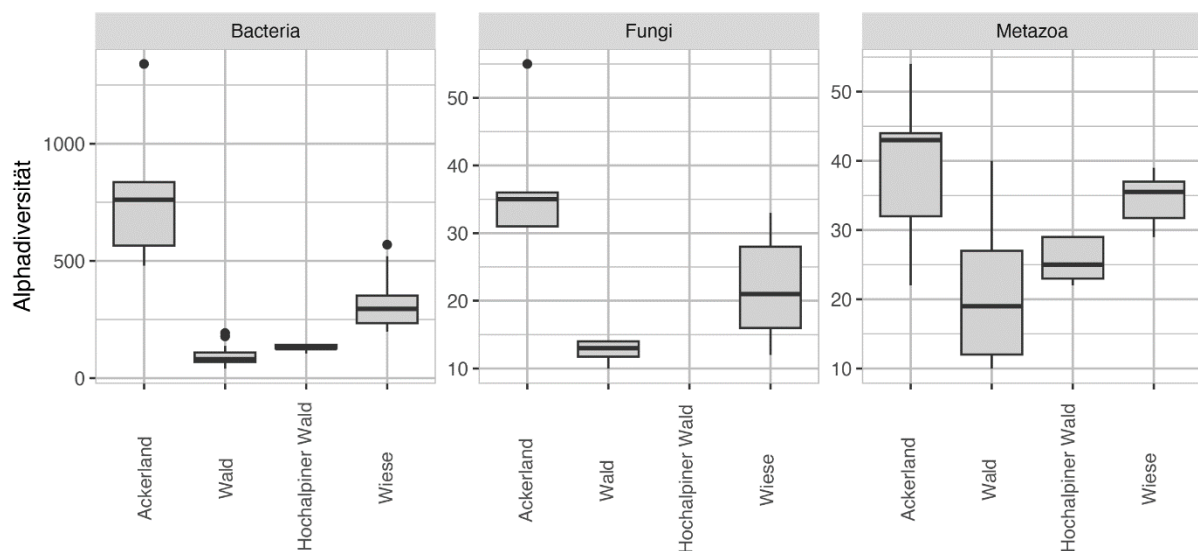
- **Hauptaussage 1:** Der Artenreichtum von Bakterien, Pilzen und Metazoen blieb über die 17 Untersuchungsjahre weitgehend stabil, obwohl sich die Zusammensetzung der Gemeinschaften deutlich veränderte.

Das Ausbleiben signifikanter Veränderungen im taxonomischen Reichtum von Bakterien, Pilzen und Metazoen entspricht Mustern, die auch in anderen Ökosystemen beobachtet wurden, in denen die lokale Artenzahl über die Zeit meist stabil bleibt (Blowes et al., 2019). Solche Stabilität entsteht oft durch den Austausch von Arten, der Verluste ausgleicht, und damit gleichzeitig deutliche Änderungen in der Zusammensetzung verdeckt (Hillebrand et al., 2018). In dieser



Studie zeigten sich deutliche Unterschiede im Artenreichtum zwischen Landnutzungsformen. Diese Unterschiede waren bei Bakterien am stärksten ausgeprägt, deren Artenreichtum auf landwirtschaftlich genutzten Flächen („Ackerland“ in Abbildung 33) am höchsten und in Wäldern am geringsten war (**Abbildung 33**). Dieses Muster stimmt mit Beobachtungen aus ganz Europa überein (Siles et al., 2025), wonach intensiv bewirtschaftete Böden oft mehr Bakterienarten enthalten als weniger gestörte Lebensräume. Ursache ist vermutlich die höhere Nährstoffverfügbarkeit, die größere Populationsgrößen und damit höheren Artenreichtum ermöglicht (Wright, 1983).

**Abbildung 33: Taxonomischer Reichtum der Organismengruppen bei unterschiedlicher Landnutzung**

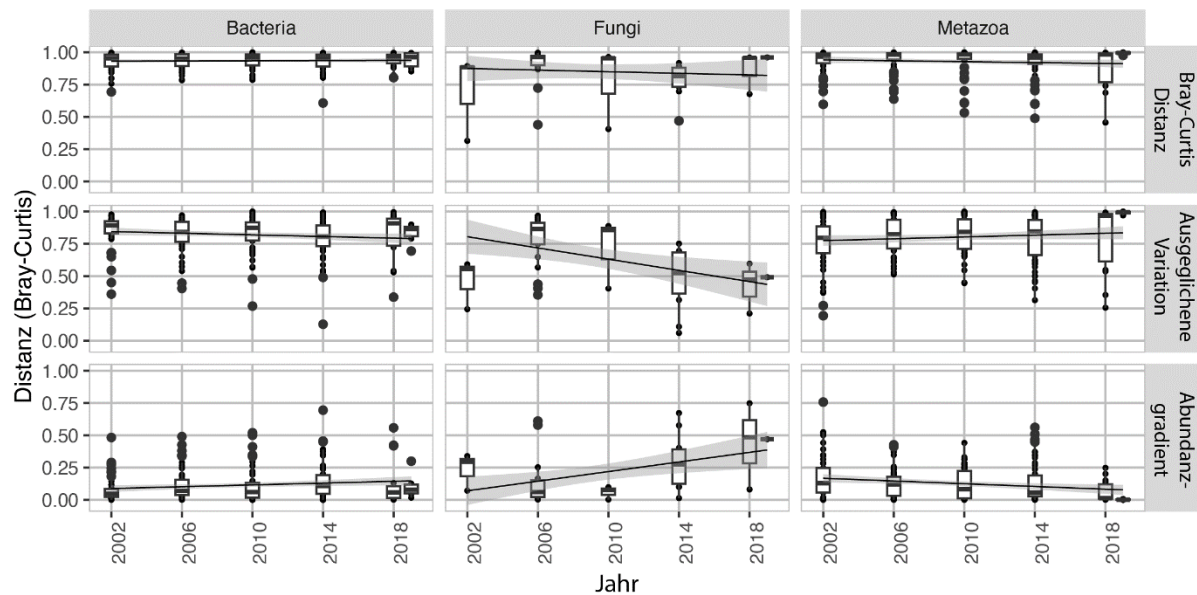


Boxplots zeigen den Median, die unteren und oberen Quartile (erste und dritte Quartile) sowie die Whisker, die bis zum kleinsten bzw. größten Wert reichen, der höchstens das 1,5-Fache des Interquartilsabstands beträgt. Werte außerhalb dieses Bereichs gelten als Ausreißer und sind als einzelne Punkte dargestellt. Landwirtschaftlich-genutzte Flächen als „Ackerland“ in Abbildung 33. Quelle: eigene Darstellung, SGN.

- **Hauptaussage 2:** Die Stabilität der Artenzahl verdeckt tiefgreifende Umstrukturierungen innerhalb der Gemeinschaften, insbesondere bei Bakterien und Pilzen, die Anzeichen einer zunehmenden Homogenisierung zeigen.

Die Gesamtdissimilarität der Gemeinschaftszusammensetzung blieb über die Zeit stabil (**Abbildung 34**). Die Aufteilung in ausgeglichene Variation und Abundanzgradienten (Baselga, 2013) zeigte jedoch zeitliche Umstrukturierungen: Für Bakterien und Pilze deuteten die Ergebnisse auf eine zunehmende Homogenisierung hin, nicht aber für Metazoen. Dies weist auf grundlegende Unterschiede zwischen diesen Gruppen hin. Bei Bakterien und Pilzen könnten die Veränderungen durch eine wachsende Dominanz toleranter oder opportunistischer Taxa entstehen, die durch Umweltfaktoren wie Verschmutzung, Düngung, Klimaänderungen oder Vegetationswandel begünstigt werden (Colossi Brustolin et al., 2019). Die stabile Zusammensetzung der Metazoen spiegelt möglicherweise deren langsamere Lebenszyklen und eingeschränkte Ausbreitung wider (McGill et al., 2015).

**Abbildung 34: Zeitliche Trends der Bray-Curtis-Distanzen (Betadiversität, Y-Achse) sowie ihrer Komponenten der ausgeglichenen Variation und des Abundanzgradienten**



Boxplots zeigen den Median, die unteren und oberen Quartile (erste und dritte Quartile) sowie die Whisker, die bis zum kleinsten bzw. größten Wert reichen, der höchstens das 1,5-fache des Interquartilsabstands beträgt. Werte außerhalb dieses Bereichs gelten als Ausreißer und sind als einzelne Punkte dargestellt. Quelle: eigene Darstellung, SGN.

- **Hauptaussage 3:** Die Zusammensetzung der Bodengemeinschaften wurde, je nach Lebensgemeinschaft, vor allem durch Landnutzung und den Standort bestimmt. Während für die mikrobiellen Gruppen Landnutzung den wichtigsten Faktor darstellte, war dies für die Metazoa der Standort bzw. die Biogeographie.

Die Zusammensetzung der Gemeinschaften wurde statistisch signifikant durch den Standort oder die Landnutzung bestimmt (**Abbildung 35**). Mikrobielle Gemeinschaften wurden stark durch die Landnutzung bestimmt – ein bekannter Hauptfaktor für Bodenmikroben (Barnett et al., 2020). Die Zusammensetzung der Bodenmetazoen hing dagegen stärker vom Standort als von der Landnutzungsart ab, was auf die Bedeutung historischer Biogeographie und begrenzter Ausbreitung hinweist.

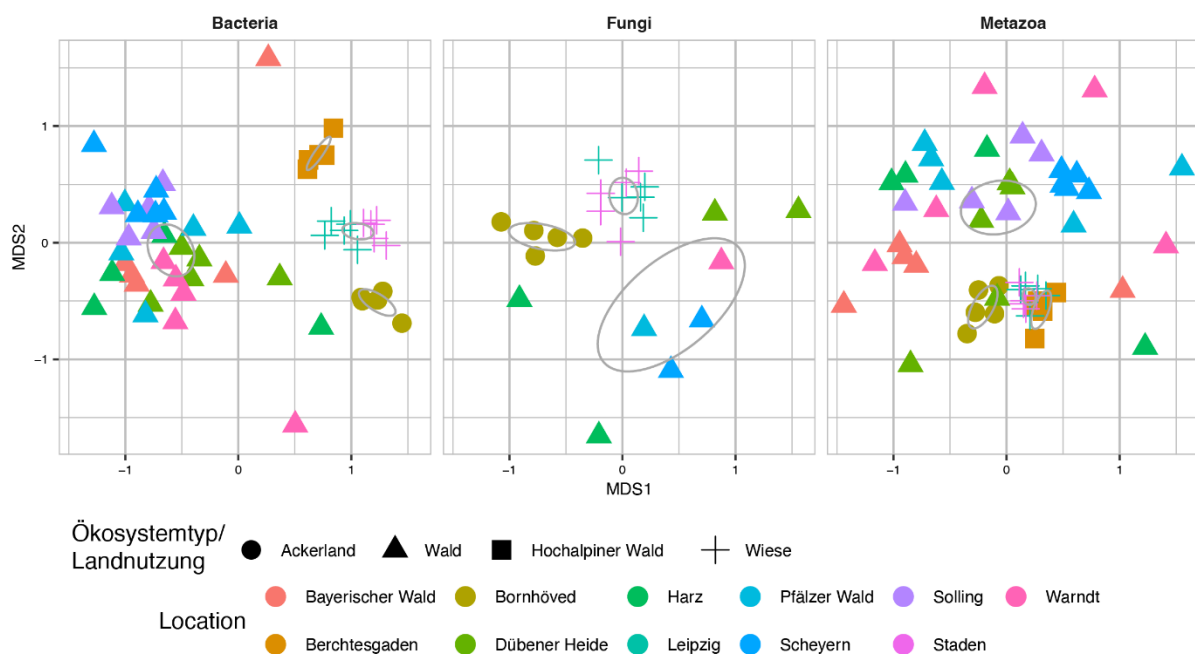
### Herausforderungen

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die DNA- und RNA-Erhaltung in den Archivproben hervorragend ist und sich gut für die Analyse historischer Biodiversitätstrends eignet. Ein zentrales Problem war jedoch die geringe Erfolgsrate der taxonomischen Zuordnung: 99,5 % der Rohdaten konnten keiner bekannten Art zugeordnet werden. Dies verdeutlicht die Lückenhaftigkeit der Referenzdatenbanken für Bodenwirbellose (Collins et al., 2023) und Mikroben (Furtak et al., 2020). Durch das Fehlen der Referenzen können wichtige Gemeinschaftsänderungen unentdeckt bleiben – eine Art “dunkle Materie” der Biodiversitätsforschung. Obwohl Metagenomik und Metabarcoding leistungsfähige Werkzeuge für die Biodiversitätsüberwachung sind, ist ein schneller Ausbau der Referenzsequenzdatenbanken dringend erforderlich. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass stabile Gesamtmetriken der Biodiversität strukturelle Änderungen in den Abundanzen überdecken können, ein bekanntes Problem der Biodiversitätsforschung (Hillebrand et al., 2018). Die getrennte Betrachtung von ausgeglichener Variation und Abundanzgradienten machte artspezifische Abundanztrends sichtbar. Sie unterstreicht daher die Notwendigkeit, über

einfache Kennzahlen hinauszugehen und differenziertere, taxonomisch umfassendere Ansätze zu entwickeln. Die unterschiedlichen Trends von Bakterien, Pilzen und Metazoen verdeutlichen, dass Bodenbiodiversität nicht einheitlich auf Umweltveränderungen reagiert. Diese Unterschiede spiegeln artspezifische Anpassungen an globale Veränderungen wider. Bodenbiodiversität darf daher nicht als funktionell homogene „Black Box“ betrachtet werden, und das Bodenmanagement sollte diese Unterschiede berücksichtigen. Während die Effekte von Habitatveränderungen bei Mikroben und Pilzen besser vorhersehbar sind, erfordert der Schutz der Bodentiere wahrscheinlich stärker standortspezifische Strategien.

**Abbildung 35: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) der Zusammensetzung bakterieller (Stress: 0,164), pilzlicher (Stress: 0,17) und metazoischer (Stress: 0,259) Gemeinschaften.**

Graue Ellipsen zeigen die 95 %-Konfidenzintervalle der Zentren der Landnutzungsgruppen.



Quelle: eigene Darstellung, SGN.

## Ausblick

Um die Treiber von Biodiversitätsmustern zu verstehen, ist eine höhere räumliche Auflösung nötig. Die Zeitreihen der 11 Standorte zeigen zwar klare Landnutzungseffekte, doch für das Verständnis spezifischer Einflüsse – etwa von Klima, Schadstoffen oder Landnutzungswandel – sind dichtere räumliche Daten erforderlich. Diese werden im BioDiv4Soil-Projekts im Kontext des Aktionsprogramms Natürlicher Klimaschutz (ANK) in den kommenden Jahren erhoben und analysiert.

Bezüglich der optionalen Leistungen konnte aus allen Bodenproben RNA in messbaren Konzentrationen (durchschnittlich 9,8 ng/μl; zwischen 1,3 und 45,2 ng/μl) isoliert werden. Die Extrakte werden künftig für die Erstellung und Sequenzierung metatranskriptomischer Bibliotheken verwendet. Aktuell wird Metabarcoding für alle extrahierten Proben durchgeführt, um die Ergebnisse mit den Metagenomdaten zu vergleichen. Dafür werden sieben Primer verwendet, die die Markergene 16S, ITS, 18S, 28S und COI für die Identifikation von Bakterien, Archaeen, Pilzen, Protisten, Nematoden, Mikroarthropoden und Enchyträen amplifizieren. Die

Metabarcoding-PCRs werden mit fünf individuell markierten technischen Replikaten durchgeführt und auf Illumina- oder AVITI-Plattformen sequenziert.

### Datenverfügbarkeit

Alle statistischen Analysen und Eingabedateien der Metagenomik sind öffentlich in FigShare verfügbar (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.30069451>). Ein wissenschaftliches Manuskript zu den Ergebnissen wurde bei einer internationalen Fachzeitschrift eingereicht; ein Preprint ist auf bioRxiv veröffentlicht (Paetsch et al., 2025). Die metagenomischen Sequenzen sind über NCBI öffentlich verfügbar (BioProject PRJNA1276286).

### 5.2.3 Ausbreitung mariner Neozoen im Kontext vom Klimawandel

#### Kann die Einwanderung gebietsfremder Arten an der deutschen Nordseeküste durch eDNA-Metabarcoding-Analysen aus Biotaprobe(n) (Miesmuscheln) nachverfolgt werden?

- ▶ Die Miesmuschelproben der UPB lassen eine detaillierte Rückverfolgung der Populationsdynamiken invasiver Arten zu.
- ▶ Die Invasion der australischen Seepocke *Austrominius modestus* lässt sich mit dem Klimawandel in Verbindung bringen.

| Institution | Habitat | Probentyp   | Methode                       | # Proben            | Bewertung |
|-------------|---------|-------------|-------------------------------|---------------------|-----------|
| UT          | marin   | Miesmuschel | eDNA-Metabarcoding (COI, 18S) | 69 Jahreshomogenate | Erfolg    |

### Motivation der Fallstudie

Neben Habitatzerstörung, Umweltverschmutzung, Übernutzung und dem Klimawandel sind invasive Arten ein Haupttreiber des Biodiversitätsverlusts auf der ganzen Welt (Jaureguiberry et al., 2022). Das Problem mit invasiven Arten ist, dass sie in der frühen Phase ihrer Einwanderung häufig unter dem Radar der öffentlichen Wahrnehmung laufen und höchstens von Experten als problematisch eingestuft werden. Das Bewusstsein für ein ökologisches (und wirtschaftliches) Problem in der allgemeinen Öffentlichkeit setzt häufig erst ein, wenn das Populationswachstum die exponentielle Phase schon erreicht hat, was die Beseitigung oder auch nur eine Kontrolle der invasiven Art so gut wie unmöglich macht (Genovesi & Carnevali, 2011; Simberloff et al., 2013). Das gilt besonders für Invasionen kleiner, oder versteckt lebender Arten. Da Invasionen massiven ökologischen und wirtschaftlichen Schaden verursachen können, ist eine frühzeitige Erkennung umso wichtiger.

Die Archivproben der UPB könnten helfen invasive Populationstrends in einer früheren Phase zu erkennen, um so schneller gegenzusteuern. Das Ziel dieser Fallstudie war es, an einer gut dokumentierten Invasion retrospektiv zu testen, wie genau die eDNA-Signale in Archivproben die tatsächliche Ausbreitung einer invasiven Art widerspiegeln, um dies für die Früherkennung anderer Invasionen nutzen zu können. Als Zielart bot sich hierfür die australische Seepocke *Austrominius modestus* an, die neben in Deutschland heimischen Seepockenarten in großer Abundanz auf den Miesmuscheln der Probenahme Flächen zu finden ist. Die Einwanderung von *A. modestus* ist sehr gut dokumentiert, sodass die genetischen Langzeitreihen mit morpho-taxonomischen Datenreihen validiert und die genetischen Signale aus den Archivproben direkt mit Individuenzählungen abgeglichen werden können.

## Methode

Die Untersuchungen umfassen insgesamt 69 Miesmuschelhomogenate, die über einen Zeitraum von 1985–2020 an den beiden Nordseestandorten der UPB gesammelt wurden (**Abbildung 36 A**). Für die Analyse wurde zunächst DNA aus jeweils 200 mg Muschelhomogenat mit CTAB-Extraktionspuffer und einem entsprechenden Protokoll isoliert (Krehenwinkel, Weber, Broekmann, et al., 2022). Für die Amplifikation eines Abschnitts des COI-Gens wurde spezifische Primer genutzt, die mit gleichem Erfolg heimische und invasive Arten amplifizieren. Pro Probe wurden 3 PCR-Replikaten erstellt und alle Proben gemeinsam auf einem Illumina MiSeq sequenziert (500-cycle V2). Zu den Proben wurden Negativkontrollen sowie einige Proben aus der Ostsee, in der die Art nicht vorkommt, hinzugefügt, um (Kreuz-)Kontaminationen detektieren zu können. Die Rohdatenprozessierung erfolgte mit den Programmen PEAR (J. Zhang et al., 2014) und USEARCH (Edgar, 2010). Identische Sequenzen wurden zu ESVs zusammengeführt. Die taxonomische Annotation erfolgte durch das blast2taxonomy-Skript v1.4.2 (Schöneberg, 2025). Temperatur-Zeitreihendaten für die untersuchten Standorte wurden von der Datenbank des DWD heruntergeladen.

## Ergebnisse

- **Hauptaussage 1:** Miesmuschelproben der UPB lassen eine detaillierte Rückverfolgung der Populationsdynamiken invasiver Arten zu.

Ein Abgleich der relativen Anzahl gelesener Sequenzen (Reads) vom Standort Sylt mit tatsächlichen Zählungen von Individuen derselben Jahre und desselben Standorts ergab einen engen Zusammenhang (**Abbildung 36 C**). Dies zeigt, dass die Metabarcoding-Ergebnisse im Fall der Seepocken auch quantitativ genutzt werden können. Die weitere quantitative Auswertung zeigte, dass die relative Readanzahl von *A. modestus* am Jadebusen deutlich höher war als auf Sylt, was auf eine größere Population am Jadebusen hinweist (**Abbildung 36 D und E**). An beiden Probenahmeflächen (Sylt und Jadebusen) nahm die Readanzahl mit der Zeit signifikant zu, wobei der Readanteil der nativen Seepockenarten abnahm. Die Daten weisen also auf eine Verdrängung der heimischen Seepockenarten durch *A. modestus* hin. Die Populationen von *A. modestus* wuchsen aber nicht konstant, sondern zeigten an beiden Standorten ähnliche Schwankungen: Nach Wachstumsphasen folgte wiederholt ein starker Abfall der relativen Readanzahl, was auf plötzliche Einbrüche in den Populationsgrößen hinweist. Diese Einbrüche waren in den Jahren 1996 und 2010 besonders ausgeprägt.

Neben der invasiven Seepocke konnte die Einwanderung weiterer invasiver Arten dokumentiert werden (**Abbildung 37**). Beispiele dafür waren die parasitische Copepodenart *Mytilicola intestinalis*, die den Verdauungstrakt der Muschel befällt, die Braunalge *Thalassiosira* sp., die Grünalge *Coccomyxa* sp. und die parasitische Ciliatenart *Peniculistoma mytili*, die die Mantelhöhle der Muschel befällt. All diese Arten sind klein und unauffällig und wurden in regulären Monitoringprogrammen daher vermutlich bisher übersehen.

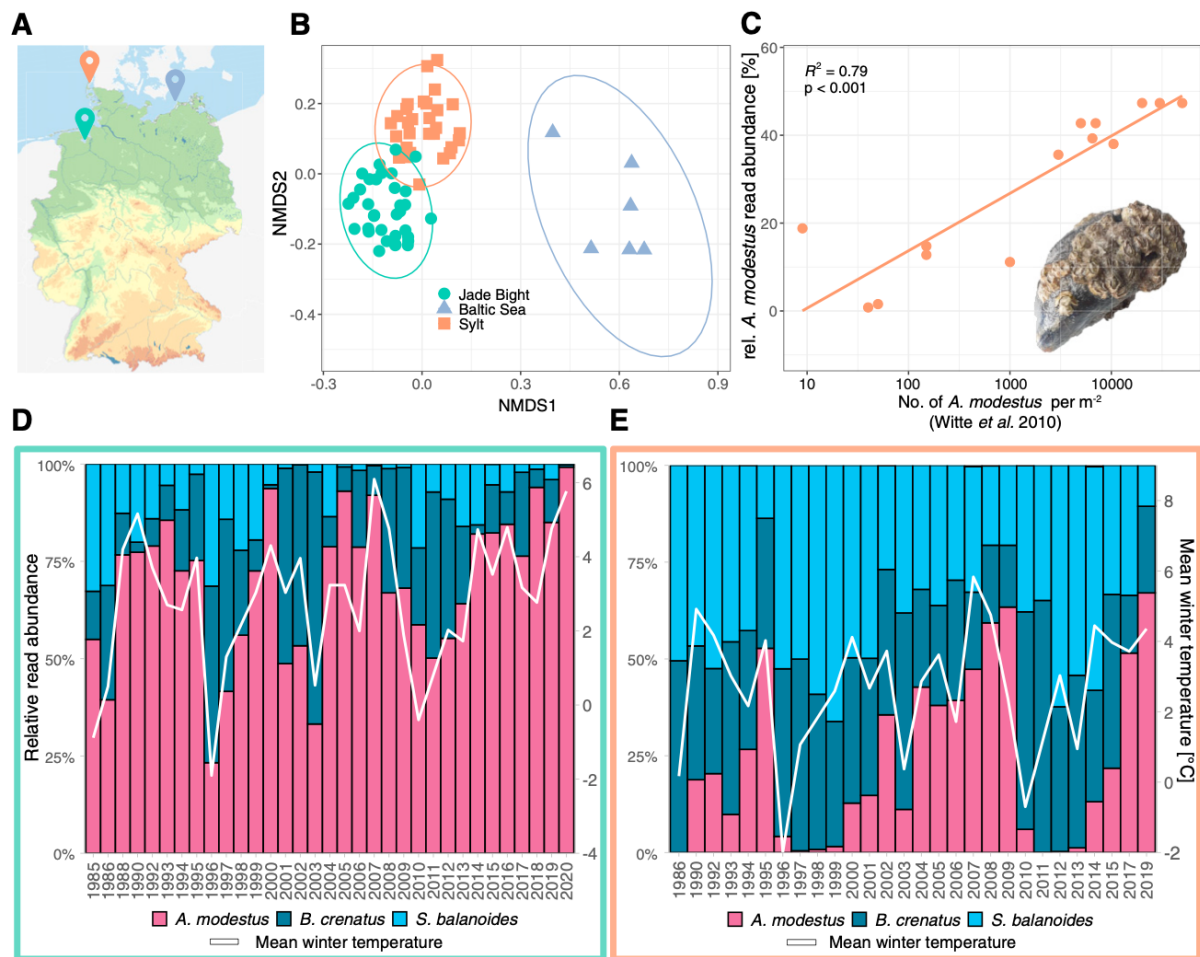
- **Hauptaussage 2:** Die Invasion der australischen Seepocke *Austrominius modestus* lässt sich mit dem Klimawandel in Verbindung bringen; sie profitiert von warmen Wintern.

Zu den Zeitpunkten der Jahreswechsel 1995/96 und 2009/10 gab es besonders starke Temperatureinbrüche, also besonders harte Winter. *A. modestus* entstammt dem australischen Raum und ist an wärmere Temperaturen angepasst. Die Daten zeigen deutlich, dass strenge Winter zu Populationseinbrüchen der invasiven Art führen. Diese waren am Jadebusen, an dem sich schon eine relativ stabile Population der Art etabliert hat, weniger stark ausgeprägt (geringere Schwankungen in der relativen Readabundanz, **Abbildung 36 D**). Für die nördlich



gelegener Probenahmestelle auf Sylt zeigen die Daten einen deutlich verzögerten Wiederanstieg der Populationsgröße nach einem Einbruch (**Abbildung 36 E**). Insgesamt war aber an beiden Flächen die relative Readanzahl signifikant positiv mit der mittleren Wintertemperatur korreliert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *A. modestus* mit dem Klimawandel und den dadurch steigenden Temperaturen immer bessere Chancen auf Etablierung und Ausbreitung von Populationen hat bzw. in der Vergangenheit bereits hatte, da das Klima zunehmend von milden Wintern geprägt ist.

**Abbildung 36: Zusammenfassung der Untersuchung von miesmuschelassoziierten Gemeinschaften**



A) Karte der bemonstrierten Miesmuschelstandorte. B) NMDS-Diagramm der Ähnlichkeit der nachgewiesenen Gemeinschaften von muschelassoziierten Metazoen. Das Diagramm zeigt die unterschiedlichen Gemeinschaften von Tieren in Nord- und Ostsee. C) Assoziation der relativen Sequenzabundanzen mit echten Abundanzen aus den Individuenzählungen der invasiven Seepocke *Austrominius modestus* auf Sylt. D) & E) Sequenzabundanzen der invasiven Seepockenart *A. modestus* und der heimischen Seepockenarten *Balanus crenatus* und *Semibalanus balanoides* an den zwei Nordseestandorten (D Jadebusen, E Sylt) der UPB von 1985 bis 2020. Die weiße Linie zeigt die durchschnittliche Wintertemperatur. Quelle: Junk et al. (2023).

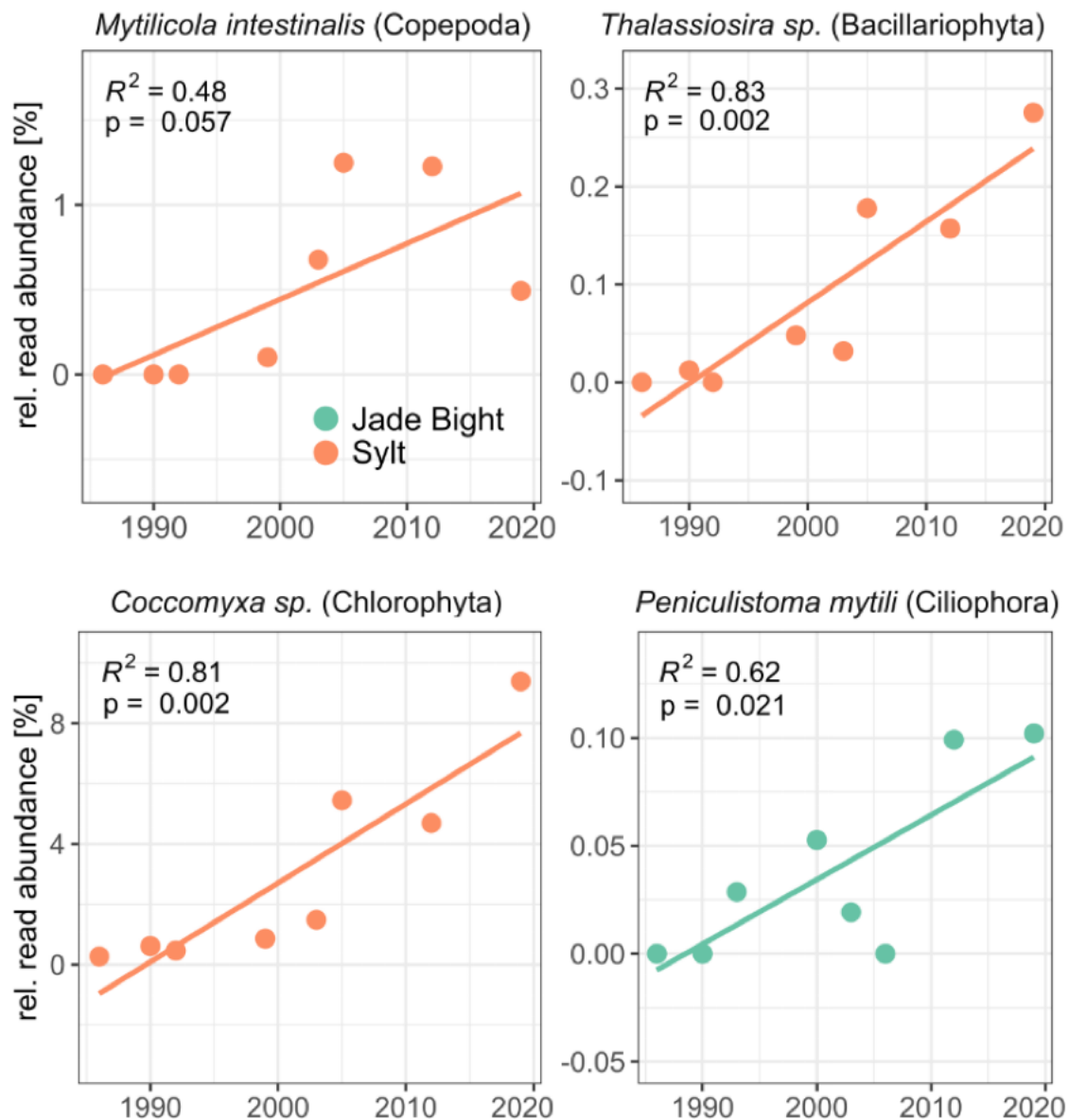
## Herausforderungen

Die Ergebnisse der Studie zeigen, wie sich beispielsweise Populationstrends einzelner Arten mit Umweltvariablen wie hier am Beispiel der Temperatur verknüpfen lassen. Aus der Kombination der Daten lassen sich belastbare Aussagen zum Einfluss verschiedener Umweltfaktoren treffen. Diese Studie zeigt, dass der Klimawandel hochkorreliert mit dem Auftreten weniger



kälteresistenter invasiver Arten ist. Die Daten zu dem Auftreten bekannter Arten lassen sich ggfs. als Trainingsdatensatz in modernen datenwissenschaftlichen Ansätzen (Maschinelles Lernen) für das Detektieren einwandernder Organismen nutzen, die bislang aber nicht in Referenzbibliotheken hinterlegt sind und somit ist weitere Arbeit hierzu nötig. Eine weitere Limitation ist die Quantifizierung. Obwohl die Ergebnisse für die Seepocken in eine eindeutige Richtung weisen, ist mit Metabarcoding-Daten nur unter gewissen Voraussetzungen (z. B. gleich starke Amplifikation verschiedener Taxa) eine quantitative Aussage möglich.

**Abbildung 37: Veränderung der relativen Sequenzabundanzen von vier invasiven Arten an den Nordseestandorten der UPB**



Die Abbildungen zeigen die relativen Sequenzabundanzen (Y-Achse) für die parasitische Copepodenart *Mytilicola intestinalis*, für die Diatomee *Thalassiosira* sp., für die Grünalge *Coccomyxa* sp. und für die parasitische Ciliatenart *Peniculistoma mytili*. Die Diagramme zeigen, wie Proben der UPB helfen können, kryptische biologische Invasionen zu detektieren. Quelle: Junk et al. (2023).

## Ausblick

Die Studie zeigt, dass das Archiv der UPB bei regelmäßiger Anwendung molekulargenetischer Verfahren ein großes Potenzial als Frühwarnsystem hat, da nicht nur die Einwanderung gebietsfremder Arten, sondern auch das Verschwinden von Arten frühzeitig erkannt werden kann. Auch zeigt die Studie, wie das Auftreten der weniger kälteresistenten Arten als möglicher Klimawandelindikator genutzt werden kann. Hierzu sind weitere Untersuchungen nötig.

## Datenverfügbarkeit

Alle Daten zu der Studie sind gemäß FAIR-Prinzipien in DataDryad hinterlegt: <https://doi.org/10.5061/dryad.tb2rbp067> (siehe **Tabelle 8**).

### 5.2.4 Integrative Analyse von Biodiversitätstrends über terrestrische, limnische und marine Lebensräume hinweg

#### Gibt es Biodiversitätsveränderungen, die gleichermaßen in marinen, limnischen und terrestrischen Lebensräumen auftreten?

- ▶ In den untersuchten Proben aus terrestrischen, limnischen und marinen Ökosystemen wurden keine systematischen Veränderungen des Artenreichtums über Ökosysteme oder Taxa hinweg festgestellt.
- ▶ Ein statistisches Metacomunity-Modell zeigte, dass sich Lebensgemeinschaften über alle Ökosysteme und Taxa hinweg signifikant schneller verändert haben, als es ohne den Einfluss anthropogener Faktoren zu erwarten wäre.
- ▶ Die Analyse der Blattproben weist auf eine zunehmende biotische Homogenisierung der Bakterien-, Pilz- und Gliederfüßergemeinschaften hin. Auch für marine Artengemeinschaften zeigen sich Muster der Homogenisierung. Für limnische Proben wurde dagegen keine Homogenisierung über die Zeit festgestellt.

| Institution | Habitat                | Probentyp                                         | Methode                                  | # Proben                                                                                                                                     | Bewertung |
|-------------|------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| UT          | Wälder, Küsten, Flüsse | Blätter, Blasentang, Miesmuschel, Dreikantmuschel | eDNA-Metabarcoding (COI, 16S, 18S, ITS1) | 115 Jahreshomogenate<br>Buche und Fichte, 52 Jahreshomogenate<br>Pappel<br>70 Blasentang-Jahreshomogenate<br>91 Miesmuschel-Jahreshomogenate | Erfolg    |

## Motivation der Fallstudie

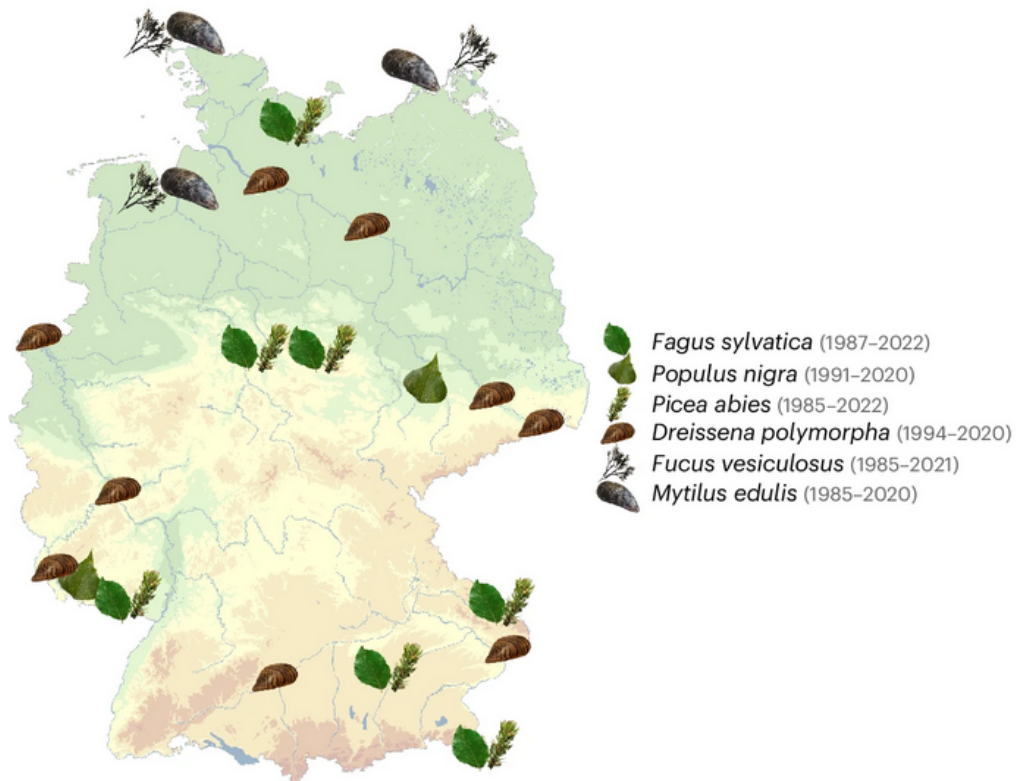
Ökosystem- und organismenübergreifende Biodiversitätsveränderungen sind für Forschung und behördliche Umweltbeobachtung von besonderem Interesse, da sie Hinweise auf großflächig wirkende Treiber wie z. B. Klimawandel, Landnutzungsänderungen, Eutrophierung oder invasive Arten geben können. Regional und lokal sind die Muster wie auch die Treiber jedoch oft sehr unterschiedlich und Ursachen sowie Wirkungen für Biodiversitätsänderungen sind häufig spezifischer. Während z. B. im terrestrischen Bereich einige Studien systematische Rückgänge in

Biomasse (Hallmann et al., 2017) und Abundanz (Klink et al., 2020) sowie Artendiversität (Seibold et al., 2019) identifizieren konnten weisen andere Studien eher auf ereignisbasierte Veränderungen (Müller et al., 2024) hin oder zeigen gleichbleibende  $\alpha$ -Diversität jedoch mit Hinweisen auf Homogenisierung der Lebensgemeinschaften (Dornelas et al., 2014; Krehenwinkel, Weber, Broekmann, et al., 2022). Das heißt, über mehrere Ökosysteme finden sich weniger, dafür immer ähnlichere Artengemeinschaften. Ähnlich heterogene Belege wurden für limnische (Haase et al., 2023; Jähnig et al., 2021; Klink et al., 2020) und marine Lebensräume gefunden, wo je nach Organismengruppe und Studie unterschiedliche Trends identifiziert wurden (Wirth et al., 2024). Entsprechend wichtig sind standardisierte Zeitserien, um Veränderungen systematisch zu erfassen und statistisch sichere Aussagen zu treffen.

Für den terrestrischen Bereich bieten die Baumproben der UPB in Verbindung mit eDNA-Metabarcoding eine gute Möglichkeit, die Biodiversität von Insekten über eine lange Zeitspanne retrospektiv zu erfassen. Zudem gibt es eine Vielzahl blattassoziiierter Pilz- und Bakterienarten, die beim Sammeln von Blättern Teil der Proben werden. Die mikrobielle Gemeinschaft auf Blättern ist von essenzieller Bedeutung für den Baum und lässt auch Rückschlüsse auf die Baumgesundheit zu (Kang et al., 2024) und wurde daher miterfasst. Für den marinen Bereich wurde eDNA aus den Miesmuschel-Biotaprobe analysiert. Muscheln ernähren sich von Phytoplankton, das sie durch Filtration aus dem umgebenden Wasser aufnehmen. Durch diese Ernährungsweise nehmen Muscheln neben eDNA, die im Wasser allgegenwärtig ist, auch permanent Phytoplankton und deren DNA aktiv auf. Damit befindet sich zu jedem Zeitpunkt eine Fülle genetischer Signale in der Muschel, die mithilfe von eDNA-Metabarcoding identifiziert werden können. Zusätzlich bietet der Probentyp „Blasentang“ eine wichtige Datenbasis. Blasentang ist eine wichtige bestandsbildende Braunalgenart und Lebensgrundlage für zahlreiche Wirbellose und Fische. Das Ziel der vorliegenden Fallstudie war es, Veränderungen der mit Miesmuscheln und Blasentang assoziierten Metazoen-, Bakterien- und Phytoplanktongemeinschaften über die Zeit und Raum hinweg zu analysieren und gegebenenfalls mit Klimaveränderungen oder anderen anthropogenen Einflüssen in Verbindung zu bringen. Die archivierten Dreikantmuschelproben der UPB bieten die Chance für ein retrospektives Monitoring verschiedener taxonomischer Gruppen, welche die Filtrierer effektiv eDNA in ihrem Gewebe anreichern (Weber et al., 2023). Wie in marinen Ökosystemen sind Bakterien, Mikroeukaryoten wie Algen und Protozoen sowie Makroinvertebraten wichtige Untersuchungsgruppen, da sie ein grundlegender Bestandteil des Nährstoff- und Energiekreislaufs der Ökosysteme sind und die Lebensgrundlage für alle höheren trophischen Stufen bilden (Suthers et al., 2019).

Mit der vorliegenden integrativen Fallstudie sollte im Rahmen des Projekts eine vergleichende Trendanalyse über Ökosysteme hinweg durchgeführt werden. Hierbei sollte über eDNA-Spuren für verschiedene Organismengruppen die räumliche und zeitliche Biodiversitätsänderung verglichen und die möglichen anthropogenen Treiber von Veränderungen identifiziert werden.

**Abbildung 38: Übersicht über Probenahmestellen und rekonstruierte Biodiversität aus UPB-Proben aus terrestrischen, limnischen und marinen Ökosystemen im Zeitraum 1985-2022**



Quelle: Junk et al. (2025).

## Methoden

**Untersuchte Probentypen:** Für die Studie wurden Zeitreihen von terrestrischen, limnischen und marinen Proben analysiert. Zur Untersuchung von Trends in terrestrischen Ökosystemen wurden 282 Blatthomogenatsproben der Jahre 1985–2022 der Baumarten Rotbuche (*Fagus sylvatica*), Fichte (*Picea abies*) und Pappel (*Populus nigra*) an neun über Deutschland verteilten Probenahmeflächen untersucht. Die Flächen repräsentieren urbane, agrar- und forstwirtschaftlich geprägte sowie naturnahe Ökosysteme (**Abbildung 38**). Mittels eDNA-Metabarcoding wurden Veränderungen in den blattassoziierten Lebensgemeinschaften von Bakterien, Pilzen und Gliederfüßern analysiert. Für die genetischen Analysen wurde zuerst DNA aus jeweils 200 mg Probe mit CTAB-Extraktionspuffer und einem entsprechenden Protokoll isoliert (Krehenwinkel, Weber, Broekmann, et al., 2022). Gruppenspezifische DNA-Abschnitte (16S-rDNA für Bakterien, ITS für Pilze und COI für Gliederfüßer) wurden mit für die Zielorganismengruppe universellen Primern anvisiert (**Tabelle 3**).

Im marinen Lebensraum wurden 91 Miesmuschel- (*Mytilus edulis*) und 70 Blasentangproben (*Fucus vesiculosus*) an zwei Probenahmeflächen in der Nordsee (Jadebusen, Sylt) sowie einer in der Ostsee (Darss) analysiert (**Abbildung 38**). Die genutzte Zeitreihe umfasste die Jahre 1985–2021. Mittels eDNA-Metabarcoding wurden Veränderungen in Metazoen-, Bakterien- und Phytoplanktongemeinschaften untersucht. Für die genetischen Analysen wurde zuerst DNA aus jeweils 200 mg Homogenat mit CTAB-Extraktionspuffer und einem entsprechenden Protokoll isoliert (Weber et al., 2023). Abschnitte ribosomaler DNA (16S-rDNA für Bakterien, 18S-rDNA für Algen und Protozoa) wurden via Metabarcoding-Primern amplifiziert, , die für die entsprechende Zielorganismengruppe universell sind (**Tabelle 3**).

Für den limnischen Lebensraum wurde die Zebrauschel (*Dreissena polymorpha*) in vier Flüssen (Donau, Rhein, Elbe und Saar) und insgesamt neun Probeflächen gesammelt und analysiert. Wie bei Blasentang und Miesmuschelproben wurden Proben von 1985-2021 via eDNA-Metabarcoding bezüglich Änderungen in Metazoen-, Bakterien- und Phytoplanktongemeinschaften untersucht.

Für alle Barcode-Marker galt: sie wurden in 6 PCR-Replikaten vervielfältigt und auf einem Illumina MiSeq sequenziert (500-cycle-V2- und 600-cycle-V3-Kits). Während der Probenprozessierung wurden den Proben Negativkontrollen hinzugefügt, um Kontaminationen detektieren zu können. Die Rohdatenprozessierung erfolgte mit den Programmen PEAR (J. Zhang et al., 2014) und USEARCH (Edgar, 2010). Die Analyse wurde auf ESV-Niveau durchgeführt. Zur taxonomischen Annotation wurde das blast2taxonomy-Skript v1.4.2 gegen die gesamte NCBI-Datenbank verwendet (Schöneberg, 2025). Für die Analyse von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Diversitätstrends der untersuchten taxonomischen Gruppen wurde ein nicht-neutrales, dynamisches Modell für Gemeinschaftsökologie basierend auf der Inselbiogeographie-Theorie nach MacArthur und Wilson (MacArthur & Wilson, 1963) berechnet. Dabei wurden die OTU/ESV-Tabellen in Präsenz-/Absenzdaten umgewandelt und für jedes OTU/ESV die Detektions-, Aussterbe- und Einwanderungswahrscheinlichkeit berechnet. Mithilfe dieses Modells wurden Trends der OTU-Diversität ( $\alpha$ -Diversität), der zeitlichen Veränderungen in der Gemeinschaftszusammensetzung (zeitliche  $\beta$ -Diversität), der räumlichen Unterschiede in der Zusammensetzung (räumliche  $\beta$ -Diversität) sowie Bootstrap-Schätzungen ( $n=1000$ ) der regionalen Diversität ( $\gamma$ -Diversität) für den Zeitraum 1991 bis 2021 simuliert.

Um die generierten Biodiversitätsdaten mit potenziellen Treibern in Verbindung zu bringen, wurden folgende Parameter erhoben. Daten zur Pestizidbelastungen für die untersuchten Forststandorte wurden von Krehenwinkel et al. (2022) übernommen. Die Datenbank des DWD wurde genutzt, um Klimaparameter für alle untersuchten Standorte zu generieren. Es wurden sowohl Temperatur-, als auch Niederschlagsdaten aufgenommen. Zusätzlich wurde für alle Proben des C/N Verhältnis gemessen, um Aussagen über potenzielle Stickstoffdepositionen zu treffen.

## Ergebnisse

- **Hauptaussage 1:** In den untersuchten Proben aus terrestrischen, limnischen und marinen Ökosystemen wurden keine systematischen Veränderungen der  $\alpha$ -Diversität über Ökosysteme oder Taxa hinweg festgestellt.

Es wurden viele tausend Arten über den Stammbaum des Lebens in den untersuchten Proben nachgewiesen. Die Daten zeigen keine ökosystemübergreifenden Trends für  $\alpha$ -Diversitätswerte, sondern ökosystem-, gruppen- und artspezifische Muster (**Abbildung 39 a**). Für den terrestrischen Lebensraum zeigten die Daten für die Blattproben der Buche geringe Abnahmen der  $\alpha$ -Diversität von Prokaryoten und Metazoen und keine Veränderung der Pilzvielfalt (**Abbildung 39 c**). Für Kiefer und Pappel wurden geringe Zunahmen mit der Zeit über alle drei Organismengruppen registriert. Küstennahe Bakteriengemeinschaften nahmen über die Zeit in ihrer ESV-Vielfalt ab, während für mikroeukaryotisches Phytoplankton eine Zunahme festgestellt wurde. Bei der untersuchten Metazoenlebensgemeinschaft zeichnete sich kein klarer Trend ab. Mit Dreikantmuscheln assoziierte Bakterien und Metazoen nahmen über die Zeit in ihrer ESV-Vielfalt zu, während für Phytoplankton eine Abnahme festgestellt wurde. Im Allgemeinen spiegeln die Trends der regionalen Artenvielfalt ( $\gamma$ -Diversität) die der lokalen Artenvielfalt ( $\alpha$ -Diversität) wider. So wurde bei marinen Prokaryoten ein deutlicher Rückgang, bei limnischen Prokaryoten hingegen ein signifikanter Anstieg festgestellt. Trotz dieser räumlichen und zeitlichen Veränderungen blieb die Zusammensetzung der höheren

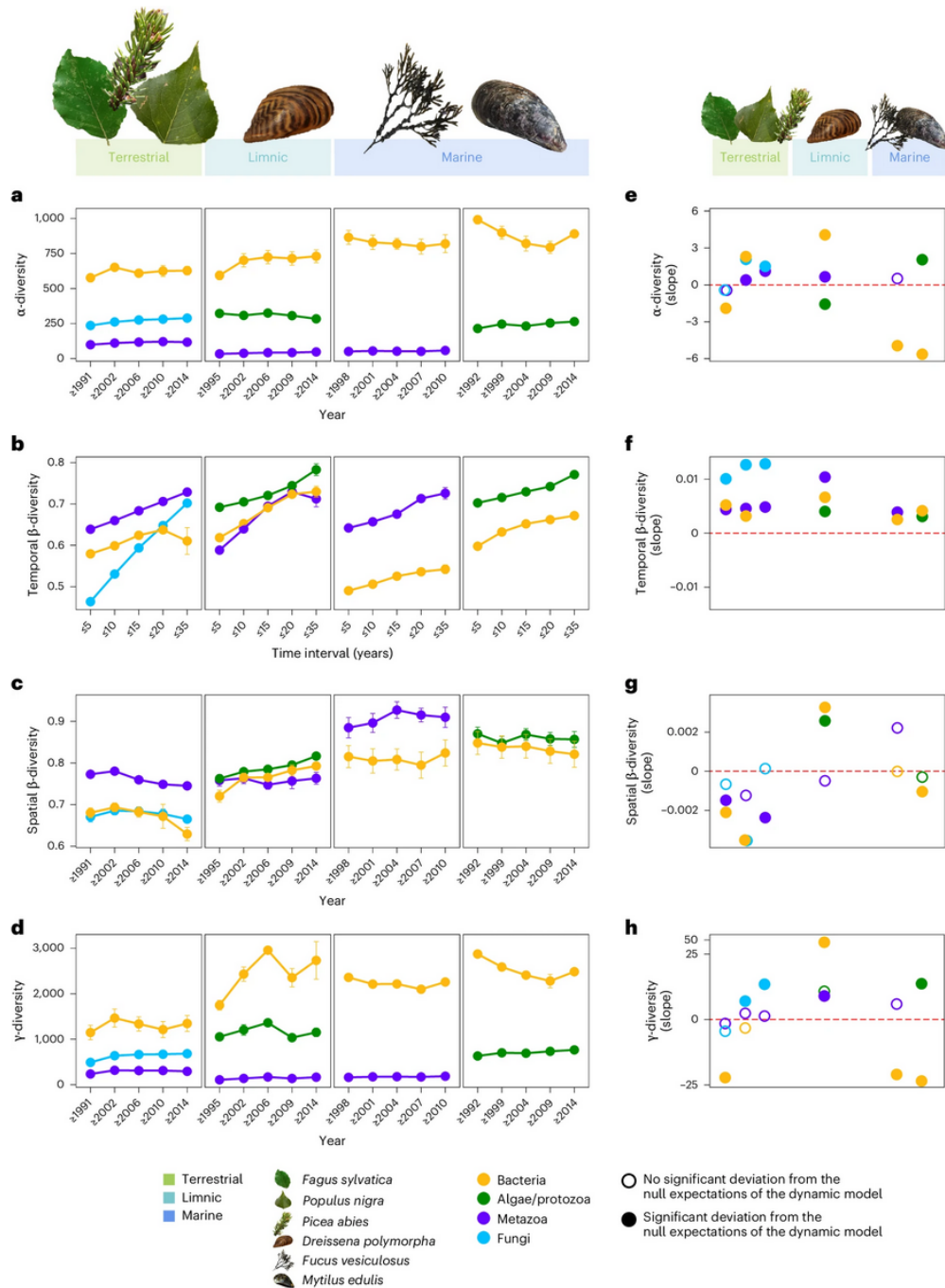
taxonomischen Ränge weitgehend stabil: Die zeitliche Zusammensetzung von Stämmen, Klassen und Ordnungen, die mit den jeweiligen Probenehmern assoziiert waren, veränderte sich kaum. Dies legt nahe, dass die Gemeinschaften ihre funktionale Struktur beibehalten haben und taxonomische Ersetzungen überwiegend funktional redundant sind. Aufgrund der geringen Probenzahl sind insbesondere die marinen Trends zur  $\gamma$ -Diversität in ihrer Aussagekraft limitiert.

- **Hauptaussage 2:** Ein statistisches Modell zeigt, dass sich Lebensgemeinschaften über alle Ökosysteme und Taxa hinweg signifikant schneller verändert haben, als es ohne den Einfluss anthropogener Faktoren zu erwarten wäre.

Die Simulationen auf Basis eines entwickelten statistischen Metacommunity-Modells erlaubte es Trends der OTU-Diversität ( $\alpha$ -Diversität), der zeitlichen Veränderungen in der Gemeinschaftszusammensetzung (zeitliche  $\beta$ -Diversität), der räumlichen Unterschiede in der Zusammensetzung (räumliche  $\beta$ -Diversität) sowie Bootstrap-Schätzungen der regionalen Diversität ( $\gamma$ -Diversität) für den Zeitraum 1991 bis 2021 zu ermitteln. Die Daten weisen auf eine ökosystemübergreifende, stetige Veränderung der Artenzusammensetzung in allen untersuchten Organismengruppen hin (**Abbildung 39 b**). Signifikante Abweichungen vom Modell belegen, dass sich die Artenzusammensetzung schneller veränderte, als es unter natürlichen Bedingungen – also ohne anthropogene Einflüsse – zu erwarten gewesen wäre (**Abbildung 39 f**). Dies weist auf eine gerichtete, durch anthropogene Faktoren verursachte Entwicklung hin. Diese konnte jedoch bislang mit keinen der getesteten Umweltparameter und potenziellen Treiber direkt in Verbindung gebracht werden.



**Abbildung 39: Multidekadische Trends der  $\alpha$ -Diversität, der zeitlichen und räumlichen  $\beta$ -Diversität und der  $\gamma$ -Diversität in Gemeinschaften entlang des Stammbaums des Lebens, die mit natürlichen eDNA-Sammlern aus der UPB assoziiert sind**



a) Trends des OTU-Reichtums ( $\alpha$ -Diversität) der assoziierten Gemeinschaften von 1991 bis 2021. b) Zeitliche Veränderungen in der Zusammensetzung der Gemeinschaften ( $\beta$ -Diversität gemessen anhand der Jaccard-Distanz) als Funktion des Zeitintervalls (in Jahren) zwischen Probenahmen am selben Probenahmeort. c) Trends in der räumlichen  $\beta$ -Diversität der assoziierten Gemeinschaften von 1991 bis 2021. d, Bootstrap-Schätzungen der regionalen Diversität ( $\gamma$ -Diversität) für die assoziierten Gemeinschaften von 1991 bis 2021. Alle Diversitätsindizes wurden als Mittelwert mit Standardfehlerbalken über Probenahmestellen und/oder Zeitfenster (und für terrestrische Proben über Baumarten) zusammengefasst. e–h) Diversitätstrends aus a (e), b (f), c (g) und d (h), reduziert auf ihre jeweiligen Steigungen. Gefüllte Kreise zeigen signifikante Abweichungen von den Null-Erwartungen, die durch das dynamische Modell für die Gemeinschaftsbildung generiert wurden, was auf eine Dynamik außerhalb des Gleichgewichts hindeutet. Verschiedene Ökosysteme und taxonomische

Gruppen werden durch unterschiedliche Farben dargestellt. Die Symbole beziehen sich auf die untersuchten Arten. Quelle: Junk et al. (2025).

- **Hauptaussage 3:** Die Analysen der Blattproben weisen auf eine zunehmende biotische Homogenisierung der Bakterien-, Pilz- und Gliederfüßerlebensgemeinschaften hin. Für die marinen und limnischen Proben wurde dieser Trend nicht festgestellt.

Ergänzend wurde auf Grundlage von Blowes et al. (2024) die räumliche Variation der Gemeinschaftszusammensetzung analysiert. Diese Analyse bestätigte, dass die meisten untersuchten Gemeinschaften (9 von 15 Gemeinschaften) eine biotische Homogenisierung durchliefen, während andere (6 von 15) eine räumliche Differenzierung erfuhren. Letztere war insbesondere bei Prokaryoten und Metazoen in limnischen Systemen sowie bei Pilzen, die mit Fichten assoziiert waren, deutlich ausgeprägt. Die Differenzierung könnte auf die Einwanderung von Taxa mit geringer Besiedlungsdichte an verschiedenen Standorten zurückzuführen sein.

Die biotische Homogenisierung, die als prominentes Muster des Biodiversitätswandels identifiziert werden kann, ist ein verbreitetes Umweltproblem. Weit verbreitete Generalisten, ersetzen vielerorts standortspezifische, spezialisierte Arten (Olden et al., 2004). Die Artenzusammensetzung verschiedener Standorte wird dann mit der Zeit immer ähnlicher. Das führt zu Abnahmen der Artenzahlen über größere Flächen. Dieser Prozess kann durch Umweltveränderungen verursacht werden, beispielsweise werden die Nischen von Arten, die aufgrund des Klimawandels aussterben, oftmals von generalistischen Neuankömmlingen besetzt. Alternativ können auch invasive Arten, standortspezifische Arten auskonkurrieren.

### Herausforderungen

Eine Limitation dieser Studie ist die geringe Anzahl von Probenahmestandorten der UPB. Das gilt insbesondere für die marinen Proben, die jeweils nur an drei Standorten beprobt werden. Das limitiert die Aussagekraft von Analysen der beta- und gamma-Diversität. Eine weitere Schwierigkeit ergab sich bei der Analyse von Treibern. Unsere statistischen Modellierungen konnten keine signifikanten Assoziationen der gefundenen Biodiversitätsmuster mit potenziellen Treibern identifizieren. Es sei aber auf Krehenwinkel et al. (2022) verwiesen, die durch die Analyse von Insektengemeinschaften aus UPB-Baumproben eine klare Assoziation von Diversitätsmustern mit Landnutzung und Temperatur feststellen konnten.

### Ausblick

Die Proben der UPB unterstützen hervorragend das Biodiversitätsmonitoring. Insbesondere die ungewöhnlich langen Zeitserien aus Baumkronen können eine große Lücke in unserem Verständnis des Insektensterbens füllen.

Ein wichtiges Ziel für die Zukunft muss sein, die geographische Breite der untersuchten Proben zu erhöhen, um statistisch robustere Daten zu erhalten. Die Zeitreihen der UPB könnten beispielsweise durch weitere räumliche Probenahmen ergänzt werden, die für vereinzelte Jahre eine größere geographische Breite abdecken. Für den Blasentang wurde eine derartige Probenahme entlang der Atlantikküste bereits von der UT vorgenommen. Eine andere, vielversprechende Möglichkeit, die Anzahl der untersuchten Standorte zu erhöhen, ist die Zusammenarbeit mit weiteren Umweltmonitoringprogrammen. Beispielsweise sammelt die Französische Mytilothèque des Meeresforschungsinstituts Ifremer seit Jahrzehnten Miesmuschelproben entlang der Atlantikküste. Viele Länder nehmen im Rahmen ihrer Waldzustandserhebungen umfassende Blattproben auf Forsten, die sich ebenfalls für Analysen der Biodiversität eignen (Stothut et al., 2024). Auch Herbarien eignen sich potenziell, um Muster der Veränderung von Insektengemeinschaften mittels eDNA-Spuren auf Pflanzen zu

analysieren (Stothut et al., 2024). Weltweit finden sich tausende Herbarien mit vielen Millionen von Pflanzenbelegen.

Ein weiteres wichtiges Ziel für die Zukunft ist die verbesserte statistische Analyse von Treibern. Optimierte statistische Modellierungen werden in Zukunft möglicherweise auch zur Identifikation von Treibern beitragen. Eine attraktive Ergänzung wäre zudem die experimentelle Analyse von potenziellen Treibern. Viele der von der UPB beprobten Organismen lassen sich in Kultur nehmen und können experimentell Stressoren ausgesetzt werden.

#### Datenverfügbarkeit

Alle Daten sind über unterschiedliche Repositorien gemäß der FAIR-Prinzipien verfügbar. Detaillierte Übersicht in **Tabelle 8**.

### 5.3 *Proof-of-Principle*-Studien für Einsatzfelder mit den Proben der Umweltprobenbank

#### 5.3.1 Analyse von Biodiversitätsveränderungen blattassoziierter Pilzgemeinschaften

##### Wie verändern sich blätterassozierte Pilzgemeinschaften mit der Zeit und sind die Veränderungen bei der gebietsfremden Fichte stärker als bei der heimischen Buche?

- ▶ Die lokale Pilzdiversität blieb bei Buchen stabil, stieg bei Fichten hingegen über den Untersuchungszeitraum signifikant an – sowohl insgesamt als auch an vier von sieben Standorten.
- ▶ Die Artenzusammensetzung der Pilzgemeinschaften beider Baumarten veränderte sich graduell und kontinuierlich über die Zeit; bei Fichten war dieser Wandel deutlich stärker ausgeprägt als bei Buchen.
- ▶ Unabhängig von der Baumart treten Verschiebungen der funktionellen Pilzgruppen über die Zeit auf.

| Institution | Habitat      | Probentyp | Methode                   | # Proben | Bewertung |
|-------------|--------------|-----------|---------------------------|----------|-----------|
| UT          | terrestrisch | Blätter   | eDNA-Metabarcoding (ITS1) | 113      | Erfolg    |

#### Motivation der Fallstudie

Pilze zählen mit geschätzten 1,5 bis 3,8 Millionen Arten zu den artenreichsten Organismengruppen (Hawksworth & Lücking, 2017), sind jedoch hinsichtlich ihrer Reaktion auf den Klimawandel noch unzureichend erforscht. Häufig bestehen enge Assoziationen zwischen Pilzen und Baumarten wie der Rotbuche (*Fagus sylvatica*) und der Fichte (*Picea abies*), die beide routinemäßig von der UPB beprobt werden. Während die Rotbuche ihr natürliches Verbreitungsgebiet in Deutschland hat (San-Miguel-Ayanz et al., 2016), kommen Fichten natürlicherweise nur in höheren Lagen sowie in kühleren Regionen wie Skandinavien vor. Ihre weite Verbreitung in Tieflagen geht auf Aufforstungsmaßnahmen des frühen 19. Jahrhunderts

zurück (Jansen et al., 2017) und macht sie gegenüber klimatischen Veränderungen anfälliger als die Buche. Langfristige, standardisierte Biodiversitätserfassungen sind angesichts fortschreitender Umweltveränderungen von zentraler Bedeutung, fehlen jedoch bislang weitgehend (Bálint et al., 2018; Magurran et al., 2010). Viele vorliegende Studien sind räumlich und taxonomisch begrenzt, was belastbare Aussagen zur Waldgesundheit auf Basis mikrobieller Gemeinschaften erschwert (Fang et al., 2023). Die UPB-Proben beider Baumarten werden auf benachbarten Flächen innerhalb derselben Untersuchungsgebiete entnommen und ermöglichen so einen direkten Vergleich der assoziierten Pilzgemeinschaften – einschließlich ihrer funktionellen Gruppen – über Raum und Zeit. Ziel dieser Fallstudie war es, die Entwicklung baumkronenassoziierter Pilzgemeinschaften zu untersuchen und mögliche klimawandelbedingte Effekte zu identifizieren.

### **Methode**

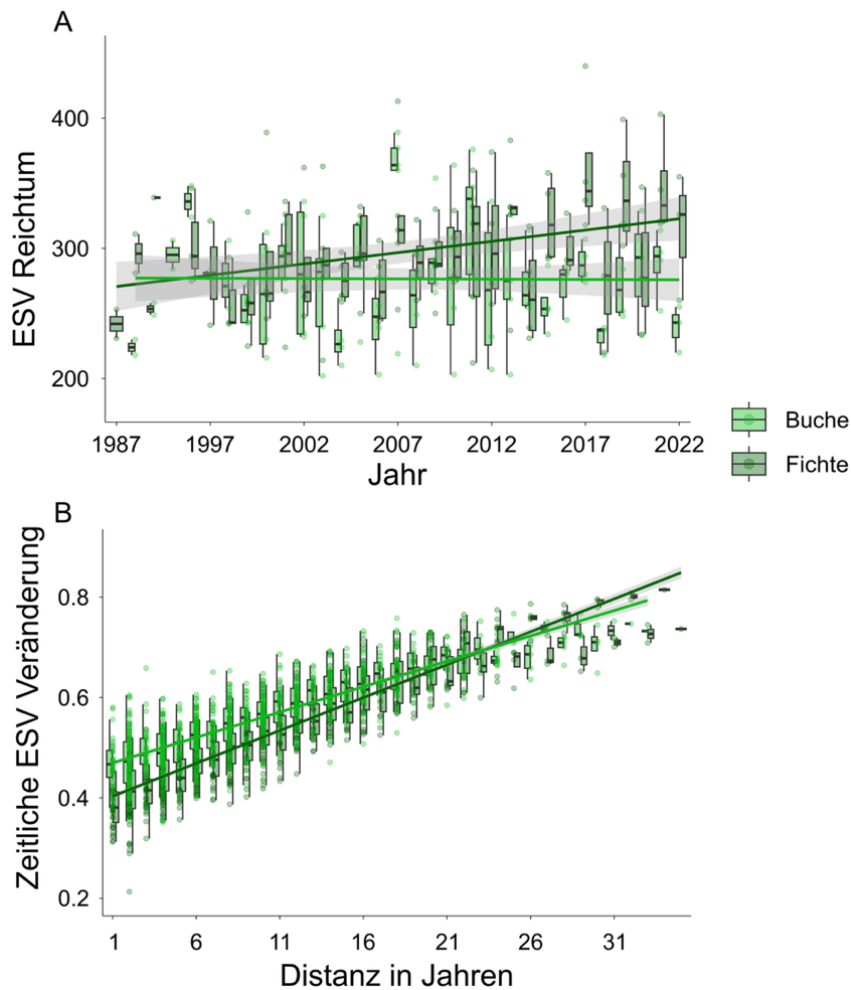
Die Analyse erfolgte, wie in **Kapitel 5.2.4** beschrieben.

### **Ergebnisse**

- **Hauptaussage 1:** Die lokale Pilzdiversität blieb bei Buchen stabil, stieg bei Fichten hingegen über den Untersuchungszeitraum signifikant an – sowohl insgesamt als auch an vier von sieben Standorten.

Im Gegensatz zu anderen Studien, die einen Rückgang des lokalen Artenreichtums über die Zeit dokumentieren (Dirzo et al., 2014; Mikryukov et al., 2023), ließ sich ein solcher Trend für die untersuchten Pilzgemeinschaften nicht bestätigen. Die buchenassoziierte Pilzdiversität blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum trotz temporärer Schwankungen weitgehend stabil. Die fichtenassoziierte Pilzvielfalt hingegen stieg sowohl auf Gesamtebene als auch an vier von sieben Standorten signifikant an (**Abbildung 40**).

**Abbildung 40: Zeitliche Muster von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diversität der Pilzlebensgemeinschaften**



In A) ist der ESV-Reichtum dargestellt. B) zeigt die zeitliche Veränderung. Quelle: eigene Darstellung, UT.

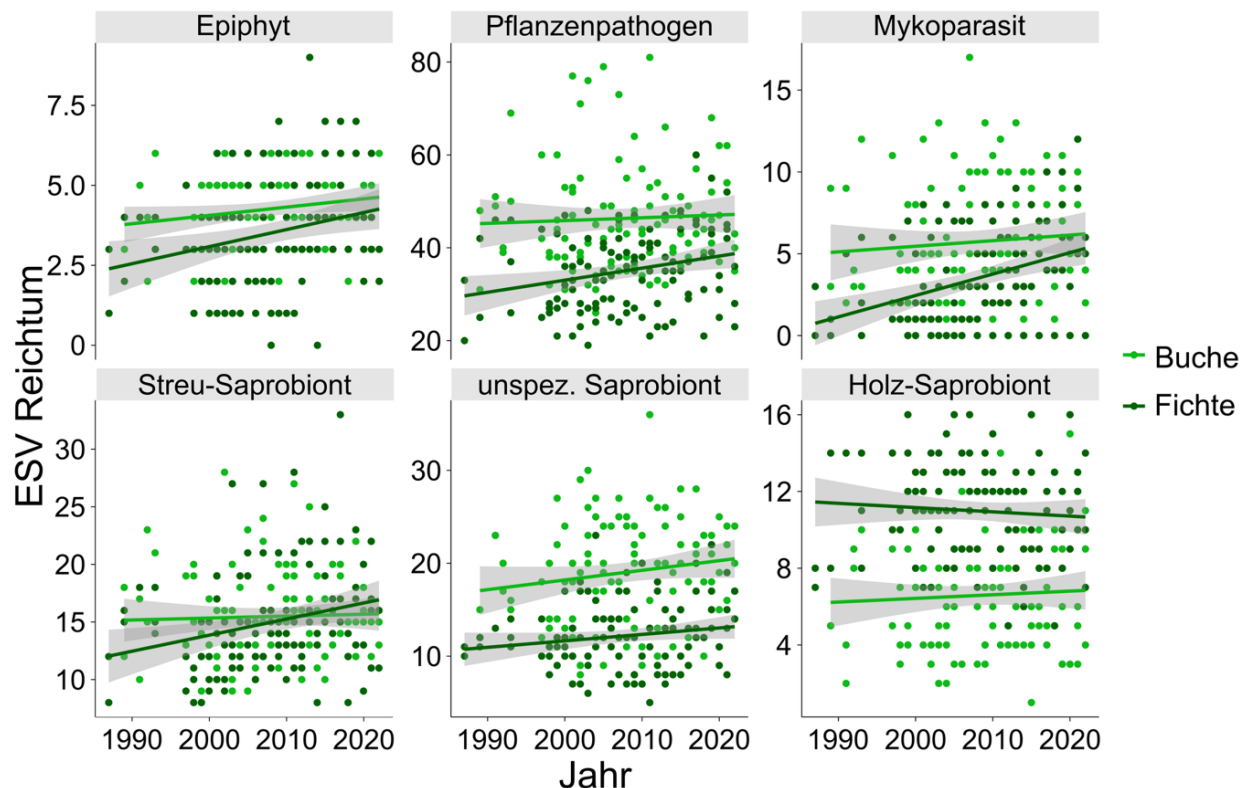
- **Hauptaussage 2:** Die Artenzusammensetzung der Pilzgemeinschaften beider Baumarten veränderte sich graduell und kontinuierlich über die Zeit; bei Fichten war dieser Wandel deutlich stärker ausgeprägt als bei Buchen.

Unabhängig von der Baumart veränderte sich die  $\beta$ -Diversität der Pilzgemeinschaften signifikant mit der Zeit, wobei der Wandel bei fichtenassoziierten Gemeinschaften ausgeprägter war. Bei kurzen Beprobungsintervallen waren fichtenassoziierte Gemeinschaften einander ähnlicher als buchenassoziierte; bei längeren Intervallen kehrte sich dieses Muster um – mit zunehmendem zeitlichem Abstand nahmen die Unterschiede zwischen Fichtenproben deutlich stärker zu. Die Artenzusammensetzung veränderte sich graduell und kontinuierlich an allen Standorten und bei beiden Baumarten, was auf einen übergeordneten gemeinsamen Treiber hindeutet. Diese Befunde stehen im Einklang mit aktuellen Ergebnissen aus anderen Ökosystemen (Blowes et al., 2019; Dornelas et al., 2014; Magurran et al., 2010). Als zentraler Treiber solcher Verschiebungen in der Gemeinschaftszusammensetzung gilt der Klimawandel (Jaureguiberry et al., 2022).

- **Hauptaussage 3:** Unabhängig von der Baumart treten Verschiebungen der funktionellen Pilzgruppen über die Zeit auf.

Die Veränderungen der funktionellen Gruppen folgen ähnlichen Mustern wie die Diversitätstrends. Bei buchenassoziierten Pilzen waren keine signifikanten Verschiebungen in den baumartrelevanten funktionellen Gruppen feststellbar. Bei fichtenassoziierten Pilzen hingegen nahmen mykoparasitäre, epiphytische und pflanzenpathogene Gruppen über den Untersuchungszeitraum signifikant zu, während saprotrophe Gruppen weitgehend stabil blieben (**Abbildung 41**). Der Anstieg saprotropher Pilze in der Streu deutet auf eine zunehmende Akkumulation toten Pflanzenmaterials hin – ein mögliches Zeichen nachlassender Baumvitalität. Diese strukturellen Verschiebungen innerhalb der Pilzgemeinschaften spiegeln vermutlich ökologische Anpassungsprozesse an veränderte Umweltbedingungen wider. Fichten reagieren besonders empfindlich auf Wasserknappheit (Karlsson et al., 2002), und der fortschreitende Klimawandel dürfte durch steigende Temperaturen und sinkende Grundwasserspiegel (Wunsch et al., 2022) ihre Wachstumsbedingungen weiter verschlechtern. Bereits heute weisen Fichten in Deutschland die höchste Absterberate unter den Hauptbaumarten auf (BMEL, 2024). Verstärkte Borkenkäferbefälle erhöhen zusätzlich den Stress und die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen (Plath et al., 2024). Der beobachtete Anstieg pathogener Pilze deutet somit auf eine Verschlechterung der Baumgesundheit hin, die potenziell ganze Waldökosysteme beeinträchtigen kann. Darüber hinaus begünstigen veränderte Umweltbedingungen die Etablierung invasiver Arten in frei gewordenen ökologischen Nischen – Hinweise darauf finden sich ebenfalls in den vorliegenden Ergebnissen.

**Abbildung 41:  $\alpha$ -Diversität (hier dargestellt als ESV-Reichtum) für blattassoziierte Pilze mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften**



Quelle: eigene Darstellung, UT.

### Herausforderungen

Eine methodische Herausforderung war die strenge Filterung der Proben für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diversitätsanalysen, die zu einer Verkürzung der Zeitreihe führte. Dieser Schritt war jedoch



notwendig, um den unverhältnismäßigen Einfluss zeitlich isolierter Probenjahre zu vermeiden. Eine weitere zentrale Herausforderung stellt die lückenhafte Verfügbarkeit taxonomischer und funktioneller Datenbanken für Pilze dar, was die Interpretierbarkeit der Ergebnisse erheblich einschränkt.

### Ausblick

Die Fichte stirbt derzeit in Deutschland aus, was die Forstwirtschaft vor eine große Herausforderung stellt. Die Baumproben der UPB bieten die einzigartige Möglichkeit, diesen Aussterbeprozess und seine assoziierten biologischen und chemischen Veränderungen zu verfolgen.

Pilzgemeinschaften sind sehr gute Indikatoren für den Umweltzustand. Daher eignen sie sich optimal für Analysen von Stressoren. Krehenwinkel et al. (2022) konnten in einer Untersuchung der Pestizidbelastung in UPB-Blattproben diverse Fungizide identifizieren. Die UPB untersucht zudem standardmäßig weitere chemische Stressoren. Statistische Modellierungen erlauben möglicherweise ein besseres Verständnis dieser Stressoren auf die heimische Biodiversität. Verschiedene Pilzarten lassen sich aus den Blattproben der UPB sogar kultivieren. Das ermöglicht experimentelle Arbeiten und damit die direkte Identifikation der Wirkung einzelner Stressoren.

### Datenverfügbarkeit

Alle Daten dieser Fallstudie sind aus Fallstudie 4 (**Kapitel 5.2.4**), siehe **Tabelle 8**.

## 5.3.2 Internationaler Vergleich von Biodiversitätsveränderungen in blattassozierten Gliederfüßergemeinschaften

### Sind Trends zur Veränderung blattassoziierter Gliederfüßergemeinschaften der deutschen UPB vergleichbar mit Daten der UPB aus Südkorea?

- ▶ Die Blattproben der südkoreanischen UPB eignen sich für die vergleichende Analysen von Biodiversitätsmustern.
- ▶ Blattassozierte Gliederfüßergemeinschaften in Südkorea zeigen, unabhängig vom Landnutzungstyp, eine signifikante Abnahme der  $\alpha$ -Diversität in den letzten 10 Jahren.
- ▶ Internationale Probenbanken stellen eine wertvolle Ressource für vergleichende Biodiversitätsforschung zum Insektensterben dar.

| Institution | Habitat      | Probentyp | Methode                       | # Proben | Bewertung |
|-------------|--------------|-----------|-------------------------------|----------|-----------|
| UT          | terrestrisch | Blätter   | eDNA-Metabarcoding (COI, 18S) | 113      | Erfolg    |

### Motivation der Fallstudie

Für die detaillierte Analyse von Biodiversitätsveränderungen über Länder hinweg ist das Fehlen einheitlicher Beprobungs- und Analysestandards eine Herausforderung. Proben von Umweltprobenbanken stellen hier ein wertvolles Instrument dar, um diese Wissenslücken mit hochstandardisiert erhobenen Zeitreihen zu schließen. Neben der deutschen UPB des Bundes

existieren weltweit 27 weitere Umweltprobenbanken, die als Archive für Biotaprobieren fungieren (Zhao et al., 2015). Eine Probenbank, die der deutschen in Beprobung, Probenaufbereitung und Lagerung besonders ähnlich ist, ist die National Environmental Specimen Bank of South Korea. Diese wird administrativ vom National Institute of Environmental Research geleitet und beprobt seit 2012 vier Baumarten: die mongolische Eiche (*Quercus mongolica*), die japanische Zelkove (*Zelkova serrata*), die koreanische Kiefer (*Pinus koraiensis*) und die japanische Rotkiefer (*Pinus densiflora*). Die Probenahmen erfolgen an elf Standorten, die einen Landnutzungsgradienten von Agrar- und urbanen Flächen bis hin zu Forsten und Nationalparks abbilden. Auch die deutsche UPB sammelt und archiviert vier Baumarten, darunter zwei Laubbaumarten (*Fagus sylvatica* und *Populus nigra italica*) sowie zwei Nadelbaumarten (*Picea abies* und *Pinus sylvestris*), die ebenfalls entlang eines vergleichbaren Landnutzungsgradienten erhoben werden. Aufgrund der vergleichbaren Methoden in Sammlung, Lagerung und Probenprozessierung bieten die Proben der deutschen und südkoreanischen Umweltprobenbanken erstmals die Möglichkeit, Veränderungen in Lebensgemeinschaften über einen Zeitraum von zehn Jahren hinweg zu analysieren und die Ergebnisse direkt miteinander zu vergleichen.

Ziel der vorliegenden Fallstudie war ein direkter Vergleich von abgeleiteten Biodiversitätstrends aus Blattproben der Umweltprobenbanken. Hierzu wurden über eDNA-Metabarcoding blattprobenassoziierte Gliederfüßergemeinschaften analysiert. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass Gliederfüßergemeinschaften insbesondere auf landwirtschaftlich genutzten Flächen deutliche Rückgänge in der  $\alpha$ -Diversität aufweisen, während diese Veränderungen in naturnahen Lebensräumen weniger stark ausgeprägt sind (Newbold et al., 2015; Outhwaite et al., 2022; Seibold et al., 2019).

## Methode

Für den Vergleich der blattassoziierten Gliederfüßergemeinschaften in deutschen und südkoreanischen UPB-Proben, wurden 54 Proben aus Deutschland (17 Probenahmeflächen) und 59 Proben aus Südkorea (11 Probenahmeflächen) ausgewählt, die jeweils von 2012 bis 2022 gesammelt wurden. Die Analyse erfolgte wie in Fallstudie 4 (**Kapitel 5.2.4**) geschildert basierend auf Krehenwinkel et al. (2025). Für die Analyse von  $\alpha$ -Diversitätstrends der untersuchten Lebensgemeinschaften wurde ein negativ-binomiales generalisiertes lineares Modell mit den festen Effekten Jahr, Landnutzungstyp und Baumart für beide Datensätze erstellt. Für die Analysen wurden Agrarflächen und urbane Flächen als anthropogene sowie Forste und Nationalparke als naturnahe Standorte zusammengefasst.

## Ergebnisse

- **Hauptaussage 1:** Die Proben der südkoreanischen Umweltprobenbank eignen sich für die Analyse von Biodiversitätsmustern und dem Insektensterben.

Die Analyse der Proben der südkoreanischen Umweltprobenbank zeigten eine diverse Lebensgemeinschaft: Insgesamt konnten über 100 verschiedene Gattungen und knapp 100 Gliederfüßerarten nachgewiesen werden. Die am häufigsten dokumentierte Gruppe waren die Milben (Acari). Sowohl die südkoreanischen als auch die deutschen Proben zeigten für jede Baumart individuelle Gliederfüßergemeinschaften, die sich signifikant von den anderen Baumarten unterschieden (**Abbildung 42 C,D**). Die relative Häufigkeit der detektierten Ordnungen in Südkorea und Deutschland war vergleichbar.

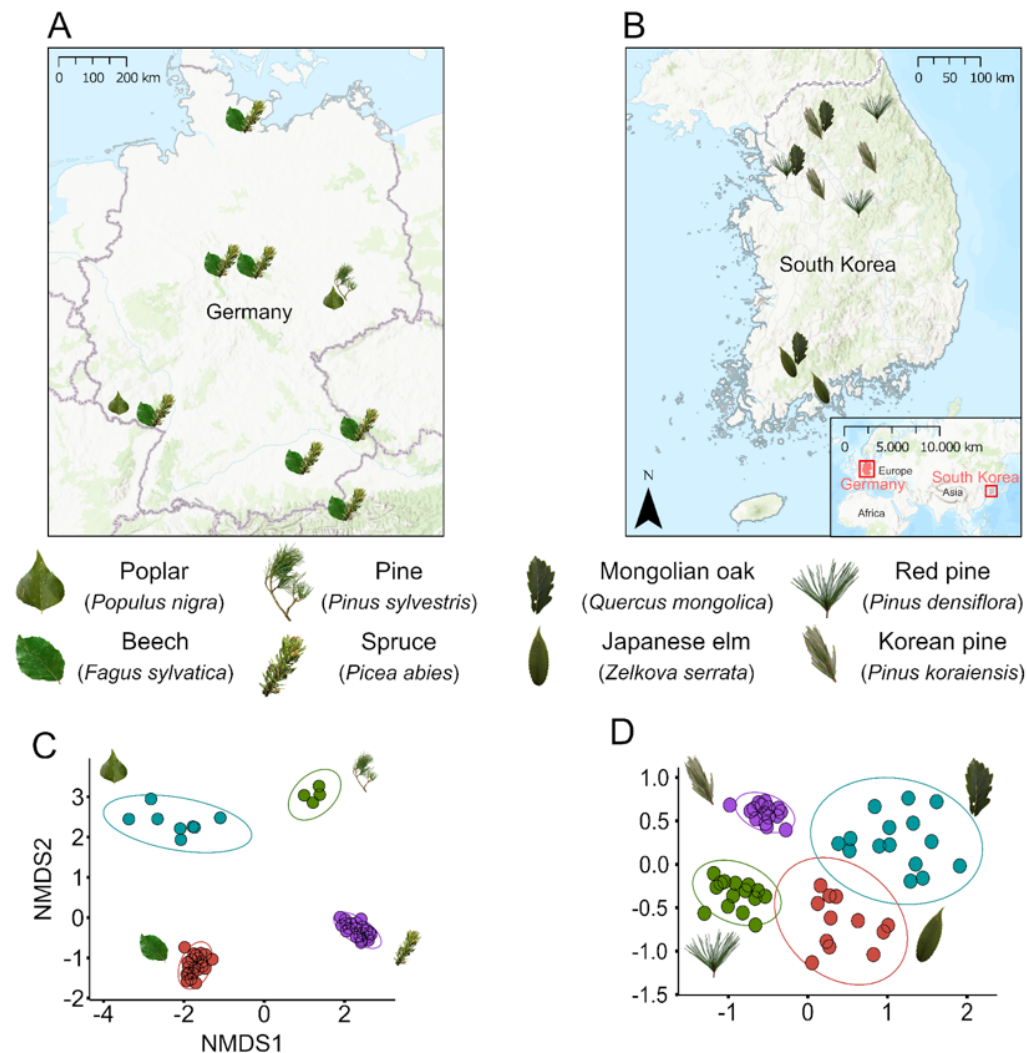
- **Hauptaussage 2:** Gliederfüßergemeinschaften in Südkorea zeigen, unabhängig vom Landnutzungstyp, eine signifikante Abnahme der  $\alpha$ -Diversität.

In den deutschen Proben blieb die  $\alpha$ -Diversität der Gliederfüßergemeinschaften über den hier betrachteten Zeitraum von 10 Jahren stabil (**Abbildung 43**), was auch den Ergebnissen der bereits vorgestellten knapp 30-jährigen Zeitreihe (**Kapitel 5.2.4**) entspricht. Im Gegensatz dazu zeigten die südkoreanischen Arthropodengemeinschaften über den 10-jährigen Zeitraum eine signifikante Abnahme der  $\alpha$ -Diversität. Dieser signifikante Rückgang wurde unabhängig davon detektiert, ob alle Standorte gemeinsam oder getrennt nach anthropogen beeinflusst und naturnah betrachtet wurden. In Korea scheint es also ein Insektensterben in Forsten zu geben.

Eine erste Studie aus Ostasien belegt, dass Gliederfüßergemeinschaften auf Agrarflächen innerhalb der letzten 20 Jahre einen deutlichen Diversitätsrückgang erfahren haben (Zhou et al., 2023). Auch in Südkorea wurde zwischen 2005 und 2017 ein signifikanter Rückgang von Nachtfalterpopulationen dokumentiert (Choi et al., 2019). Da die Zeitreihe der südkoreanischen Umweltprobenbank erst im Jahr 2012 begonnen wurde, kann ein bereits zuvor einsetzender Rückgang, der die hier beobachteten Muster beeinflusst haben könnte, nicht ausgeschlossen werden. Ein weiterer, nicht zu unterschätzender Faktor, ist die Lichtverschmutzung, die eng mit zunehmender Urbanisierung verknüpft ist. Hakbong et al. (2021) konnten eindrücklich zeigen, dass sich die Zusammensetzung von Insektengemeinschaften in lichtverschmutzten Gebieten deutlich von jener in naturnahen Habitaten unterscheidet.

Die deutsche Zeitreihe zeigte dagegen auch keine Veränderung der  $\alpha$ -Diversität, wenn die Standorte nach „anthropogen beeinflusst“ und „naturnah“ getrennt wurden. Dieses Ergebnis widerspricht früheren Untersuchungen, die an anthropogenen Standorten einen signifikanten Diversitätsrückgang bei Gliederfüßern feststellten. Der Hauptgrund für diese Diskrepanz liegt in der verkürzten Zeitreihe – ein in der Literatur bereits beschriebener Effekt (Didham et al., 2020; Macgregor et al., 2019). Wird die vollständige, fast 30-jährige Zeitreihe getrennt nach Standorten betrachtet, zeigt sich dort an den anthropogen geprägten Standorten eine signifikante Abnahme der  $\alpha$ -Diversität.

**Abbildung 42: Die Auswahl der Probenahmestellen und die Ermittlung der Vielfalt und Wechselwirkungen mit den mit dem Kronendach assoziierten Gliederfüßergemeinschaften aus Blattmaterial**



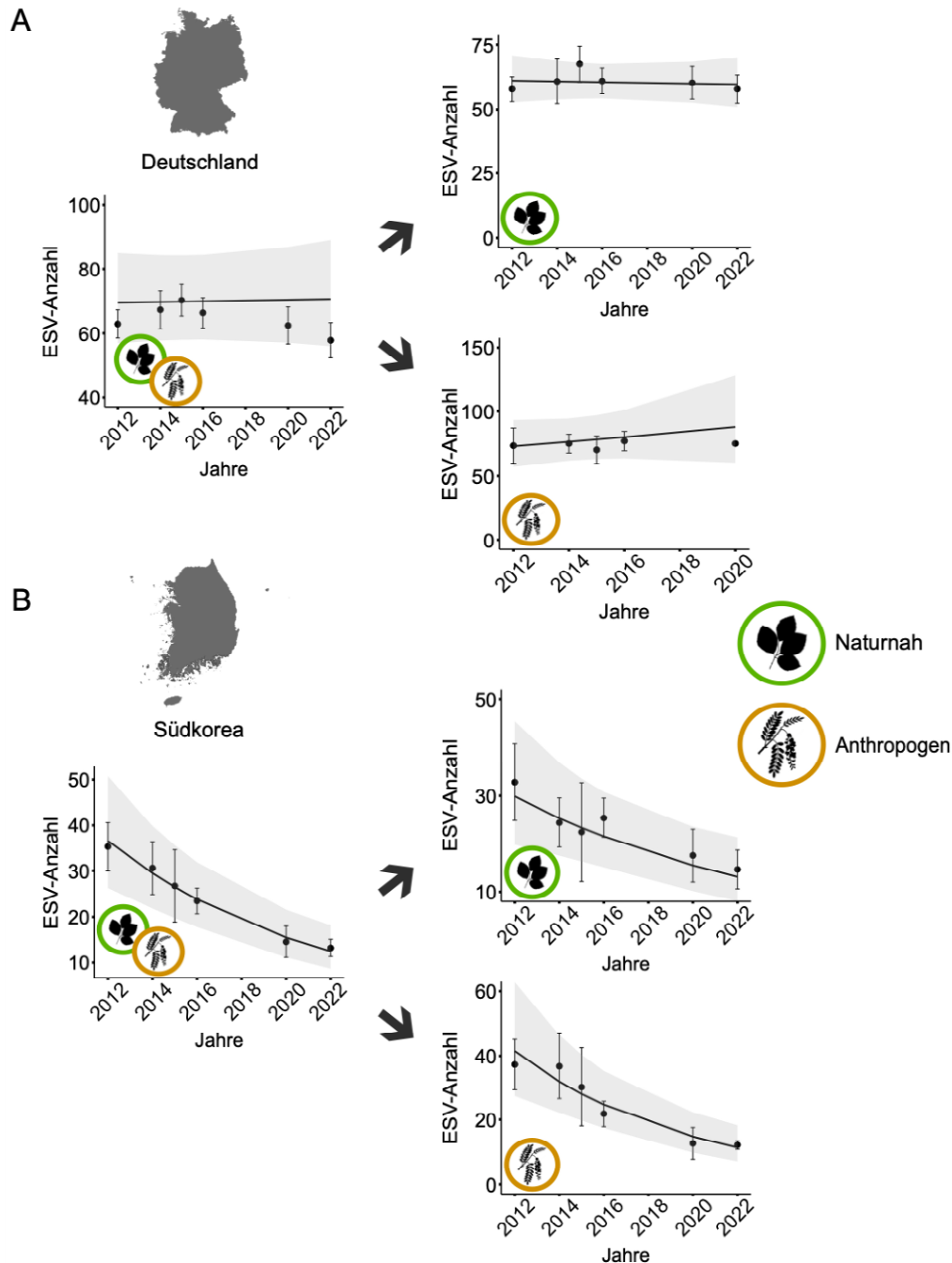
A) Probenahmestellen der vier Baumarten (Europäische Buche *Fagus sylvatica*, Pappel *Populus nigra* 'italica', Fichte *Picea abies* und Waldkiefer *Pinus sylvestris*), die von der UPB in Deutschland und B) Probenahmestellen der vier Baumarten (Mongolische Eiche *Quercus mongolica*, Japanische *Zelkova serrata*, Japanische Rotkiefer *Pinus densiflora* und Koreanische Kiefer *Pinus koraiensis*), die von der UPB in Südkorea beprobt wurden. C,D) NMDS-Plots, die die baumspezifische Zusammensetzung der Gliederfüßergemeinschaft für (C) die deutsche UPB und (D) die südkoreanische Umweltprobenbank zeigen. Quelle: eigene Darstellung, UT.

### Herausforderungen

Eine der größten Herausforderungen dieser Studie besteht in der Länge und Vollständigkeit der verfügbaren Zeitreihe. Gliederfüßergemeinschaften unterliegen natürlichen Fluktuationen, die sich über mehrere Jahrzehnte erstrecken können. Obwohl ein Zeitraum von zehn Jahren bereits als lang gilt, sind die Möglichkeiten zur Interpretation der Ergebnisse begrenzt. Zudem stehen sowohl für die südkoreanische als auch für die deutsche UPB vergleichsweise wenig Probenahme Flächen pro Baumart zur Verfügung. In Deutschland werden beispielsweise Kiefer und Pappel lediglich an einer beziehungsweise zwei Flächen beprobt, während in Südkorea die japanische Zelkove nur an zwei Standorten erfasst wird. Dadurch sind Analysen der  $\beta$ -Diversität nur eingeschränkt oder teilweise gar nicht durchführbar. Eine weitere Herausforderung stellt die Verfügbarkeit taxonomischer Referenzdatenbanken für Südkorea dar. Aufgrund der

begrenzten Datenlage sind Analysen auf Artniveau derzeit nur in eingeschränktem Umfang möglich.

**Abbildung 43: Trends der ESV-Vielfalt in Waldarthropoden-Gemeinschaften über einen Zeitraum von 11 Jahren in (A) Deutschland und (B) Südkorea**



Die Trends werden für naturnah (oben) und anthropogen klassifizierte Waldlandschaften (unten) für beide UPBs dargestellt. Die ausgefüllten Punkte stellen die vorhergesagten Mittelwerte der zusammengefassten ESV-Vielfalt über die Probenahmestellen und Zeitfenster dar, und die vertikalen Linien zeigen die 95 %-Konfidenzintervalle. Die Daten wurden mit einem generalisierten linearen Modell (GLM) analysiert. Die Symbole beziehen sich auf die analysierte Waldlandschaft. Quelle: eigene Darstellung, UT.

## Ausblick

Die Daten dieser *Proof-of-Principle*-Fallstudie zeigen den Wert von Umweltprobenbanken für vergleichende internationale Studien von Biodiversitätsveränderungen. Sowohl die deutsche als auch die südkoreanische Umweltprobenbank werden auch zukünftig auf standardisierte Weise weitere Proben gewinnen und archivieren. Dies bietet die Möglichkeit, die Analysen in näherer Zukunft erneut durchzuführen und zu überprüfen, ob die beschriebenen Muster sich fortsetzen oder umkehren. Zudem könnten unter Berücksichtigung von Klimavariablen potenzielle Treiber, wie Niederschlag oder Temperatur, identifiziert werden. Die Analyse funktioneller Gruppen könnte zudem die Information liefern, ob bestimmte Gruppen, wie beispielsweise Bestäuber, besonders stark vom Diversitätsrückgang betroffen sind. Dies war im Rahmen des TrendDNA-Projekts zeitlich noch nicht möglich. Die Daten zeigen aber deutlich, dass Probenbanken wichtige Informationen zum Insektensterben liefern können.

## Datenverfügbarkeit

Für diese Studie erhobenen Daten sind unter <https://www.scidb.cn/en/s/6vmuM3> verfügbar; weitere Daten siehe **Tabelle 8**.

### 5.3.3 Innerartliche genetische Diversität von baumkronenassoziierten Gliederfüßern

#### Können eDNA-Metabarcodingdaten von baumkronenassoziierten Lebensgemeinschaften auch genutzt werden, um Hinweise auf Veränderungen der innerartlichen Diversität zu erhalten?

- ▶ Vorhandene eDNA-Metabarcodingsätze können genutzt werden, um die innerartliche Diversität einzelner Arten auf Basis mitochondrialer ESVs zu analysieren
- ▶ Die Daten zur innerartlichen genetischen Variabilität blattassoziierter Gliederfüßer zeigen ausgeprägte zeitliche, räumliche sowie baumartenspezifische Differenzierungsmuster

| Institution | Habitat      | Probentyp | Methode                  | # Proben            | Bewertung |
|-------------|--------------|-----------|--------------------------|---------------------|-----------|
| SGN         | terrestrisch | Blätter   | eDNA-Metabarcoding (COI) | 312 Blatthomogenate | Erfolg    |

## Motivation der Fallstudie

Neben taxonomischen und ökologischen Erkenntnissen können DNA-Metabarcodingdaten auch Einblicke in die innerartliche genetische Diversität liefern. Der Vorteil gegenüber den populationsgenomischen Methoden (**Kapitel 5.3.4**) ist, dass genetische Varianten einzelner Arten (ESVs, oder auch mitochondriale Haplotypen) über zahlreiche Arten auf einmal identifiziert werden können. Allerdings ist der Informationsgehalt der haploiden ESVs um ein Vielfaches geringer als andere populationsgenomische Methoden. Mit dieser *Proof-of-Principle*-Fallstudie sollte geprüft werden, ob auf Basis eines im Projekt erstellten Datensatzes (Krehenwinkel et al., 2022) Gliederfüßertaxa identifiziert werden können, die sich innerartlich durch multiple ESVs unterscheiden, und ob diese Unterschiede vor allem räumlicher, zeitlicher oder baumartenspezifischer Natur sind.

## Methoden

Der Datensatz von Krehenwinkel et al. (2022) umfasste Proben von vier verbreiteten deutschen Baumarten (europäische Buche: *Fagus sylvatica*; lombardische Pappel: *Populus nigra italica*;



Fichte: *Picea abies* und Waldkiefer: *Pinus sylvestris*) von 24 Standorten, die zwischen 1987 und 2018 beprobt wurden und wies insgesamt 2054 Arthropoden-OTUs auf. Für die hier durchgeführten Analysen wurden zwei jeweils 300 m voneinander entfernte Baumstandorte zu einem Standort zusammengefasst. Zwei weitere Standorte wiesen keine intraspezifische Diversität auf. Der finale Datensatz bestand damit aus 10 Proben. Zur Analyse der geografischen Differenzierung wurden die Standorte drei Regionen zugeordnet: norddeutschen Tiefebene (Bundesländer Schleswig-Holstein, Brandenburg, Sachsen-Anhalt, Niedersachsen), Südostdeutschland (Bayern) und Südwestdeutschland (Saarland, Rheinland-Pfalz). Zeitliche Signale wurden auf Ebene einzelner Jahre sowie Dekaden berechnet. Für Anzeichen einer zeitlichen Veränderung in der ESV-Verteilung wurden die Probestandorte nicht nach Regionen zusammengefasst, sondern einzeln analysiert. Für alle drei Differenzierungsebenen (geografisch, zeitlich, baumartspezifisch) wurde ein Schwellenwertprinzip angewandt, wobei in dieser *Proof-of-Principle*-Fallstudie für die einzelnen Parameter unterschiedliche Schwellenwerte betrachtet wurden: Für Signale der geografischen Differenzierung in der ESV-Verteilung haben wir die Probenahmestellen drei Regionen zugeordnet: norddeutschen Tiefebene (Bundesländer Schleswig-Holstein, Brandenburg, Sachsen-Anhalt und Niedersachsen), Südostdeutschland (Bayern) und Südwestdeutschland (Saarland, Rheinland-Pfalz). Zeitliche Signale wurden auf Ebene einzelner Jahre sowie Dekaden berechnet. Für Anzeichen einer zeitlichen Veränderung in der ESV-Verteilung haben wir jeden Probenahmeort einzeln betrachtet.

Als Signal für eine geografische Differenzierung galt für eine OTU, wenn für mindestens einen ESV die Unterschiede in der relativen Häufigkeit im Gesamtdatensatz zwischen zwei oder mehr dieser Regionen einen definierten Schwellenwert erreichten oder überschritten. Beispielsweise wurde ein ESV, der 50 % der Gesamtreads in Südwestdeutschland, aber nur 10 % in Südostdeutschland ausmachte, bei einem Schwellenwert von 0,4 oder darunter als potenzielles Signal für geografische Differenzierung gewertet.

Ein Signal für eine potenzielle zeitliche Veränderung lag vor, wenn für mindestens ein ESV und Standort (sowie Baumart) der Unterschied in der relativen Häufigkeit zwischen zwei aufeinander-folgenden positiven Probenahmen den Schwellenwert erreichte oder überschritt. Beispielsweise wurde ein ESV, der 10 % der Reads einer OTU an einem Standort im Jahr 1990, aber 30 % in der folgenden Probenahme 1995 ausmachte, bei einem Schwellenwert von 0,2 oder darunter als potenzielles Signal für eine zeitliche Veränderung gewertet.

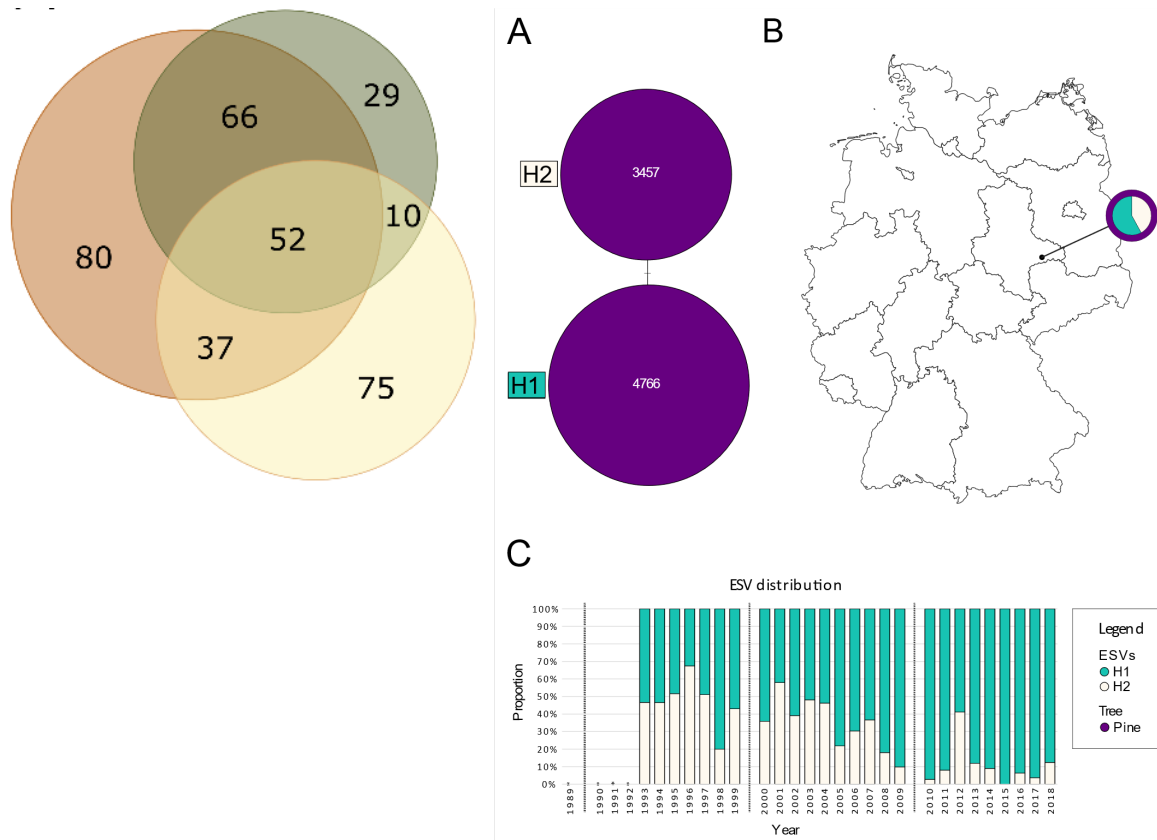
Ein Signal für eine potenzielle Baumspezifität in der ESV-Verteilung für eine OTU wurde angenommen, wenn für mindestens ein ESV die Unterschiede in der relativen Häufigkeit in unserem Gesamtdatensatz zwischen zwei oder mehr der untersuchten Baumarten den Schwellenwert erreichten oder überschritten. Beispielsweise galt ein ESV, der 80 % der Reads einer OTU bei Buchen, aber nur 20 % bei Fichten ausmachte, bei einem Schwellenwert von 0,6 oder darunter als potenzielles Signal für Baumspezifität. Die Anzahl der OTUs mit Differenzierungssignalen wurde mit flächenproportionalen Venn-Diagrammen mit DeepVenn (Hulsen, 2022) visualisiert. Fünf Beispiel-OTUs, bei denen eine hohe intraspezifische Diversifizierung (mindestens 20% unterschiedliche ESVs, Schwellenwert 0,2) wurden ausgewählt, um die Methode exemplarisch zu demonstrieren. Für jede wurde eine molekulare Varianzanalyse (AMOVA, basierend auf genetischen Distanzdaten) und Median-Joining-ESV-Netzwerke (Bandelt et al., 1999) in PopArt 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) berechnet. Für das Zeitsignal wurden die Daten in drei Jahrzehnte gruppiert (1990–1999, 2000–2009, 2010–2018). Verbreitungskarten wurden in QGIS erstellt und Balkendiagramme zur Visualisierung der zeitlichen ESV-Verteilung verwendet.

## Ergebnisse

- **Hauptaussage 1:** Vorhandene eDNA-Metabarcodingsätze können genutzt werden, um die innerartliche Diversität einzelner Arten auf Basis mitochondrialer ESVs zu analysieren.
- **Hauptaussage 2:** Die Daten zur innerartlichen genetischen Variabilität blattassoziierter Gliederfüßer zeigen ausgeprägte zeitliche, räumliche sowie baumartenspezifische Differenzierungsmuster.

In dem Datensatz von Krehenwinkel et al. (2022) wurden 542 mit OTUs zwei oder mehr ESVs detektiert (insgesamt 1758 ESVs). Diese standen für die weiteren Analysen zur innerartlichen genetischen Variation zur Verfügung. Ein großer Anteil dieser OTUs zeigte eine intraspezifische Differenzierung auf allen untersuchten Ebenen (zeitlich, räumlich und baumspezifisch). Bei Wahl einer Veränderung der Häufigkeit einzelner ESVs innerhalb der OTUs zwischen Messwerten (Baumart, Region, Beprobungsjahr) von mindestens 30% wiesen immer noch 349 OTUs (64 % der 542 untersuchten OTUs) ein Differenzierungssignal auf (**Abbildung 44 links**).

**Abbildung 44: Analysen zur innerartlichen genetischen Diversität von blattassozierten Gliederfüßern**



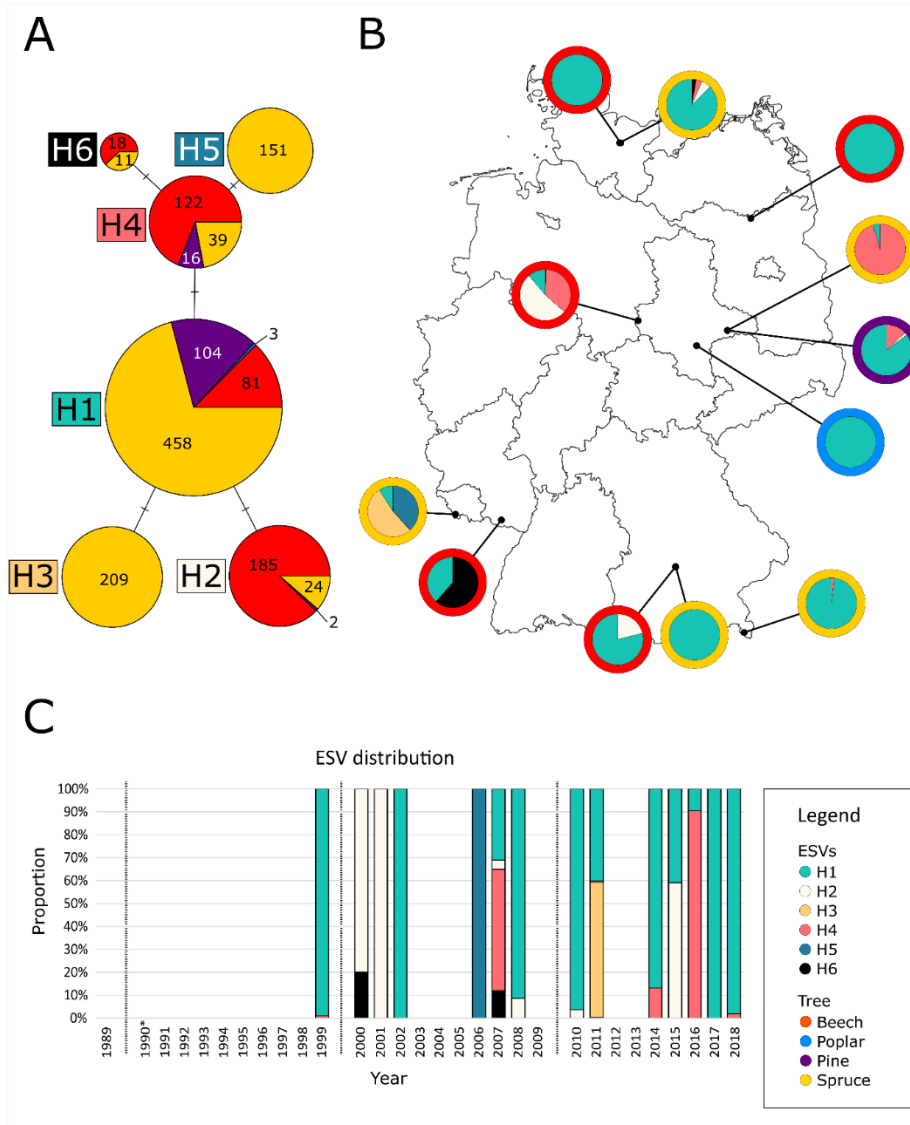
Links: Flächenproportionales Venn-Diagramm der 349 OTUs (von den ursprünglich 542), die statistisch signifikanten Signale in Bezug auf Geografie, Zeit und Baumarten auf einer Differenzierungsstufe von 30 % relativer ESV-Readhäufigkeit zeigten. Geografie (orange), Zeit (gelb), Baumart (grün). Rechts: Beispiel einer Art mit zeitlichem Signal. Dargestellt sind relative ESV-Frequenzen und Verteilungen für OTU 568\_Diptera. A) ESV-Netzwerk (Median-Joining). B) Karte mit der geografischen Verteilung der zwei ESVs (innerer Kreis, grün = ESV H1, weiß = ESV H2) und Baumarten (äußerer Ring). C) Balkendiagramm der relativen ESV-Readhäufigkeit in Jahren und Dekaden. Quelle: eigene Darstellung, SGN.

Der ESV-Datensatz weist eindeutige Hinweise darauf auf, dass sich bei mehreren Arten (bzw. hier gemessen: OTUs) die innerartliche genetische Diversität über die Zeit hinweg verändert

haben. So wurden auf dem 30 %-Niveau 174 OTUs mit zeitlicher Variabilität identifiziert (**Abbildung 44 links**), in einigen Fällen waren die Unterschiede aber deutlich größer. So war z. B. für eine Art, (Diptera-OTU 568) eine klare ESV-Verschiebung im Laufe der Zeit erkennbar (**Abbildung 44 rechts**). Diese Differenzierung war signifikant, wenn über die analysierten Dekaden integriert wurde. Die entsprechende AMOVA zeigte, dass 14 % der Gesamtvarianz zwischen den Dekaden lag und statistisch signifikant war (**Anhang A.7**). Ob diese Änderungen unter Umständen adaptive Prozesse (Vorteil der neuen Variante unter veränderten Umweltbedingungen, Stephan, 2019) abbilden, oder auf andere Mechanismen zurückzuführen sind, z. B. zunehmende Einwanderung von Individuen dem „neuen“ ESV, müsste mit weiterführenden Studien gezielt geprüft werden.

Ein Beispiel für ein intraspezifisches Baumartensignal zeigt **Abbildung 45** für bei OTU 14\_Acari. Hier erkennt man eindeutig, dass neben der weitverbreiteten ESV 1 welche mit allen Baumarten verbunden ist, die ESVs 3 und 5 ausschließlich auf Fichte vorkommen, und die Buche stark mit den ESVs 2, 4 und 6 assoziiert ist. In diesem Beispiel zeigt sich aber auch die Schwierigkeit die Signale einem einzelnen Differenzierungsfaktor zuzuordnen. Bei OTU 14\_Acari zeigt die AMOVA auch signifikante Differenzierung über Dekaden und geografische Räume auf. Längere Zeitreihen könnten hier klare Muster hervorbringen.

**Abbildung 45: Beispiel einer Art mit zeitlichem, räumlichem und baumartbezogenem ESV-Signal**



Dargestellt sind relative ESV-Frequenzen und -verteilungen für das OTU 14\_Acari. A) Neighbor-Joining-ESV-Netzwerk. B) Karte mit der geografischen Verteilung der ESVs (innerer Kreis) und Baumarten (äußerer Ring). C) Balkendiagramm der relativen ESV-Readhäufigkeit in Jahren und Dekaden. Quelle: eigene Darstellung, SGN.

### Herausforderungen und Ausblick

Eine zentrale Herausforderung des Ansatzes ist die unzureichend entwickelte Referenzdatenbank für viele analysierte Insektengroßgruppen, da den meisten OTUs keine eindeutige Arte und damit verbunden keine ökologischen Traits zugewiesen werden können). Eine zukünftige, wiederholte Analyse der Daten mit den immer vollständiger werdenden Referenzdatenbanken ist allerdings möglich und bringt in diesem Kontext vermutlich zusätzliche Informationen. Des weiteren, ist die räumliche und zeitliche Auflösung im aktuellen Datensatz bei vier Baumarten und unterschiedlichen Laufzeiten der Beprobung relativ gering. Eine länger wählende, jährliche Beprobung aller Baumarten an allen Standorten würde hier Abhilfe schaffen. So würde eine dichtere Zeitreihe und eine bessere räumliche Abdeckung entstehen und wertvolle Informationen im Kontext eines Insektenmonitorings mit integrierten genetischen Daten liefern.

## Datenverfügbarkeit

Alle Daten sind in Krehenwinkel et al. (2022) verfügbar (siehe **Kapitel 5.2.4** und **Tabelle 8**).

## 5.4 *Proof-of-Principle*-Fallstudien zur Veränderung innerartlicher genetischer Diversität und Genexpressionsmuster

### 5.4.1 Populationsgenomische Veränderungen der Aalmutter

#### Können genomische Veränderungen einer Art (Beispiel Aalmutter) durch populationsgenomische Techniken aus den Zeitreihen identifiziert werden?

- ▶ Aalmutterpopulationen zeigen eine deutliche genetische Differenzierung zwischen Nord und Ostsee, das Ergebnis einer rezenten Anpassung an die geringe Salinität der Ostsee.
- ▶ Im Unterscheid zur räumlichen Differenzierung, finden sich nur wenige Signale für evolutionäre Anpassungen über die Zeit, z. B. an den Klimawandel.
- ▶ Bislang haben Aalmutter-Populationen noch keine genetische Vielfalt an den beprobten Standorten verloren.
- ▶ Die Zusammenarbeit mit internationalen Probenbanken kann die räumliche und zeitliche Auflösung von Analysen erheblich verbessern.

| Institution | Habitat | Probentyp | Methode            | # Proben      | Bewertung |
|-------------|---------|-----------|--------------------|---------------|-----------|
| UT          | marin   | Aalmutter | Populationsgenomik | 56 Homogenate | Erfolg    |

#### Motivation der Studie

Global nimmt bei vielen höheren Organismen die genetische Diversität als Folge anthropogener Einflüsse wie Habitatverlust und direkter Nutzung (z. B. Befischung) ab. Für die evolutionäre Anpassungsfähigkeit von Arten an veränderte Umweltbedingungen ist der Erhalt genetischer Diversität entscheidend, doch systematische Langzeitanalysen fehlen bislang weitgehend (Shaw et al., 2025). Umweltbeobachtungsprogramme bieten die Möglichkeit, Trends in der genetischen Vielfalt und populationsgenetische Stresssignale zu erfassen und mit Umweltparametern in Verbindung zu setzen (Benestan et al., 2016; Hendricks et al., 2018), werden jedoch kaum systematisch durchgeführt. Mit dieser Studie sollte geprüft werden, ob mit Biotaprobe der UPB ein systematisches Monitoring der innerartlichen genetischen Diversität möglich ist und ob Populationen mit evolutionärer Anpassung auf Umweltstress reagieren.

In den vergangenen 30 Jahren sind in der Ostseeregion sowohl die Jahresmittelwerte der Wassertemperatur (Meier et al., 2022) als auch die Häufigkeit extremer Temperatur- und Salinitätsereignisse (Dutheil et al., 2023) gestiegen. Genetische Anpassungen an diese veränderten Umweltbedingungen wurden bereits bei kommerziell genutzten Ostseefischarten dokumentiert (Andersson et al., 2023). Zeitreihen, die genetische Veränderungen fast in Echtzeit erfassen, fehlen jedoch bislang weitgehend. Die Aalmutter (*Zoarces viviparus*) gilt aufgrund ihrer ausgeprägten Standorttreue, ihrer viviparen Fortpflanzung und ihrer Empfindlichkeit gegenüber Umweltstressoren (Jacobsson et al., 1986) seit Jahrzehnten als Indikatorart für Umweltstress in Nord- und Ostsee (Hedman et al., 2011). In der Nordsee wird sie seit 1992 und in der Ostsee seit 1994 durchgehend von der UPB gesammelt. Die einzelnen Fische verbreiten sich während ihrer

Lebenszeit nur wenige Kilometer, was durch populationsgenetische Analysen mit Mikrosatellitenmarkern und genetischer Marker belegt wurde (Bergek et al., 2012; Hedman et al., 2011; J. Schmidt, 1918). Eine saisonale Migration konnte nur in vertikaler Richtung in kühleren Tiefen während der Sommermonate festgestellt werden (Jacobsson et al., 1993). Auf größerer räumlicher Skala zeigt sich ein Isolation-by-distance-Muster (Kinitz et al., 2013). Die Standorttreue der einzelnen Fische bedeutet, dass sie dauerhaft allen lokalen Bedingungen, inklusive der dort vorkommenden Stoffe, ausgesetzt sind, die als Stressoren eine genetische Antwort induzieren können (Hedman et al., 2011). Ziel der vorliegenden Studie war es, anhand von Pool-Sequenzierungsdaten der UPB-Zeitreihen (Kapitel 4) populationsgenomische Veränderungen der Aalmutter – räumlich zwischen den Meeresregionen und zeitlich über die UPB-Zeitreihen – zu charakterisieren und mit Umweltparametern in Beziehung zu setzen.

## Methoden

Nach der Generierung eines Referenzgenoms des Fisches (Fuhrmann et al., 2024), wurden die Homogenate der Aalmutter von den Probenahmestelle der UPB in Nord- und Ostsee mittel Illumina Novaseq auf eine Tiefe von jeweils 100 Gigabasen sequenziert. Die Proben der deutschen UPB wurden mit solchen der schwedischen Umweltprobenbank ergänzt, um eine bessere räumliche Abdeckung der Ostsee zu erreichen. Die populationsgenomischen Daten wurden mithilfe der Software *Popoolation* und *Popoolation2* (Kofler, Orozco-terWengel, et al., 2011; Kofler, Pandey, et al., 2011) ausgewertet, die Informationen zur genetischen Vielfalt und genetischen Differenzierung liefern. Es wurden für alle Populationen Informationen zur Salinität, sowie Meerestemperatur zusammengetragen. Mithilfe der Software *Baypass* (Gautier, 2015), wurden Salinität und Temperatur mit genetischer Variation assoziiert um Signaturen evolutionärer Veränderungen zu identifizieren.

## Ergebnisse

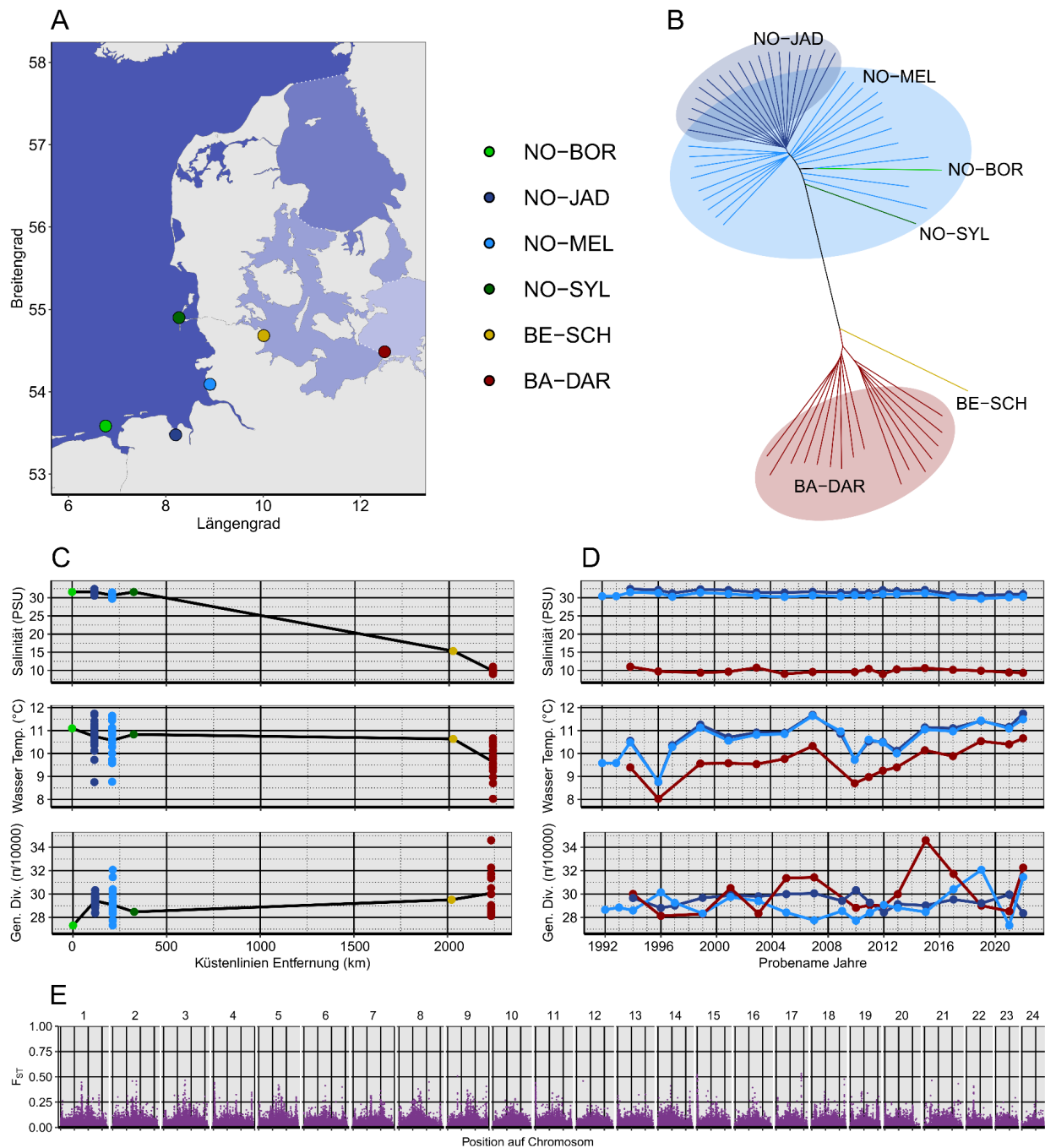
- **Hauptaussage 1:** Über das Verbreitungsgebiet der Aalmutter ist der Genfluss eingeschränkt und regional isolierte Populationen tragen zur hohen genetischen Diversität insgesamt bei.
- **Hauptaussage 2:** Innerhalb der Zeitreihen gibt es keine Signale für eine graduelle genetische Anpassung der Aalmutter an den Klimawandel.

Die Analysen zur genomischen Differenzierung ( $F_{ST}$ ) zeigten eine deutliche geografische Strukturierung: Die Ostseepopulation ist genomisch klar von den Nordseepopulationen differenziert (**Abbildung 44 B**). Auch zwischen den Probenahmestellen in der Nordsee war eine schwache geografische Strukturierung erkennbar, konsistent mit dem bekannten Isolation-by-distance-Muster der Art (Hedman et al., 2011; J. Schmidt, 1918). Der ausgeprägte Salinitätsgradient zwischen Nord- und Ostsee (**Abbildung 44 B**) legt nahe, dass evolutionäre Anpassung zur genomischen Differenzierung beigetragen hat. Unsere Untersuchungen zeigen diverse Genomregionen, die auf eine Salinitätsanpassung zwischen Nord- und Ostsee hinweisen, wie schon bei vielen andere Fischarten beschrieben wurde (z. B. Berg et al., 2015). Interessanterweise finden sich aber kaum Genomregionen, die mit der Klimaerwärmung assoziiert sind, obwohl die Temperatur im Untersuchungszeitraum um ca. 1.5 °C gestiegen ist (**Abbildung 46 D**). Diese Wassertemperaturanstiege überschreiten möglicherweise den thermischen Toleranzbereich der ursprünglich arktisch verbreiteten Aalmutter (Hedman et al., 2011). Dieses Ergebnis erlaubt zwei Interpretationen: Möglicherweise ist der Selektionsdruck durch den Klimawandel noch nicht stark genug, um eine Anpassung notwendig zu machen. Die Tiere könnten sich beispielsweise im Sommer in tiefere Regionen zurückziehen. Alternativ könnte es sein, dass die Art gar nicht in der Lage ist, sich schnell anzupassen, weil ihr die notwendige genetische Variation fehlt. Dann wäre mit Rückgängen der Population zu rechnen,



die sich in einer reduzierten genetischen Vielfalt widerspiegeln. Unsere Ergebnisse zeigen aber, dass die genetische Vielfalt in allen untersuchten Populationen temporär stabil bleibt (**Abbildung 46 D**). Die Ergebnisse lassen sich also eher wie in der ersten Interpretationsmöglichkeit beschrieben, deuten. Die Art kann möglicherweise derzeit den Klimawandel noch überdauern. Möglicherweise reagiert die Aalmutter bislang vor allem über phänotypische Plastizität – etwa die saisonale Tiefenmigration (Jacobsson et al., 1993) – auf steigende Temperaturen, ohne dass eine genetische Adaptation notwendig wäre.

**Abbildung 46: Populationsgenomische Auswertung der Aalmutterzeitreihe**



A) Karte der Nord- und Ostsee mit den farblich markierten Probenahmegebieten. Probenahmegebiete: NO-BOR = Borkum, NO-JAD = Jadebusen & Mellum, NO-MEL = Melderer Bucht, NO-SYL = Sylt, BE-SCH = Schleimündung, BA-DAR = Darsser Ort. B) Darstellung der genetischen Differenzierung als Distanzstammbaum, welcher die Gruppierung der Proben nach Probenahmegebieten (farblich abgegrenzte Äste) zeigt. (C und D) Veränderung der Salinität, der Wassertemperatur und der gesamt-genomischen genetischen Diversität mit der geographischen Entfernung über alle Probenahmegebiete und Zeitpunkte (C), bzw. mit der Zeit innerhalb der drei Zeitreihen (D). E)  $F_{ST}$ -Werte in 5000 Basenpaarabschnitten des Genoms (X-Achse) zwischen den Probenahmegebieten NO-JAD und BA-DAR aus dem Jahr 2022 zeigen Bereiche mit besonders starker Differenzierung, aber keine vollständig angepassten oder neu entstandenen Allele. Quelle: eigene Darstellung, UT.

► **Hauptaussage 3:** Bislang haben Aalmutter-Populationen noch keine genetische Vielfalt an den beprobten Standorten verloren.

- **Hauptaussage 4:** Die Zusammenarbeit mit internationalen Probenbanken kann die räumliche und zeitliche Auflösung von Analysen erheblich verbessern.

Um schnelle genetische Anpassungen an den Klimawandel von phänotypischer Plastizität zu unterscheiden, müssen Allelfrequenzveränderungen über mehrere Generationen und in Korrelation mit Umweltparametern analysiert werden (Gienapp et al., 2008) – wobei einmalige stochastische Schwankungen von gerichteten Anpassungen zu unterscheiden sind (Hairston Jr et al., 2005). Die UPB-Zeitreihenproben der Aalmutter bieten zumindest eine erste Möglichkeit, zeitliche Veränderungen der genomischen Diversität zu erfassen und mit Umweltparametern in Verbindung zu setzen. Die Salinität blieb sowohl an den Nordseestationen als auch am Darsser Ort (Ostsee) über die Zeitreihe stabil (**Abbildung 46 D**) – ein Parameter, der im Untersuchungszeitraum keinen veränderten Selektionsdruck initiiert haben dürfte. Die Wassertemperatur hingegen stieg über die Zeitreihe tendenziell an und überschritt möglicherweise zeitweise den thermischen Toleranzbereich der ursprünglich arktisch verbreiteten Aalmutter (Hedman et al., 2011). In den genomischen Diversitätsdaten zeigten sich jedoch keine gerichteten Veränderungen: Die Werte variierten um einen zeitlich stabilen Mittelwert. Die fehlende Dynamik der Allelhäufigkeiten kann auf stabile Populationsgrößen im Untersuchungszeitraum hinweisen. Möglicherweise reagiert die Aalmutter bislang vor allem über phänotypische Plastizität – etwa die saisonale Tiefenmigration (Jacobsson et al., 1993) – auf steigende Temperaturen, ohne dass bislang eine genetische Adaptation in den untersuchten Zeitreihen nachweisbar ist. Alternativ könnten die bisherigen Temperaturzunahmen noch unterhalb der Stressschwelle der Populationen geblieben sein.

### Herausforderungen

Auch wenn bisher keine Abnahme der Diversität detektiert wurde, lässt sich aus den Ergebnissen nicht schließen, dass Aalmutterpopulationen derzeit ungefährdet sind. Die Aalmutter steht in der Ostsee auf der HELCOM-Vorwarnliste als „*Near Threatened*“ (HELCOM, 2025). In schwedischen Monitoringprogrammen wurden über 20 Jahre erhebliche Bestandsrückgänge dokumentiert. Diese Ergebnisse stehen scheinbar in Widerspruch zu der stabilen genetischen Vielfalt, die in den UPB-Zeitserien detektiert wurden. Simulationsstudien zeigen, dass gängige Bottleneck-Tests bei moderaten Rückgängen in Wirbeltieren häufig selbst bei nachgewiesenen Bestandsrückgängen kein Signal detektieren (Peery et al., 2012). Stabile genomische Diversitätswerte schließen daher einen laufenden Populationsrückgang nicht aus. Veränderungen der Nukleotiddiversität können langsam erfolgen. Daher wurde ebenfalls einen sensitiveren Wett für die genetische Vielfalt erfasst, der deutlich schneller registriert: die Anzahl variabler Positionen im Genom. Auch dieser Wert zeigt keine Rückgänge der genetischen Vielfalt in Aalmutterpopulationen. Die Aalmutter scheint also derzeit noch nicht von starken Bestandseinbrüchen betroffen zu sein. Eine Abwanderung in kältere Gewässerbereiche erklärt daher vermutlich die abnehmenden Fangzahlen der Art.

### Ausblick

Diese Fallstudie zeigt, dass die Biotaprobe der UPB für retrospektive populationsgenomische Analysen der genetischen Vielfalt geeignet sind. Veränderungen der effektiven Populationsgröße – als Frühindikator für Populationsrückgänge – können populationsgenomisch erfasst werden. Ebenso können die Daten für die Analyse von Genen unter Selektion durch veränderte Umweltbedingungen (Temperatur, Nährstoffe, Schadstoffe) zwischen Standorten und Jahren genutzt werden. Damit lassen sich möglicherweise wichtige Einsichten in die Rolle von evolutionärer Anpassung in der Resistenz gegen Umweltstress identifizieren. Stichprobenartige Voruntersuchungen der bereits eingelagerten Proben, sind aber notwendig, um eine genomische Basis zu etablieren. Ebenso sollte sichergestellt werden, dass für alle relevanten Probenarten

Referenzgenome sequenziert und annotiert werden. Für weiterführende Analysen wäre außerdem die systematische Erfassung und Verknüpfung aktueller Umweltparameter zum Zeitpunkt der Probenahme – idealerweise unter Einbindung verschiedener Umweltbeobachtungsprogramme – von besonderem Wert. Diese Studie zeigt den besonderen Wert von internationalen Monitoringprogrammen, die es erlauben, Probenbankdaten in einem sehr breiten geographischen Kontext zu analysieren.

#### Datenverfügbarkeit

Alle Daten sind gemäß der FAIR-Prinzipien in öffentlichen Repositorien verfügbar (siehe **Tabelle 8**).

#### 5.4.2 Transkriptomische Veränderungen der Aalmutter

##### Können transkriptomische Veränderungen einer Art (Beispiel Aalmutter) durch UPB-Zeitreihen identifiziert werden?

- ▶ Aus den Homogenaten konnten differentielle Genantworten in Raum und Zeit abgeleitet werden; diese stellen die Antwort zahlreicher Individuen insgesamt dar.
- ▶ Gene, die auf akuten Hitzestress reagieren, zeigten keine Veränderungen in natürlichen Populationen über die Zeit; das legt nahe, dass Aalmuttern in der Natur noch nicht unter akutem Hitzestress leiden, sondern diesem z. B. durch Abwanderung entgehen können.

| Institution | Habitat | Probentyp | Methode        | # Proben               | Bewertung           |
|-------------|---------|-----------|----------------|------------------------|---------------------|
| UT          | marin   | Aalmutter | Transkriptomik | 69<br>Jahreshomogenate | Teilweise<br>Erfolg |

#### Motivation der Studie

Während populationsgenomische Analysen langfristige Veränderungen in der genetischen Diversität erfassen, ermöglicht die Transkriptomik einen direkten Einblick in aktuelle physiologische Reaktionen der Organismen. Für die Aalmutter wurde daher zusätzlich zur Genomanalyse untersucht, ob sich die Expression hitzestressassoziiierter Gene in den UPB-Proben über die Zeit oder zwischen den Meeresgebieten verändert hat.

#### Methode

Aalmutterproben von acht Zeitpunkten der Probenahmestationen Jadebusen & Mellum, Meldorfer Bucht (Nordsee) und Darsser Ort (Ostsee) wurden ausgewählt. Der Fokus lag dabei auf Genen, die in einem vorangegangenen Hitzestress-Experiment im Labormaßstab mit Aalmuttern aus dem Kattegat in Schweden als differentiell exprimiert identifiziert worden sind (Brasseur et al., eingereicht). Um die Genexpressionsdaten mit dem thermischen Umfeld der Probenahmestationen zu kontextualisieren, wurden die Wassertemperaturen der Standorte von anderen Copernicus-Projekten extrahiert (Nordsee: <https://doi.org/10.48670/moi-00059>; Ostsee: <https://doi.org/10.48670/moi-00013>). Die extrahierte RNA aus den Homogenaten wurde durch Novogene (München, Deutschland) sequenziert.

Für die Analyse wurden zunächst Sequenzieradapter und Sequenzabschnitte mit schlechter Qualität mithilfe von cutadapt (Martin, 2011) entfernt. Anschließend wurde das Programm HISAT2 (Kim et al., 2019) genutzt, um die Reads gegen das Aalmutter-Referenzgenom (siehe **2.4.4**) zu mappen. Eine funktionelle Annotation der Gene auf dem Referenzgenom wurde mit dem Programm eggNOG-mapper (Cantalapiedra et al., 2021) durchgeführt. Die differentielle Expression im Hitzestress-Experiment wurde mit DESeq2 (Love et al., 2014) und limma (Ritchie

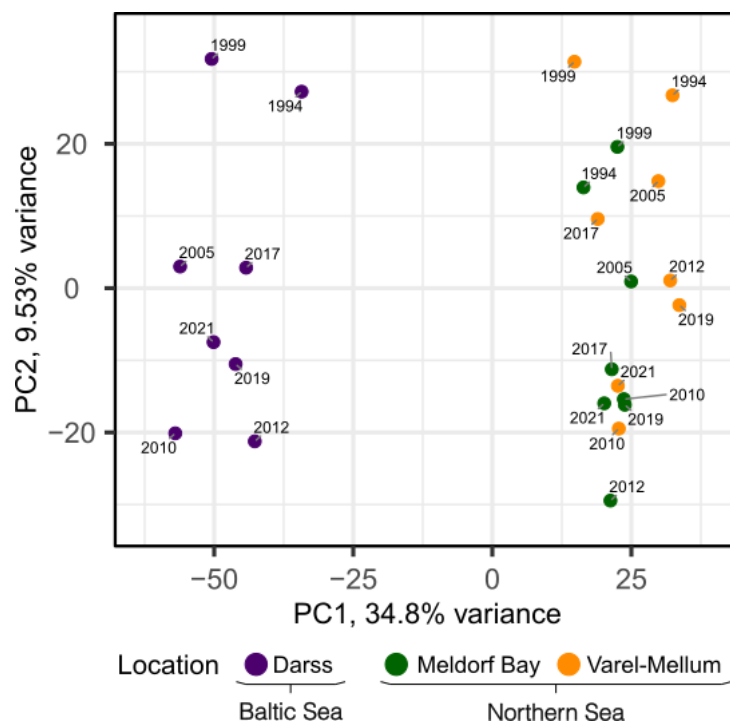
et al., 2015) ausgewertet, um den Referenz-Gensatz für die Zeitreihenanalyse zu definieren. Auch die aus den UPB-Homogenaten sequenzierten Transkripte wurden mit DESeq2 in einen normalisierten Genexpressionswert umgewandelt. Anschließend wurden aus den Genen, die nach DEReport (Pantano, 2025) ein ähnliches Expressionsprofil über die ökologischen Gebiete (Nord- und Ostsee) und Zeiten aufwiesen, Gencluster gebildet. Abschließend wurden die Genexpressionswerte in DESeq2 gegen differenzielle Expression über die Zeit und zwischen den Populationen der Nord- und Ostsee modelliert.

### Ergebnisse

- **Hauptaussage 1:** Aus den Homogenaten konnten differentielle Genantworten in Raum und Zeit abgeleitet werden; diese stellen die Antwort zahlreicher Individuen insgesamt dar.

Die Genexpressiondaten aus UPB-Proben zeigen eine klare Trennung der Genexpressionsprofile in der Nordsee und Ostsee, die vermutlich auf die vorhandene Anpassung an unterschiedliche Salinitäten zurückzuführen ist (**Abbildung 47**). Auch über die Zeit finden sich veränderte Genexpressionsmuster.

**Abbildung 47: Darstellung der räumlichen und zeitlichen Veränderung von Genexpression in der Nordsee und der Ostsee**



Das Diagramm zeigt die Ähnlichkeit der Genexpressionswerte einzelner Aalmutter Proben aus Nord- und Ostsee. Die Nähe zweier Punkte korreliert mit der Ähnlichkeit in der genomweiten Genexpression. Nord- und Ostsee zeigen klar differenzierte Expressionsmuster. Auch über die Zeit lässt sich ein Trend der Expressionsveränderung feststellen.

Quelle: eigene Abbildung, UT.

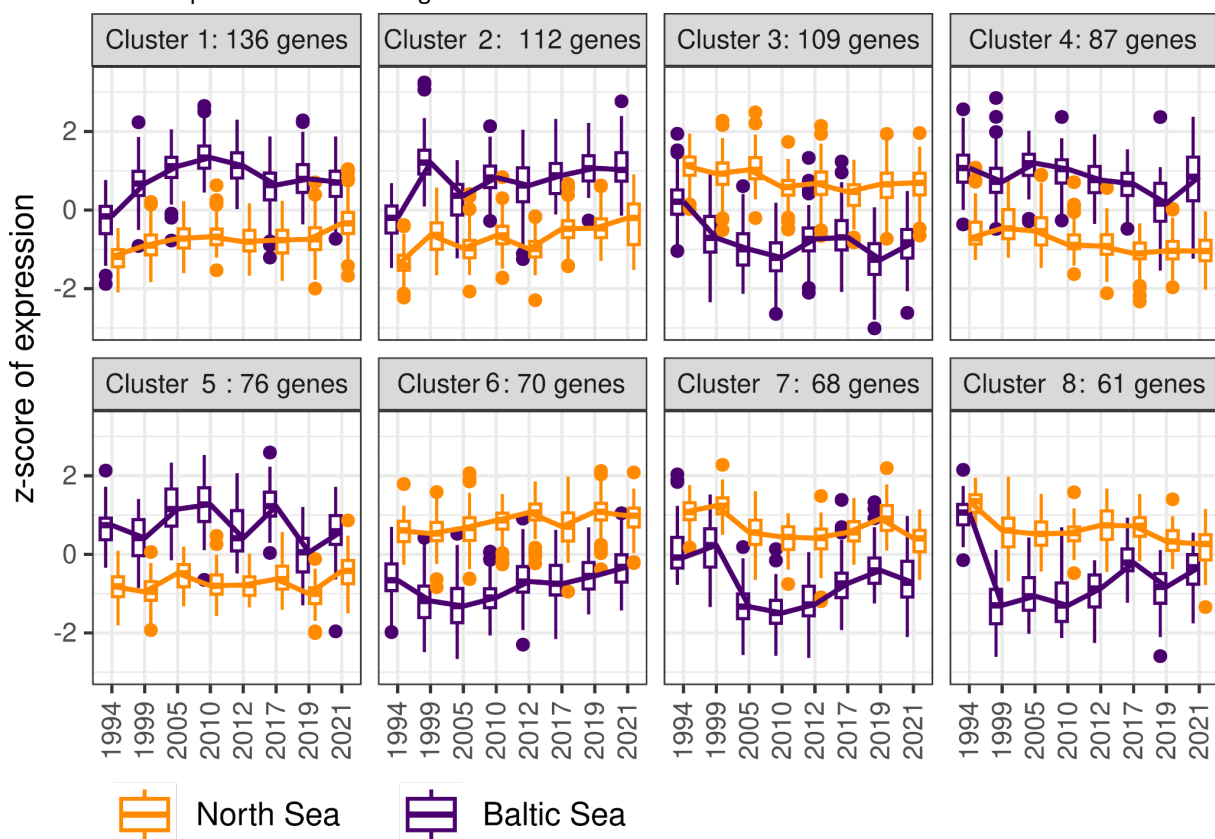
- **Hauptaussage 2:** Gene, die auf akuten Hitzestress reagieren, zeigten keine Veränderungen in natürlichen Populationen über die Zeit; das legt nahe, dass Aalmuttern in der Natur noch nicht unter akutem Hitzestress leiden, sondern diesen z. B. durch Abwanderung entgehen können.

Da sich weder in der genomischen Diversität (**Abschnitt 5.3.2**) noch in der Expression Hitzestress-relevanter Gene zeitliche Anpassungssignale zeigten (**Abbildung 48**), deuten die

Daten darauf hin, dass die Aalmutter bislang vor allem über phänotypische Plastizität – etwa die saisonale Tiefenmigration – auf den Temperaturanstieg reagiert. Alternativ könnten die bisherigen Temperaturzunahmen von 1,5 °C noch unterhalb der Stressschwelle der Populationen geblieben sein. Im Experiment wurde eine deutliche höhere Temperatur gewählt. Außerdem könnte die Genexpressionsantwort auf den Stress, dem die Individuen beim Sammeln ausgesetzt waren, andere Stressmuster überdeckt haben.

**Abbildung 48: Darstellung der zeitlichen Veränderung der Genexpression von hitzestressassoziierten Genen in der Nordsee (North Sea; gelb) und der Ostsee (Baltic Sea; violett)**

Der „z-score of expression“ entspricht der normalisierten Abweichung vom arithmetischen Mittelwert der Anzahl von identifizierten Transkripten je Gen (Genexpression). Die Mediane der z-scores sind durch eine durchgängige Linie verbunden. Die Abbildung zeigt die Expressionsveränderungen von Genen, in natürlichen Populationen über die Zeit, die experimentell als hitzestressassoziiert identifiziert wurden. Keines der Gencluster zeigt klare zeitliche Expressionsveränderungen.



Der „z-score of expression“ entspricht der normalisierten Abweichung vom arithmetischen Mittelwert der Anzahl von identifizierten Transkripten je Gen (Genexpression). Die Mediane der z-scores sind durch eine durchgängige Linie verbunden. Die Abbildung zeigt die Expressionsveränderungen von Genen, in natürlichen Populationen über die Zeit, die experimentell als hitzestressassoziiert identifiziert wurden. Keines der Gencluster zeigt klare zeitliche Expressionsveränderungen. Quelle: eigene Darstellung, UT.

## Herausforderungen und Ausblick

Genexpressionsmuster können sehr schnell und stark durch kurzfristige Umweltbedingungen zum Probenahmezeitpunkt beeinflusst werden. Daher ist eine standardisierte Probenahme entscheidend und Einzelpunktmessungen können hohe Variation zeigen (Tagesbedingungen, physiologischer Zustand der gefangenen Individuen). Weitere Analysen sind für die Erschließung des vollen Potenzials nötig, um belastbare Aussagen zur Wirkung von



Umweltänderungen auf transkriptomische Daten der UPB-Proben zu liefern. Standardisierte Stressexperimente (wie das genutzte Hitzestressexperiment) sind eine notwendige Voraussetzung für die biologische Interpretation zeitlicher Veränderungen. Ein mögliches Problem bei der Interpretation von Genexpressionsdaten der UPB ergibt sich aus dem Stress, dem die Individuen beim Sammeln ausgesetzt waren. Die Aalmuttern werden beispielsweise in Reusen gefangen, bevor sie prozessiert werden. Beim Fang können bereits diverse stressassoziierte Gene ihre Expression ändern, was kurzfristige Stressantworten überdecken kann. Möglicherweise eignen sich die UPB-Daten daher vorwiegend, um Genexpressionsmuster über größere räumliche und zeitliche Skalen zu untersuchen.

### **Ausblick**

Die Analysen dieser *Proof-of-Principle*-Fallstudie zeigen die grundsätzliche Eignung der UPB-Biotaprobe für RNA-Analysen. Transkriptomische Analysen aus UPB-Proben bieten ein einzigartiges Potenzial für die retrospektive Erfassung physiologischer Stressreaktionen. Durch den Abgleich von Genexpressionsprofilen mit Zeitpunkten bekannter Schadstoffeinträge oder Temperaturextreme können kausale Zusammenhänge zwischen Umweltveränderungen und molekularen Reaktionen erschlossen werden. Darüber hinaus können Expressionsmuster biologische Pfade identifizieren, die unter Stress aktiviert oder supprimiert werden – Informationen, die populationsgenomische Daten allein nicht liefern. Dieser Ansatz ist grundsätzlich auch auf andere Indikatorarten der UPB übertragbar, sofern geeignete Referenzexperimente (und -genome) vorliegen. Werden reproduzierbare transkriptomische Stressantworten identifiziert, könnten ausgewählte Gene als molekulare Biomarker in das Standardmonitoring integriert werden – auch um bislang nicht gemessene Stressoren aufzudecken. Eine vielversprechende Weiterentwicklung wäre die Kombination von Transkriptomik und Populationsgenomik an denselben Proben: Genomdaten beschreiben den langfristigen adaptiven Zustand, Transkriptomdaten die aktuelle physiologische Reaktion. Die UPB-Proben sind für einen solchen integrierten Ansatz prädestiniert, da DNA und RNA aus denselben Homogenaten extrahiert werden können. Wichtig ist es aber, die Stressantworten während der Probennahme zu identifizieren, um echten Umweltstress von probenahmeassoziiertem Stress zu diskriminieren.

### **Datenverfügbarkeit**

Alle Sequenzdaten sind gemäß der FAIR-Prinzipien verfügbar:  
<https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/48250038> (siehe **Tabelle 8**).

## 6 Arbeitspaket 5: Effiziente Verwertung der Daten für den Umwelt- und Naturschutz

- Ziel: Vernetzung mit Akteuren des fachlichen und behördlichen Biodiversitäts- und Umweltmonitorings und Einrichtung eines Begleitkreises.

### 6.1 Begleitkreis

Zu Beginn des TrendDNA-Projekts wurde ein Begleitkreis gebildet. Dieser bestand aus 23 Mitgliedern, die insbesondere aus Behörden sowie Ressortforschung und Naturschutz kamen. In einem Auftakttreffen sowie in drei begleitenden Treffen wurden die Zwischenergebnisse präsentiert und Impulse für weitere Analysen aufgegriffen. Beispielsweise ist die integrierte Fallstudie (Junk, Hans, et al., 2025) aus der Empfehlung des Begleitkreises hervorgegangen, die Ergebnisse zur Biodiversität mit ökologischer Modellierung zu kombinieren. Mit dem Begleitkreis wurden die Projektzwischenergebnisse in Form von Präsentationen, Diskussionsrunden und Breakout-Sessions zu spezifischen Fragestellungen in Onlinetreffen diskutiert. Als Basis wurden hierzu jährliche Zwischenberichte vorgelegt. Gemeinsam mit dem Begleitkreis wurde zudem ein Workshop zum Abschluss des Projekts durchgeführt (**Abbildung 49**) in dem die finalen Projektergebnisse vorgestellt, sowie in mehreren parallelen Breakout-Sessions spezifische Fragestellungen zum Wert der UPB für die Umweltbeobachtung eruiert wurden. Am 28.03.2025 wurde intensiv über den Wert der UPB für genetische Untersuchungen diskutiert und Handlungsempfehlungen formuliert. Diese wurden vom Beirat artikuliert und eingebracht. Gemeinsam wurde ein Dokument mit 10 Handlungsempfehlungen erstellt. In diesem Kapitel wird daher fokussiert die identifizierten Verwertungsoptionen aufgezeigt.

**Abbildung 49: Teilnehmende des Workshops zu genetischen Methoden in der Umweltbeobachtung, 26.-28. März 2025 an der Universität Duisburg-Essen.**



Quelle: eigene Darstellung, UDE.

## **10 Handlungsempfehlungen zur Nutzung und Entwicklung der Umweltprobenbank**

1. Die Umweltprobenbank des Bundes organisatorisch und finanziell dazu befähigen, die Umweltproben weiterhin systematisch mit genetischen und digitalen Analysemethoden zu untersuchen, die Entwicklung der biologischen Vielfalt von der Ebene des Ökosystems über die Artenvielfalt bis zur genetischen Variation abzubilden und die Stressantworten einzelner Arten und Prognosen zu unterstützen.
2. Das Portfolio genetischer Analysen vielfältig nutzen und neue Methoden aufnehmen. Neue Indikatoren auf Basis der genetischen Daten für Umweltpolitik und die behördliche Umsetzung entwickeln, die insbesondere auch Aussagen zu funktionellen Wirkungen enthalten.
3. Die genetischen Biodiversitätsdaten der Umweltprobenbank mit weiteren für diese Proben vorliegenden Messdaten (z. B. chemische Belastungen oder biometrische Parameter) und mit den Umweltdaten anderer behördlicher Monitoringprogramme verknüpfen
4. Integration anderer vielfältiger Umweltdaten und Anwendung moderner statistischer sowie datenwissenschaftlicher Anwendungen (inkl. künstliche Intelligenz), um die Plausibilität von Aussagen zu Trends und Treibern zu verbessern.
5. Für bestehende Probetypen kompartimentübergreifende Biodiversitätstrends (z. B. im Kontext von Klimaanpassung) als Bindeglied der vielfach fragmentierten Datensätze unterschiedlicher Zuständigkeitsbereiche (Boden, Meere, Land, Binnengewässer) ableiten.
6. Archivierte Proben für weitere Methoden (z. B. Proteomik, Lipidomik) nutzen, um zu prüfen, ob eine solche Erweiterung sinnvoll ist und um Schnittstellen zu behördlichen Monitoringprogrammen zu schaffen.
7. Gemessene biologische Antwortvariablen erweitern, um neben den klassischen Indikatorarten bislang vernachlässigte taxonomische Gruppen in die Umweltbeobachtung zu integrieren (z. B. viele funktionell wichtige wirbellose Arten, Protisten und Prokaryoten, Veränderungen von Lebensgemeinschaften insgesamt).
8. Indikatoren entwickeln, die über die Ökosystemgesundheit hinaus auch die menschliche Gesundheit betreffen (One Health), beispielsweise antimikrobielle und Fungizid-Resistenzen sowie Pathogene.
9. Gemäß den FAIR-Prinzipien die digitale Infrastruktur zur Datenhaltung, Bewertung und Visualisierung über Umweltprobenbank.de und umwelt.info für behördliche Zwecke, Forschung und zur Information der Öffentlichkeit stärken und weiterentwickeln. Künftige Synergieoptionen mit weiteren Plattformen (z. B. Portal des Monitoringzentrums, Lebendiger Atlas der Natur Deutschlands, Global Biodiversity Information Facility (GBIF)) prüfen.
10. Unterstützung der standardisierten Datenerhebung und Analyse zur biologischen Vielfalt, der Qualitätssicherung der Messung, der Entwicklung integrierter Bewertungsansätze sowie der digitalen Transformation der Umweltbeobachtung.

## 6.2 Verwertungsoptionen

Ein wichtiger Aspekt in AP 6 war die Identifizierung von möglichen Verwertungsoptionen der genetischen Daten für andere Zwecke. Neue genetische Methoden ermöglichen der UPB-Daten zum Zustand und zur Veränderung der Biodiversität in nie dagewesener zeitlicher Auflösung zu erheben, von der genetischen Variation in Populationen bis zu Veränderungen ganzer Ökosysteme. Die generierten Daten helfen wichtige historische Lücken zu schließen und weisen über die Aussagekraft einzelner Indikatorarten hinaus. Aufgrund ihrer leichten und schnellen Verfügbarkeit bieten sie Entscheidungsträgern auf allen Ebenen wertvolle neue Informationen für eine Prozesssteuerung, die resiliente Ökosysteme anstrebt und auf eine sich schnell verändernde Umwelt reagieren muss. Die Schlussfolgerungen eignen sich zudem für Ziel-Allianzen, die über die Doppelnutzung von Indikatoren hinausweisen und der Komplexität der anthropogen verursachten Veränderungen besser gerecht werden.

### Fünf Beispiele wichtiger Verwertungsoptionen der Daten der Umweltprobenbank

Folgende fünf Beispiele für Verwertungen wurden für die Projektdaten identifiziert:

- ▶ 1. Allgemeines Vorsorgeprinzip und frühzeitige Gefahrenabwehr, Schutz des Naturhaushalts.
- ▶ 2. Umweltgesetze: Wasserrahmenrichtlinie, Meeresstrategierahmenrichtlinie und regionale Meeresschutzkonventionen, neue Bodenschutzgesetze.
- ▶ 3. Naturschutz: FFH-Richtlinie, EU-Verordnung über invasive Arten, Verordnung zur Wiederherstellung der Natur.
- ▶ 4. Verknüpfung mit der Schadstoffbewertung und den europäischen Zielen zur Nullverschmutzung (Zero Pollution Ambition).
- ▶ 5. Strategien zur Klimaanpassung, Schutz der Biodiversität sowie integrierte Betrachtung der menschlichen und Ökosystemgesundheit (*One Health*), Nationale Wasserstrategie.

## 6.3 Herausforderung und offene Fragen

Das TrendDNA-Projektteam, Workshopteilnehmende und der Projektbeirat haben folgende methodische, konzeptionelle und strukturelle Empfehlungen identifiziert, um die Verwertung der Proben und Daten der UPB für das Biodiversitätsmonitoring und darüber hinaus gehende Fragen zur Gesundheit der Ökosysteme weiter ausbauen zu können.

### 6.3.1 Methodische Aspekte

- ▶ Metagenomik- und Metabarcoding-Methoden sollten systematisch verglichen werden, um den probentypspezifischen Mehrwert zu bestimmen.
- ▶ Für die Flüsse werden aktuell monatlich Schwebstoffproben genommen und mit DNA-Methoden untersucht. Analysen der eDNA aus Wasserproben liefern komplementäre Ergebnisse und werden daher als weiterer Probentyp empfohlen.
- ▶ Es sollte geprüft werden, ob die Verwendung aktiver Sammler wie Miesmuscheln für die Beobachtung der biologischen Vielfalt der Küsten durch DNA von Wasser- oder Sedimentproben ergänzt werden sollte.
- ▶ Neben der Artenvielfalt sollte auch funktionelle Diversität der untersuchten Ökosysteme und ihrer Artengemeinschaften mit den entwickelten Metabarcoding-, Metagenomik- und

Transkriptomik-Verfahren – aber auch mit weiteren Omics-Methoden wie Epigenomik, Proteomik und Lipidomik – eingehender erforscht werden.

### 6.3.2 Konzeptionelle Aspekte

- ▶ Für ein grundlegendes Verständnis der Entwicklung der Bodengesundheit fehlt noch viel Wissen. Bislang ist lediglich ein Teil der Proben der Umweltprobenbank untersucht und auch methodisch haben die Proben noch viel Potenzial. Weitere Daten, insbesondere zu Bodenparametern wie Kohlenstoff und anorganischen Parameter, sind ebenfalls wichtig, um die sich entwickelnden Bodenmonitoring-Programme zu beraten.
- ▶ Fragestellungen zur Gesundheit der Ökosysteme sollen mit Fragen zur menschlichen Gesundheit, beispielsweise über antimikrobielle Resistenzgene und Pathogene, aber auch über Ökosystemleistungen verknüpft werden (*One Health*).
- ▶ Bislang wurden lediglich Teile des Datensatzes für Auswertungen mit vergleichsweise einfachen statistischen Methoden genutzt. Für umfassende Datenanalysen, plausible Trendableitungen und die Untersuchung des Einflusses verschiedener Umweltfaktoren sind umfassendere umweltstatistische Analysen erforderlich, die mit Verfahren der künstlichen Intelligenz (KI) unterstützt werden sollten.

### 6.3.3 Strukturelle Aspekte

- ▶ Es ist erforderlich, die Messstellen und Daten der Umweltprobenbank in bestehende und sich entwickelnde behördliche Monitoringprogramme zu integrieren, um die ausgewählten historischen Trends systematisch mit Programmen für die flächenrepräsentative Abdeckung zu verknüpfen.
- ▶ Umgekehrt ist die Integration weiterer Proben, idealerweise Rückstellproben flächenrepräsentativer Programme der behördlichen Umweltbeobachtung, für ausgewählte Zeitpunkte in die Umweltprobenbank wichtig, um die lokal begrenzten Proben der Probenbank in einen breiteren räumlichen Kontext zu stellen.
- ▶ Referenzdatenbanken für hyperdiverse Taxa wie Bakterien, Protisten und Pilze müssen weiter verbessert und nach FAIR-Prinzipien nutzbar gemacht werden.
- ▶ Die Integration von Daten zur Biodiversität und anderer Umweltdaten der Umweltprobenbank sollte systematisiert und die Daten zusammengeführt werden.
- ▶ Digitale Werkzeuge, insbesondere FAIR-konforme Datenbanken und Arbeitsabläufe müssen etabliert werden.
- ▶ Es wäre wünschenswert, wenn die bisher von einem Standort gepoolten Proben der Umweltprobenbank separat eingelagert werden könnten, damit man diese später getrennt analysieren kann. Durch das Poolen von Proben (vor der Analyse) beraubt man sich wichtiger Informationen bezüglich der Variabilität der Proben. Die Kenntnis dieser Variabilität ist erforderlich, um zeitliche Trendanalysen valider zu machen.



## 7 Arbeitspaket 6: Information der allgemeinen und Fachöffentlichkeit

Eine zentrale Leistung im Projekt TrendDNA war die kontinuierliche Information sowohl der allgemeinen Öffentlichkeit als auch der Fachöffentlichkeit über die Biodiversitätsforschung mit Daten der Umweltprobenbank (UPB). Hierfür wurde im Konsortium frühzeitig eine gezielte Kommunikationsstrategie entwickelt und umgesetzt.

Die Information der Öffentlichkeit und der Praxisakteure nahm dabei eine besonders wichtige Rolle ein. Ergebnisse des Projekts wurden in vielfältigen Formaten allgemeinverständlich aufbereitet und präsentiert. Dazu gehörten Ausstellungen zur Biodiversitätsforschung (z. B. am City Campus Trier), Beiträge bei Großveranstaltungen wie dem 50-jährigen Jubiläum des Umweltbundesamtes in Dessau-Roßlau sowie interaktive Formate wie Science Slams, Kinder-Universität und Girls' Day. Auch Führungen und Vorträge im Rahmen von Besuchen politischer Entscheidungsträger und wissenschaftlicher Gremien – darunter der rheinland-pfälzische Wissenschaftsminister sowie der wissenschaftliche Beirat der Universität Trier – trugen zur Sichtbarkeit des Projekts bei. Darüber hinaus wurden internationale Delegationen, unter anderem aus Südafrika und Südkorea, an der UPB empfangen, woraus bereits erste wissenschaftliche Kooperationen und Publikationen hervorgegangen sind (Hans et al. 2025).

Zur kontinuierlichen Information der Öffentlichkeit wurde zudem die Projektwebseite ([trenddna.de](http://trenddna.de)) als zentrale Plattform genutzt. Ergänzend wurden Inhalte über Social-Media-Kanäle verbreitet, insbesondere über Twitter (bis 2024) sowie perspektivisch über alternative Plattformen wie Bluesky. Die Einbindung des wissenschaftlichen Nachwuchses in diese Formate war ein wesentliches Element, wodurch Forschungsergebnisse breit vermittelt und zugleich praxisnahe Kompetenzen gefördert wurden.

Die im Projekt involvierten Nachwuchsforschenden haben zudem gemeinsam einen populärwissenschaftlichen Artikel für das Journal BioSpektrum verfasst (**Anhang A.8**), der derzeit in Begutachtung ist. Der Artikel trägt den Titel „Die Umweltprobenbank – eine Schatzkammer für die Biodiversitätsforschung“. In dieser Arbeit wird die Öffentlichkeit allgemeinverständlich über die zentralen Ergebnisse des TrendDNA-Projektes und den großen Wert der UPB für die Biodiversitätsforschung informiert.

Die Fachöffentlichkeit aus Forschung und Praxis wurde insbesondere über wissenschaftliche Publikationen sowie durch eine intensive Vortragstätigkeit adressiert. Im Projektverlauf wurden bereits 9 Publikationen in begutachteten Fachzeitschriften veröffentlicht, weitere 6 Manuskripte befinden sich aktuell in Revision oder Vorbereitung, und zusätzliche Veröffentlichungen sind in Planung. Darüber hinaus wurden Projekteinhalte in zahlreichen Konferenzbeiträgen präsentiert. Insgesamt umfasst die Vortragstätigkeit mehr als 80 Beiträge (Vorträge und Poster), darunter über 30 eingeladene Vorträge sowie mehrere Plenarvorträge auf internationalen Konferenzen. Die Präsentationen fanden in mehr als 15 Ländern statt und spiegeln die hohe internationale Sichtbarkeit des Projekts wider.

Zentrale Beiträge wurden von verschiedenen Projektmitgliedern geleistet: Henrik Krehenwinkel präsentierte die methodischen Grundlagen und das Konzept genetischer Biodiversitätsanalysen in zahlreichen eingeladenen Vorträgen und Workshops weltweit sowie in mehreren Plenarvorträgen. Florian Leese trug mit hochrangigen Keynote- und Plenarvorträgen, unter anderem bei internationalen eDNA-Konferenzen in Japan und China sowie bei der SIL-Jahrestagung in Spanien, maßgeblich zur internationalen Vernetzung bei. Isabelle Junk stellte insbesondere das Potenzial archivierter Umweltproben für marine Langzeitstudien auf internationalen Fachkonferenzen vor. Julian Hans präsentierte Arbeiten zu terrestrischen und



aquatischen Zeitreihen u. a. auf SETAC-Tagungen und beim EMBO-Workshop. Judith Paetsch trug ihre Ergebnisse zur Shotgun-Metagenomik von Bodenorganismen auf internationalen Fachveranstaltungen wie der Global Soil Biodiversity Initiative vor. Robin Schütz präsentierte das Projekt wiederholt auf internationalen Konferenzen und Workshops mit Fokus auf Biodiversitätstrends in Fließgewässern.

Zusätzlich wurden Praxispartner gezielt über Beiratstreffen sowie Workshops (z. B. DACHLiLux-Tagung und TrendDNA-Abschlussworkshop im März 2025) eingebunden. Die Kombination aus breiter Öffentlichkeitsarbeit, intensiver wissenschaftlicher Dissemination und aktiver Einbindung von Stakeholdern stellt eine wesentliche Stärke des Projekts dar und hat maßgeblich zur Sichtbarkeit und Wirkung von TrendDNA beigetragen.

**Abbildung 50: Die TrendDNA-Webseite als zentrale Informationsseite zu dem Projekt; verfügbar auf Deutsch und Englisch**



Quelle: TrendDNA.de

## 8 Nachwuchsförderung

Die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses war von Beginn an ein zentraler Bestandteil des Projekts. Ein Großteil der Teilprojekte und Fallstudien wurde gezielt von Nachwuchsforschenden umgesetzt – vom Bachelor- bis zum Postdoc-Niveau (Koordinator Nico Fuhrmann, María Blazquez). Dadurch konnten innovative Fragestellungen direkt in Qualifizierungsarbeiten integriert und gleichzeitig methodische Entwicklungen im Bereich eDNA und Metabarcoding vorangetrieben werden.

Exemplarisch hervorheben möchten wir die Masterarbeit von Judith Paetsch, die mittels Shotgun-Metagenomik langfristige Biodiversitätsdynamiken untersuchte (Fallstudie 2, SGN und UT), sowie die Promotionsprojekte von Robin Schütz (Fallstudie 1) und Isabelle Junk (Fallstudien 3, 4), die zentrale Beiträge zur Analyse von Biodiversitätstrends in Fließgewässern bzw. zur Nutzung der UPB für retrospektives Monitoring geleistet haben. Darüber hinaus hat ein TrendDNA-Nachwuchsteam (Isabelle Junk, Robin Schütz, Julian Hans, Koordinator Nico Fuhrmann und Lina Frank) einen gemeinsamen Übersichtsartikel für die Fachzeitschrift Biospektrum erstellt und eingereicht.

Die Nachwuchswissenschaftler\*innen konnten ihre Ergebnisse auf zahlreichen nationalen und internationalen Tagungen präsentieren und gewannen wertvolle Einblicke an der Schnittstelle zwischen Forschung und behördlicher Umweltüberwachung. **Tabelle 7** liefert eine Übersicht.

**Tabelle 7: Übersicht über die im TrendDNA-Projekt durchgeführte Abschlussarbeiten**

| Name             | Arbeit | Titel                                                                                                                                         | Jahr | Institut |
|------------------|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------|
| Anja Melcher     | MSc.   | A comparative eDNA metabarcoding analysis: Changes of tree canopy associated insect and bacterial communities in the past 30 years in Germany | 2021 | UT       |
| Adrienne Opala   | BSc.   | Optimierung sequenzbasierter Mikrobiomanalyse-Methoden an Proben der Umweltprobenbank des Bundes                                              | 2021 | UT       |
| Giannis Raubuch  | BSc.   | Vergleich zweier Methoden zur Erfassung von Arthropoden                                                                                       | 2021 | UT       |
| Rieke Broekmann  | MSc.   | Environmental DNA: introducing a non-invasive approach of long-term arthropod monitoring                                                      | 2022 | UT       |
| Nina Schmidt     | BSc.   | The promise of <i>Mytilus edulis</i> as a natural DNA sampler                                                                                 | 2022 | UT       |
| Alice Schumacher | MSc.   | The potential of time series of bladder wrack for molecular biodiversity monitoring of marine bacterial and metazoan communities              | 2022 | UT       |
| Lukas Brink      | MSc.   | Development of an eDNA metabarcoding protocol to monitor <i>Fucus vesiculosus</i> associated metazoan communities                             | 2023 | UT       |

|                   |      |                                                                                                                                |      |          |
|-------------------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------|
| Katharina Giese   | MSc. | Analysis of fungal biodiversity and pesticide content in leaf samples of the German Environmental Specimen Bank                | 2023 | UT       |
| Adrienne Opala    | MSc. | Test of the Utility of Earthworms as Natural eDNA Samplers for Soil Biodiversity                                               | 2023 | UT       |
| Judith Paetsch    | MSc. | Shotgun metagenomics reveals decade-scale spatio-temporal dynamics of entire soil communities: microbes and soil invertebrates | 2023 | UT & SGN |
| Lennart Backes    | MSc. | Effect of different drying methods on the detection of arthropod eDNA from plant material                                      | 2024 | UT       |
| Elisabeth Gold    | BSc. | Functional and taxonomic time series analysis of beech and spruce associated foliar fungal communities                         | 2024 | UT       |
| Anja Locker       | MSc. | Utility of environmental RNA for gene expression analyses under heat stress in marine fish                                     | 2024 | UT       |
| Nina Marschel     | BSc. | Was eDNA uns vorenthält – vergleichendes eDNA und eRNA Metabarcoding einer Miesmuschelzeitserie der Umweltprobenbank           | 2024 | UT       |
| Caro Schubert     | BSc. | Exploring fungal community trends: A comparative time-series analysis of beech and spruce leaf samples from the German ESB     | 2024 | UT       |
| Anne Walger       | BEd. | Studie blattassoziierter endophytischer Pilzgemeinschaften von <i>Fagus sylvatica</i> bei Trockenstress                        | 2024 | UT       |
| Julia Landscheid  | MSc. | Testing the utility of leaf derived eDNA from the German Environmental Specimen Bank for monitoring vertebrate communities     | 2025 | UT       |
| Niklas Richter    | MSc. | Test for quantitative extraction bias in metabarcoding – Tracing the invasion of the freshwater mussel genus <i>Dreissena</i>  | 2025 | UT       |
| Anna Lena Schie   | MSc. | Molekulargenetische Analyse des Regenwurms <i>Lumbricus terrestris</i>                                                         | 2025 | UT       |
| Anneke Junker     | MSc. | Species distribution of <i>Mytilus</i> spp. along the Darss Sill based on genome-wide patterns                                 | 2025 | UT       |
| Ann-Christin Lenz | BSc. | Bewertung des Potenzials von Schwebstoff-Metabarcoding für das Monitoring der Fischdiversität des Rheins                       | 2022 | UDE      |

|                   |      |                                                                                                                                                                                     |      |     |
|-------------------|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|
| Ann-Christin Lenz | MSc. | Analysen zur bakteriellen Diversität in den deutschen Flussgebieten mit Schwebstoffproben der Umweltprobenbank; Abschluss Juli 2026                                                 | 2026 | UDE |
| Robin Schütz      | PhD  | Analyse von Biodiversitätstrends in Flüssen basierend auf Umwelt-DNA aus Schwebstoffproben der Umweltprobenbank                                                                     | 2026 | UDE |
| Isabelle Junk     | PhD  | Exploring the potential of the German Environmental Specimen Bank for retrospective molecular biodiversity monitoring                                                               | 2025 | UT  |
| Julian Hans       | PhD  | Biodiversity in a bottle - metabarcoding environmental samples from long-term monitoring archives for retrospective assessment of changes in biotic communities in the Anthropocene | 2025 | UT  |

## 9 Übersicht über produzierte genetische Datensätze

**Tabelle 8: Übersicht über die Verfügbarkeit der im TrendDNA-Projekt generierten Daten in internationalen Repositorien gemäß der FAIR-Prinzipien**

| Datensatz                                             | Inhalt                                                                                                                                                                                                              | Accession-Number / Link                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Schwebstoffproben (Fallstudie 1)                      | 2405 demultiplizierte Datensätze aller drei genetischer Marker (16S, COI und 12S), geordnet nach Standort, Jahr (2005-2021), Replikate, Negativkontrollen (NC). 215 Gigabyte                                        | European Nucleotide Archive: PRJEB111031<br><a href="https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB111031">https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB111031</a><br>Weitere Informationen zum Datensatz auf dem Europäischen ZENODO Server: 10.5281/zenodo.19444123   |
| Bodenproben (Fallstudie 2)                            | 116 Bodenmetagenome                                                                                                                                                                                                 | European Nucleotide Archive: PRJNA1276286<br><a href="https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJNA1276286">https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJNA1276286</a>                                                                                                   |
| Miesmuschelsammler (Fallstudie 3)                     | 18S und COI-Daten, 1,2 Gigabyte                                                                                                                                                                                     | Data Dryad:<br><a href="https://doi.org/10.5061/dryad.tb2rbp067">https://doi.org/10.5061/dryad.tb2rbp067</a>                                                                                                                                                         |
| Integrative eDNA-Fallstudie (Fallstudien 4-7)         | Blattproben ITS, COI, 16S; Dreikantmuschel 16S, 18S, Miesmuschel 16S, 18S, Blasentang 16S, 18S; 55 Gigabyte                                                                                                         | European Nucleotide Archive: <a href="https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB88877">https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB88877</a><br>Science Data Bank: <a href="https://doi.org/10.57760/sciencedb.13553">https://doi.org/10.57760/sciencedb.13553</a> |
| Vergleich UPB Deutschland und Südkorea (Fallstudie 6) | 2,9 Gigabyte der Sequenzdaten (COI, ITS) aus der deutschen und südkoreanischen Umweltprobenbank                                                                                                                     | Science Data Bank: <a href="https://doi.org/10.57760/sciencedb.15787">https://doi.org/10.57760/sciencedb.15787</a>                                                                                                                                                   |
| Aalmutter Populationsgenomikdaten (Fallstudie 8)      | 3,4 Terabyte whole-genome-sequencing-Daten der dänischen, schwedischen und deutschen Umweltprobenbank; 94 Aalmutter Gewebemischproben aus Zeitserien von 6 Standorten und einzelne Zeitpunkte von weiteren Gebieten | National Center for Biotechnology Information: PRJNA1068064<br><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA1068064">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA1068064</a>                                                                   |
| Aalmutter Transkriptomdaten (Fallstudie 9)            | 549 Gbp RNA-Sequenzierungsdaten der deutschen Umweltprobenbank; 24 Aalmutter Gewebemischproben aus Zeitserien von 3 Standorten                                                                                      | National Center for Biotechnology Information: PRJNA1068064<br><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA1068064">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA1068064</a>                                                                   |
| Kontaminationsstudie                                  | 231 Megabyte Sequenzierdaten (COI) von 19 Oberflächen der UPB zu je drei Zeitpunkten                                                                                                                                | European Nucleotide Archive: PRJEB108139                                                                                                                                                                                                                             |
| Miesmuschel Hybridisierungstest                       | 1 Terabyte whole-genome-sequencing-Daten der UPB                                                                                                                                                                    | European Nucleotide Archive: PRJEB108140                                                                                                                                                                                                                             |
| Regenwurm Genomsequenzierung (SGN)                    | 1,5 Tbp Pac Bio HiFi Daten aus 2 SMRT Zellen                                                                                                                                                                        | European Nucleotide Archive: <a href="https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB101856">https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB101856</a>                                                                                                                     |

## 10 Bibliographie

- Akbarzadeh, A., Günther, O. P., Houde, A. L., Li, S., Ming, T. J., Jeffries, K. M., Hinch, S. G., & Miller, K. M. (2018). Developing specific molecular biomarkers for thermal stress in salmonids. *BMC Genomics*, 19, 749. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5108-9>
- Altermatt, F., Couton, M., Carraro, L., Keck, F., Lawson-Handley, L., Leese, F., Zhang, X., Zhang, Y., & Blackman, R. C. (2025). Utilizing aquatic environmental DNA to address global biodiversity targets. *Nature Reviews Biodiversity*, 1. <https://doi.org/10.1038/s44358-025-00044-x>
- Andersson, L., André, C., Johannesson, K., & Pettersson, M. (2023). Ecological adaptation in cod and herring and possible consequences of future climate change in the Baltic Sea. *Frontiers in Marine Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1101855>
- Anthony, M. A., Bender, S. F., & van der Heijden, M. G. A. (2023). Enumerating soil biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120, e2304663120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2304663120>
- Arthington, A. H., Naiman, R. J., McClain, M. E., & Nilsson, C. (2010). Preserving the biodiversity and ecological services of rivers: New challenges and research opportunities. *Freshwater Biology*, 55(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02340.x>
- Bálint, M., Nowak, C., Márton, O., Pauls, S. U., Wittwer, C., Aramayo, J. L., Schulze, A., Chambert, T., Cocchiararo, B., & Jansen, M. (2018). Accuracy, limitations and cost efficiency of eDNA-based community survey in tropical frogs. *Molecular Ecology Resources*, 18, 1415–1426. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12934>
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Baselga, A. (2013). Separating the two components of abundance-based dissimilarity: Balanced changes in abundance vs. abundance gradients. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 552–557. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12029>
- Benestan, L. M., Ferchaud, A.-L., Hohenlohe, P. A., Garner, B. A., Naylor, G. J. P., Baums, I. B., Schwartz, M. K., Kelley, J. L., & Luikart, G. (2016). Conservation genomics of natural and managed populations: Building a conceptual and practical framework. *Molecular Ecology*, 25, 2967–2977. <https://doi.org/10.1111/mec.13647>
- Beng, K. C., & Corlett, R. T. (2020). Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: Opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation*, 29, 2089–2121. <https://doi.org/10.1007/s10531-020-01980-0>
- Berg, P. R., Jentoft, S., Star, B., Ring, K. H., Knutsen, H., Lien, S., Jakobsen, K. S., & André, C. (2015). Adaptation to low salinity promotes genomic divergence in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Genome Biology and Evolution*, 7, 1644–1663. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv093>



- Bergek, S., Ma, Q., Vetemaa, M., Franzén, F., & Appelberg, M. (2012). From individuals to populations: Impacts of environmental pollution on natural eelpout populations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.01.019>
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Birk, S., Bonne, W., Borja, A., Brucet, S., Courrat, A., Poikane, S., Solimini, A., van de Bund, W., Zampoukas, N., & Hering, D. (2012). Three hundred ways to assess Europe's surface waters: An almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators*, 18, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.10.009>
- Blowes, S. A., McGill, B., Brambilla, V., Chow, C. F. Y., Engel, T., Fontrodona-Eslava, A., Martins, I. S., McGlinn, D., Moyes, F., Sagouis, A., Shimadzu, H., van Klink, R., Xu, W.-B., Gotelli, N. J., Magurran, A., Dornelas, M., & Chase, J. M. (2024). Synthesis reveals approximately balanced biotic differentiation and homogenization. *Science Advances*, 10, eadj9395. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adj9395>
- Blowes, S. A., Supp, S. R., Antão, L. H., Bates, A., Bruelheide, H., Chase, J. M., Moyes, F., Magurran, A., McGill, B., Myers-Smith, I. H., Winter, M., Bjorkman, A. D., Bowler, D. E., Byrnes, J. E. K., Gonzalez, A., Hines, J., Isbell, F., Jones, H. P., Navarro, L. M., ... Dornelas, M. (2019). The geography of biodiversity change in marine and terrestrial assemblages. *Science*, 366, 339–345. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1620>
- BMEL (2024). *Ergebnisse der Waldzustandserhebung 2023*. [https://www.bmleh.de/SharedDocs/Downloads/DE/Broschueren/waldzustandserhebung-2023.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=9](https://www.bmleh.de/SharedDocs/Downloads/DE/Broschueren/waldzustandserhebung-2023.pdf?__blob=publicationFile&v=9)
- BMUV/UBA (2022). *Die Wasserrahmenrichtlinie – Gewässer in Deutschland 2021. Fortschritte und Herausforderungen*. Bonn, Dessau. [https://www.umweltbundesamt.de/system/files/medien/1410/publikationen/221010\\_uba\\_fb\\_wasserrichtlinie\\_bf.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/system/files/medien/1410/publikationen/221010_uba_fb_wasserrichtlinie_bf.pdf)
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: The evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34, 100622. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>
- Buchner, D., & Leese, F. (2020). BOLDigger – a Python package to identify and organise sequences with the Barcode of Life Data systems. *Metabarcoding and Metagenomics*, 4, e53535. <https://doi.org/10.3897/mbmg.4.53535>
- Buchner, D., Macher, T.-H., Beermann, A. J., Werner, M.-T., & Leese, F. (2021). Standardized high-throughput biomonitoring using DNA metabarcoding: Strategies for the adoption of automated liquid handlers. *Environmental Science and Ecotechnology*, 8, 100122. <https://doi.org/10.1016/j.es.2021.100122>
- Buchner, D., Sinclair, J. S., Ayasse, M., Beermann, A. J., Buse, J., Dziok, F., Enss, J., Frenzel, M., Hörrén, T., Li, Y., Monaghan, M. T., Morkel, C., Müller, J., Pauls, S. U., Richter, R., Scharnweber, T., Sorg, M., Stoll, S., Twietmeyer, S., ... Leese, F. (2025). Upscaling biodiversity

- monitoring: Metabarcoding estimates 31,846 insect species from Malaise traps across Germany. *Molecular Ecology Resources*, e14023, e14023. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.14023>
- Freyhof, J., Bowler, D., Broghammer, T., Friedrichs-Manthey, M., Heinze, S. und Wolter, C. (2023). *Rote Liste und Gesamtartenliste der sich im Süßwasser reproduzierenden Fische und Neunaugen (Pisces et Cyclostomata) Deutschlands*. BfN-Schriftenvertrieb im Landwirtschaftsverlag. <https://doi.org/10.19213/972176>
- Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., & Huerta-Cepas, J. (2021). eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 5825–5829. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab293>
- Choi, S.-W., An, J.-S., Kim, N.-H., Lee, S., & Ahn, N. (2019). Long-term (2005–2017) macromoth community monitoring at Mt. Jirisan National Park, South Korea. *Ecological Research*, 34, 443–443. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12021>
- Clark, R. D., Reid, B. N., Garcia, E., Malabag, M., Waples, R. S., Abesamis, R. A., Baldesimo, J. G. P., Bucol, A. A., Fitz, K. S., Magnuson, S. F., Muallil, R. N., Nanola, C. L., Roberts, R., Whalen, J. C., Bird, C. E., Carpenter, K. E., & Pinsky, M. L. (2025). Anthropocene genetic diversity loss in the marine tropics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 122, e2513012122. (world). <https://doi.org/10.1073/pnas.2513012122>
- Cochrane, G., Karsch-Mizrachi, I., Nakamura, Y., & on behalf of the International Nucleotide Sequence Database Collaboration. (2011). The International Nucleotide Sequence Database Collaboration. *Nucleic Acids Research*, 39, D15–D18. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1150>
- Collins, G., Schneider, C., Boštjančić, L. L., Burkhardt, U., Christian, A., Decker, P., Ebersberger, I., Hohberg, K., Lecompte, O., Merges, D., Muelbaier, H., Romahn, J., Römbke, J., Rutz, C., Schmelz, R., Schmidt, A., Theissinger, K., Veres, R., Lehmitz, R., ... Bálint, M. (2023). The MetalInvert soil invertebrate genome resource provides insights into below-ground biodiversity and evolution. *Communications Biology*, 6, 1241. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05621-4>
- Colossi Brustolin, M., Nagelkerken, I., Moitinho Ferreira, C., Urs Goldenberg, S., Ullah, H., & Fonseca, G. (2019). Future ocean climate homogenizes communities across habitats through diversity loss and rise of generalist species. *Global Change Biology*, 25, 3539–3548. <https://doi.org/10.1111/gcb.14745>
- Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., de Vere, N., Pfrender, M. E., & Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26, 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- Deiner, K., Walser, J.-C., Mächler, E., & Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 183, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>
- Didham, R. K., Basset, Y., Collins, C. M., Leather, S. R., Littlewood, N. A., Menz, M. H. M., Müller, J., Packer, L., Saunders, M. E., Schönrogge, K., Stewart, A. J. A., Yanoviak, S. P., & Hassall, C.

- (2020). Interpreting insect declines: Seven challenges and a way forward. *Insect Conservation and Diversity*, 13, 103–114. <https://doi.org/10.1111/icad.12408>
- Dirzo, R., Young, H. S., Galetti, M., Ceballos, G., Isaac, N. J. B., & Collen, B. (2014). Defaunation in the Anthropocene. *Science*, 345, 401–406. <https://doi.org/10.1126/science.1251817>
- Dornelas, M., Gotelli, N. J., McGill, B., Shimadzu, H., Moyes, F., Sievers, C., & Magurran, A. E. (2014). Assemblage time series reveal biodiversity change but not systematic loss. *Science*, 344, 296–299. <https://doi.org/10.1126/science.1248484>
- Dutheil, C., Meier, H. E. M., Gröger, M., & Börgel, F. (2023). Warming of Baltic Sea water masses since 1850. *Climate Dynamics*, 61, 1311–1331. <https://doi.org/10.1007/s00382-022-06628-z>
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- 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.
- 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 in Ecology and Evolution*, 8, 1265–1275. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12789>
- Fang, W., Devkota, S., Arunachalam, K., Phyto, K. M. M., & Shakya, B. (2023). Systematic review of fungi, their diversity and role in ecosystem services from the Far Eastern Himalayan Landscape (FHL). *Heliyon*, 9, e12756. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12756>
- Formenti, G., Theissinger, K., Fernandes, C., Bista, I., Bombarely, A., Bleidorn, C., Ciofi, C., Crottini, A., Godoy, J. A., Höglund, J., Malukiewicz, J., Mouton, A., Oomen, R. A., Paez, S., Palsbøll, P. J., Pampoulie, C., Ruiz-López, M. J., Svardal, H., Theofanopoulou, C., ... Zammit, G. (2022). The era of reference genomes in conservation genomics. *Trends in Ecology & Evolution*, 37, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.11.008>
- Friedrichs-Manthey, M., Bowler, D. E., & Freyhof, J. (2024). Freshwater fish in mid and northern German rivers – Long-term trends and associated species traits. *Science of The Total Environment*, 957, 177759. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.177759>
- Fuhrmann, N., Brasseur, M. V., Bakowski, C. E., Podsiadlowski, L., Prost, S., Krehenwinkel, H., & Mayer, C. (2024). Chromosome-Level Genome Assembly of the Viviparous Eelpout *Zoarces viviparus*. *Genome Biology and Evolution*, 16, evae155. <https://doi.org/10.1093/gbe/evae155>
- Furtak, K., Grządziel, J., Gałązka, A., & Niedźwiecki, J. (2020). Prevalence of unclassified bacteria in the soil bacterial community from floodplain meadows (fluvisols) under simulated flood conditions revealed by a metataxonomic approach. *CATENA*, 188, 104448. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2019.104448>
- Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J., & Vaissière, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68, 810–821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>

- Gardner, J. L., Peters, A., Kearney, M. R., Joseph, L., & Heinsohn, R. (2011). Declining body size: A third universal response to warming? *Trends in Ecology & Evolution*, 26, 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.005>
- Gautier, M. (2015). Genome-Wide Scan for Adaptive Divergence and Association with Population-Specific Covariates. *Genetics*, 201, 1555–1579. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.181453>
- Genovesi, P., & Carnevali, L. (2011). *Invasive alien species on European islands: Eradication and priorities for future work*. In Veit, C.R., Clout, M.,N. & Towns, D.R. (eds). *Island invasives: eradication and management*. p. 52-62. IUCN, Gland, Switzerland.
- Gienapp, P., Teplitsky, C., Alho, J. S., Mills, J. A., & Merilä, J. (2008). Climate change and evolution: Disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology*, 17, 167–178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03413.x>
- Gonzalez, A., Vihervaara, P., Balvanera, P., Bates, A. E., Bayraktarov, E., Bellingham, P. J., Bruder, A., Campbell, J., Catchen, M. D., Cavender-Bares, J., Chase, J., Coops, N., Costello, M. J., Czúcz, B., Delavaud, A., Dornelas, M., Dubois, G., Duffy, E. J., Eggermont, H., ... Torrelio, C. Z. (2023). A global biodiversity observing system to unite monitoring and guide action. *Nature Ecology & Evolution*, 7, 1947–1952. <https://doi.org/10.1038/s41559-023-02171-0>
- Grossart, H.-P., Massana, R., McMahon, K. D., & Walsh, D. A. (2020). Linking metagenomics to aquatic microbial ecology and biogeochemical cycles. *Limnology and Oceanography*, 65, S2–S20. <https://doi.org/10.1002/lno.11382>
- Haase, P., Bowler, D. E., Baker, N. J., Bonada, N., Domisch, S., Garcia Marquez, J. R., Heino, J., Hering, D., Jähnig, S. C., Schmidt-Kloiber, A., Stubbington, R., Altermatt, F., Álvarez-Cabria, M., Amatulli, G., Angeler, D. G., Archambaud-Suard, G., Jorrín, I. A., Aspin, T., Azpiroz, I., ... Welte, E. A. R. (2023). The recovery of European freshwater biodiversity has come to a halt. *Nature*, 620, 582–588. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06400-1>
- Haase, P., Cortés-Guzmán, D., He, F., Jupke, J. F., Mangadze, T., Pelicice, F. M., Palmer, M. A., Rolls, R. J., Schäfer, R. B., Welte, E. A. R., & Sinclair, J. S. (2025). Successes and failures of conservation actions to halt global river biodiversity loss. *Nature Reviews Biodiversity*, 1, 104–118. <https://doi.org/10.1038/s44358-024-00012-x>
- Haase, P., Tonkin, J. D., Stoll, S., Burkharde, B., Frenzel, M., Geijzendorffer, I. R., Hauser, C., Klotz, S., Kuhn, I., McDowell, W. H., Mirtl, M., Muller, F., Musche, M., Penner, J., Zacharias, S., & Schmeller, D. S. (2018). The next generation of site-based long-term ecological monitoring: Linking essential biodiversity variables and ecosystem integrity. *Science of The Total Environment*, 613, 1376–1384.
- Hairton Jr, N. G., Ellner, S. P., Geber, M. A., Yoshida, T., & Fox, J. A. (2005). Rapid evolution and the convergence of ecological and evolutionary time. *Ecology Letters*, 8, 1114–1127. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00812.x>
- Hakbong, L., Yong-Chan, C., Sang-Woo, J., Yoon-Ho, K., & Seung-Gyu, L. (2021). Changes in nocturnal insect communities in forest-dominated landscape relevant to artificial light intensity. *Journal of Ecology and Environment*, 45, 24. <https://doi.org/10.1186/s41610-021-00207-9>

- Hallmann, C. A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Schwan, H., Stenmans, W., Müller, A., Sumser, H., Hörrén, T., Goulson, D., & Kroon, H. de. (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLOS ONE*, 12, e0185809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185809>
- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*, 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>
- Hedman, J. E., Rüdél, H., Gercken, J., Bergek, S., Strand, J., Quack, M., Appelberg, M., Förlin, L., Tuvikene, A., & Bignert, A. (2011). Eelpout (*Zoarces viviparus*) in marine environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 2015–2029. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.06.028>
- HELCOM. (2025). *HELCOM Red List II of Baltic Sea species in danger of becoming extinct* (No. 205; Baltic Sea Environment Proceedings). <https://helcom.fi/wp-content/uploads/2025/06/Red-List-II-species-2025.pdf>
- Hendricks, S., Anderson, E. C., Antao, T., Bernatchez, L., Forester, B. R., Garner, B., Hand, B. K., Hohenlohe, P. A., Kardos, M., Koop, B., Sethuraman, A., Waples, R. S., & Luikart, G. (2018). Recent advances in conservation and population genomics data analysis. *Evolutionary Applications*, 11, 1197–1211. <https://doi.org/10.1111/eva.12659>
- Hillebrand, H., Blasius, B., Borer, E. T., Chase, J. M., Downing, J. A., Eriksson, B. K., Filstrup, C. T., Harpole, W. S., Hodapp, D., Larsen, S., Lewandowska, A. M., Seabloom, E. W., Van de Waal, D. B., & Ryabov, A. B. (2018). Biodiversity change is uncoupled from species richness trends: Consequences for conservation and monitoring. *Journal of Applied Ecology*, 55, 169–184. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12959>
- Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2008). Metagenomics. *Nature*, 455, 481–483. <https://doi.org/10.1038/455481a>
- Hulsen, T. (2022). *DeepVenn—A web application for the creation of area-proportional Venn diagrams using the deep learning framework Tensorflow.js* (arXiv:2210.04597). arXiv. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2210.04597>
- IPBES (2019): Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. E. S. Brondizio, J. Settele, S. Díaz, and H. T. Ngo (editors). IPBES secretariat, Bonn, Germany. 1148 pages. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3831673>
- Jacobsson, A., Neuman, E., & Olsson, M. (1993). *The viviparous blenny as an indicator of effects of toxic substances*. Kustlaboratoriet, Fiskeriverket. <https://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:havochvatten:diva-304>
- Jacobsson, A., Neuman, E., & Thoresson, G. (1986). The viviparous blenny as an indicator of environmental effects of harmful substances. *Ambio*, 15, 236–238.
- Jähnig, S. C., Baranov, V., Altermatt, F., Cranston, P., Friedrichs-Manthey, M., Geist, J., He, F., Heino, J., Hering, D., Hölker, F., Jourdan, J., Kalinkat, G., Kiesel, J., Leese, F., Maasri, A., Monaghan, M. T., Schäfer, R. B., Tockner, K., Tonkin, J. D., & Domisch, S. (2021). Revisiting global trends in freshwater insect biodiversity. *WIREs Water*, 8, e1506. <https://doi.org/10.1002/wat2.1506>

- Jansen, S., Konrad, H., & Geburek, T. (2017). The extent of historic translocation of Norway spruce forest reproductive material in Europe. *Annals of Forest Science*, 74, 56.  
<https://doi.org/10.1007/s13595-017-0644-z>
- Jaureguiberry, P., Titeux, N., Wiemers, M., Bowler, D. E., Coscieme, L., Golden, A. S., Guerra, C. A., Jacob, U., Takahashi, Y., Settele, J., Díaz, S., Molnár, Z., & Purvis, A. (2022). The direct drivers of recent global anthropogenic biodiversity loss. *Science Advances*, 8, eabm9982.  
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abm9982>
- Jeunen, G.-J., Cane, J. S., Ferreira, S., Strano, F., von Ammon, U., Cross, H., Day, R., Hesseltine, S., Ellis, K., Urban, L., Pearson, N., Olmedo-Rojas, P., Kardailsky, A., Gemmell, N. J., & Lamare, M. (2023). Assessing the utility of marine filter feeders for environmental DNA (eDNA) biodiversity monitoring. *Molecular Ecology Resources*, 23, 771–786.  
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13754>
- Jourdan, J., Bundschuh, M., Copilaș-Ciocianu, D., Fišer, C., Grabowski, M., Hupało, K., Jemec Kokalj, A., Kabus, J., Römbke, J., Soose, L. J., & Oehlmann, J. (2023). Cryptic species in Ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42, 1889–1914. <https://doi.org/10.1002/etc.5696>
- Junk, I., Frank, L., Marschel, N., & Krehenwinkel, H. (2025). Dead or Alive? Challenges in Discriminating Dietary From Host-Associated Community via RNA and DNA Metabarcoding in a Filter Feeder. *Environmental DNA*, 7(5), e70188. <https://doi.org/10.1002/edn3.70188>
- Junk, I., Hans, J., Perez-Lamarque, B., Stothut, M., Weber, S., Gold, E., Schubert, C., Schumacher, A., Schmitt, N., Melcher, A., Paulus, M., Klein, R., Teubner, D., Koschorreck, J., Kennedy, S., Morlon, H., & Krehenwinkel, H. (2025). Archived natural DNA samplers reveal four decades of biodiversity change across the tree of life. *Nature Ecology & Evolution*, 9, 1873–1884.  
<https://doi.org/10.1038/s41559-025-02812-6>
- Junk, I., Schmitt, N., & Krehenwinkel, H. (2023). Tracking climate-change-induced biological invasions by metabarcoding archived natural eDNA samplers. *Current Biology*, 33(18), R943–R944.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.07.035>
- Kang, B. R., Kim, S. B., Hong, J.-K., Ahn, S. H., Kim, J., Lee, N., & Lee, T. K. (2024). Assessing the health of climate-sensitive trees in a subalpine ecosystem through microbial community dynamics. *Science of The Total Environment*, 957, 177724.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.177724>
- Karlsson, P. E., Medin, E. L., Selldén, G., Wallin, G., Ottosson, S., Pleijel, H., & Skärby, L. (2002). Impact of ozone and reduced water supply on the biomass accumulation of Norway spruce saplings. *Environmental Pollution*, 119, 237–244. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00330-X](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00330-X)
- Karr, J. R. (1981). Assessment of biotic integrity using fish communities. *Fisheries*, 6, 21–27.  
[https://doi.org/10.1577/1548-8446\(1981\)006%253C0021:A0BIUF%253E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8446(1981)006%253C0021:A0BIUF%253E2.0.CO;2)
- Keck, F., Peller, T., Alther, R., Barouillet, C., Blackman, R., Capo, E., Chonova, T., Couton, M., Fehlinger, L., Kirschner, D., Knüsel, M., Muneret, L., Oester, R., Tapolczai, K., Zhang, H., & Altermatt, F. (2025). The global human impact on biodiversity. *Nature*, 641, 395–400.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-025-08752-2>



- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37, 907–915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- Kinitz, T., Quack, M., Paulus, M., Veith, M., Bergek, S., Strand, J., Tuvikene, A., Soirinsuo, A., & Hochkirch, A. (2013). Strong isolation-by-distance in the absence of genetic population structure in the eelpout (*Zoarces viviparus*, Linnaeus 1758). *Ecological Indicators*, 27, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.12.001>
- Kissling, W. D., Lumbierres, M., Lyche Solheim, A., Lique, C., Breeze, T. D., Bonn, A., McCallum, I., Maes, J., Hirsch, T., van Grunsven, R. H. A., Beja, P., Smets, B., Capinha, C., Ceia-Hasse, A., Fernández, N., Santana, J., Moreira, F., Junker, J., Leese, F., ... Pereira, H. M. (2026). Building the backbone for Europe's biodiversity monitoring. *Nature Reviews Biodiversity*, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s44358-026-00140-6>
- Klink, R. van, Bowler, D. E., Gongalsky, K. B., Swengel, A. B., Gentile, A., & Chase, J. M. (2020). Meta-analysis reveals declines in terrestrial but increases in freshwater insect abundances. *Science*, 368(6489), 417–420. <https://doi.org/10.1126/science.aax9931>
- Kofler, R., Orozco-terWengel, P., Maio, N. D., Pandey, R. V., Nolte, V., Futschik, A., Kosiol, C., & Schlötterer, C. (2011). PoPoolation: A toolbox for population genetic analysis of next generation sequencing data from pooled individuals. *PLOS ONE*, 6(1), e15925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015925>
- Kofler, R., Pandey, R. V., & Schlötterer, C. (2011). PoPoolation2: Identifying differentiation between populations using sequencing of pooled DNA samples (Pool-Seq). *Bioinformatics*, 27(24), 3435–3436. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr589>
- Kolossa-Gehring, M., Becker, K., Conrad, A., Schröter-Kermani, C., Schulz, C., & Seiwert, M. (2012). Environmental surveys, specimen bank and health related environmental monitoring in Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health, Special Issue: Berlin International Conference on Human Biomonitoring*, 215(2), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.10.013>
- Krehenwinkel, H., Kennedy, S. R., Adams, S. A., Stephenson, G. T., Roy, K., & Gillespie, R. G. (2019). Multiplex PCR targeting lineage-specific SNPs: A highly efficient and simple approach to block out predator sequences in molecular gut content analysis. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(7), 982–993. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13183>
- Krehenwinkel, H., Weber, S., Broekmann, R., Melcher, A., Hans, J., Wolf, R., Hochkirch, A., Kennedy, S. R., Koschorreck, J., Künzel, S., Müller, C., Retzlaff, R., Teubner, D., Schanzer, S., Klein, R., Paulus, M., Udelhoven, T., & Veith, M. (2022). Environmental DNA from archived leaves reveals widespread temporal turnover and biotic homogenization in forest arthropod communities. *eLife*, 11, e78521. <https://doi.org/10.7554/eLife.78521>
- Krehenwinkel, H., Weber, S., Künzel, S., & Kennedy, S. R. (2022). The bug in a teacup—Monitoring arthropod–plant associations with environmental DNA from dried plant material. *Biology Letters*, 18(6), 20220091. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0091>

- Krehenwinkel, H., Wolf, M., Lim, J. Y., Rominger, A. J., Simison, W. B., & Gillespie, R. G. (2017). Estimating and mitigating amplification bias in qualitative and quantitative arthropod metabarcoding. *Sci Rep*, 7(1), 17668. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17333-x>
- Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(11), pdb.top084970. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>
- Le Provost, G., Thiele, J., Westphal, C., Penone, C., Allan, E., Neyret, M., van der Plas, F., Ayasse, M., Bardgett, R. D., Birkhofer, K., Boch, S., Bonkowski, M., Buscot, F., Feldhaar, H., Gaulton, R., Goldmann, K., Gossner, M. M., Klaus, V. H., Kleinebecker, T., ... Manning, P. (2021). Contrasting responses of above- and belowground diversity to multiple components of land-use intensity. *Nature Communications*, 12(1), 3918. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23931-1>
- Leese, F., Bouchez, A., Abarenkov, K., Altermatt, F., Borja, Á., Bruce, K., Ekrem, T., Čiampor, F., Čiamporová-Zaťovičová, Z., Costa, F. O., Duarte, S., Elbrecht, V., Fontaneto, D., Franc, A., Geiger, M. F., Hering, D., Kahlert, M., Kalamujić Stroil, B., Kelly, M., ... Weigand, A. M. (2018). Why we need sustainable networks bridging countries, disciplines, cultures and generations for aquatic biomonitoring 2.0: A perspective derived from the DNAqua-Net COST Action. In *Next Generation Biomonitoring: Part 1* (pp. 63–99).
- Leese, F., Sander, M., Buchner, D., Elbrecht, V., Haase, P., & Zizka, V. M. A. (2021). Improved freshwater macroinvertebrate detection from environmental DNA through minimized nontarget amplification. *Environmental DNA*, 3(1), 261–276. <https://doi.org/10.1002/edn3.177>
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). popart: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Leray, M., Knowlton, N., & Machida, R. J. (2022). MIDORI2: A collection of quality controlled, preformatted, and regularly updated reference databases for taxonomic assignment of eukaryotic mitochondrial sequences. *Environmental DNA*, 4(4), 894–907. <https://doi.org/10.1002/edn3.303>
- Liess, M., Liebmann, L., Vormeier, P., Weisner, O., Altenburger, R., Borchardt, D., Brack, W., Chatzinotas, A., Escher, B., Foit, K., Gunold, R., Henz, S., Hitzfeld, K. L., Schmitt-Jansen, M., Kamjunke, N., Kaske, O., Knillmann, S., Krauss, M., Küster, E., ... Reemtsma, T. (2021). Pesticides are the dominant stressors for vulnerable insects in lowland streams. *Water Research*, 201, 117262. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117262>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, J., Breitwieser, F. P., Thielen, P., & Salzberg, S. L. (2017). Bracken: Estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science*, 3, e104. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>
- Lund, M. B., Kjeldsen, K. U., & Schramm, A. (2014). The earthworm-Verminephrobacter symbiosis: An emerging experimental system to study extracellular symbiosis. *Frontiers in Microbiology*, 5, 128. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00128>

- MacArthur, R. H., & Wilson, E. O. (1963). An equilibrium theory of insular zoogeography. *Evolution*, 17(4), 373–387. <https://doi.org/10.2307/2407089>
- Macgregor, C. J., Williams, J. H., Bell, J. R., & Thomas, C. D. (2019). Moth biomass has fluctuated over 50 years in Britain but lacks a clear trend. *Nature Ecology & Evolution*, 3(12), 1645–1649. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1028-6>
- Macher, T.-H., Beermann, A. J., Arle, J., Foerster, J., Greyer, M., Mora, D., Koschorreck, J., Rolaufts, P., Rother, A., Schüler, S., Zimmermann, J., Hering, D., & Leese, F. (2025). Fit for purpose? Evaluating benthic invertebrate DNA metabarcoding for ecological status class assessment in streams under the Water Framework Directive. *Water Research*, 272, 122987. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122987>
- Macher, T.-H., Schütz, R., Arle, J., Beermann, A. J., Koschorreck, J., & Leese, F. (2021). Beyond fish eDNA metabarcoding: Field replicates disproportionately improve the detection of stream associated vertebrate species. *Metabarcoding and Metagenomics*, 5, e66557. <https://doi.org/10.3897/mbmg.5.66557>
- Macher, T.-H., Schütz, R., Yildiz, A., Beermann, A. J., & Leese, F. (2023). Evaluating five primer pairs for environmental DNA metabarcoding of Central European fish species based on mock communities. *Metabarcoding and Metagenomics*, 7, e103856. <https://doi.org/10.3897/mbmg.7.103856>
- Magurran, A. E., Baillie, S. R., Buckland, S. T., Dick, J. M., Elston, D. A., Scott, E. M., Smith, R. I., Somerfield, P. J., & Watt, A. D. (2010). Long-term datasets in biodiversity research and monitoring: Assessing change in ecological communities through time. *Trends in Ecology and Evolution*, 25, 574–582. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.06.016>
- Mariani, S., Baillie, C., Colosimo, G., & Riesgo, A. (2019). Sponges as natural environmental DNA samplers. *Current Biology*, 29, R401–R402. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.031>
- Marques, A., Martins, I. S., Kastner, T., Plutzar, C., Theurl, M. C., Eisenmenger, N., Huijbregts, M. A. J., Wood, R., Stadler, K., Bruckner, M., Canelas, J., Hilbers, J. P., Tukker, A., Erb, K., & Pereira, H. M. (2019). Increasing impacts of land use on biodiversity and carbon sequestration driven by population and economic growth. *Nature Ecology & Evolution*, 3, 628–637. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0824-3>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17, Article 1. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martinsson, S., & Erséus, C. (2017). Cryptic speciation and limited hybridization within *Lumbricus* earthworms (Clitellata: Lumbricidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 106, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.09.011>
- McGill, B. J., Dornelas, M., Gotelli, N. J., & Magurran, A. E. (2015). Fifteen forms of biodiversity trend in the Anthropocene. *Trends in Ecology & Evolution*, 30, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.11.006>
- Meier, H. E. M., Kniebusch, M., Dieterich, C., Gröger, M., Zorita, E., Elmgren, R., Myrberg, K., Ahola, M. P., Bartosova, A., Bonsdorff, E., Börgel, F., Capell, R., Carlén, I., Carlund, T., Carstensen, J., Christensen, O. B., Dierschke, V., Frauen, C., Frederiksen, M., ... Zhang, W. (2022). Climate

- change in the Baltic Sea region: A summary. *Earth System Dynamics*, 13, 457–593.  
<https://doi.org/10.5194/esd-13-457-2022>
- Meyer, C., Kreft, H., Guralnick, R., & Jetz, W. (2015). Global priorities for an effective information basis of biodiversity distributions. *Nature Communications*, 6, 8221.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms9221>
- Mikryukov, V., Dulya, O., Zizka, A., Bahram, M., Hagh-Doust, N., Anslan, S., Prylutskyi, O., Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Nilsson, H., Pärn, J., Öpik, M., Moora, M., Zobel, M., Espenberg, M., Mander, Ü., Khalid, A. N., Corrales, A., Agan, A., ... Tedersoo, L. (2023). Connecting the multiple dimensions of global soil fungal diversity. *Science Advances*, 9, eadj8016.  
<https://doi.org/10.1126/sciadv.adj8016>
- Müller, J., Hothorn, T., Yuan, Y., Seibold, S., Mitesser, O., Rothacher, J., Freund, J., Wild, C., Wolz, M., & Menzel, A. (2024). Weather explains the decline and rise of insect biomass over 34 years. *Nature*, 628, 349–354. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06402-z>
- Newbold, T., Hudson, L. N., Hill, S. L. L., Contu, S., Lysenko, I., Senior, R. A., Börger, L., Bennett, D. J., Choimes, A., Collen, B., Day, J., De Palma, A., Díaz, S., Echeverria-Londoño, S., Edgar, M. J., Feldman, A., Garon, M., Harrison, M. L. K., Alhusseini, T., ... Purvis, A. (2015). Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. *Nature*, 520, 45–50.  
<https://doi.org/10.1038/nature14324>
- Olden, J. D., LeRoy Poff, N., Douglas, M. R., Douglas, M. E., & Fausch, K. D. (2004). Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.09.010>
- Osburn, E. D., Aylward, F. O., & Barrett, J. E. (2021). Historical land use has long-term effects on microbial community assembly processes in forest soils. *ISME Communications*, 1, 48.  
<https://doi.org/10.1038/s43705-021-00051-x>
- Outhwaite, C. L., McCann, P., & Newbold, T. (2022). Agriculture and climate change are reshaping insect biodiversity worldwide. *Nature*, 605, 97–102. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04644-x>
- Paetsch, J., Romahn, J., Theissinger, K., Baranski, D., Bonassin, L., Schardt, L., Koschorreck, J., Krehenwinkel, H., & Bálint, M. (2025). *Two decades of compositional restructuring of soil biodiversity in Germany despite stable  $\alpha$ - and  $\beta$ -diversity indices* (p. 2025.07.21.665925). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2025.07.21.665925>
- Pande, S., & Kost, C. (2017). Bacterial Unculturability and the Formation of Intercellular Metabolic Networks. *Trends in Microbiology*, 25, 349–361. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.015>
- Pantano, L. (2025). *DEGreport: Report of DEG analysis* [Computer software].  
<https://doi.org/10.18129/B9.bioc.DEGreport>
- Parra-Sanchez, E., Latombe, G., Mills, S. C., Socolar, J. B., Edwards, F. A., Martinez-Revelo, D., Perez-Escobar, O. A., Davies, R. W., Bousfield, C. G., Cerullo, G. R., Ochoa-Quintero, J. M., Haugaasen, T., Barlow, J., Freckleton, R. P., & Edwards, D. P. (2025). Tropical land-use change disrupts zeta-diversity across taxa. *Global Change Biology*, 31, e70245.  
<https://doi.org/10.1111/gcb.70245>

- Paulus, M., Teubner, D., Hochkirch, A., & Veith, M. (2014). Journey into the past: Using cryogenically stored samples to reconstruct the invasion history of the quagga mussel (*Dreissena rostriformis*) in German river systems. *Biological Invasions*, 16, 2591–2597.  
<https://doi.org/10.1007/s10530-014-0689-y>
- Peery, M. Z., Kirby, R., Reid, B. N., Stoelting, R., Doucet-Béer, E., Robinson, S., Vásquez-Carrillo, C., Pauli, J. N., & Palsbøll, P. J. (2012). Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Molecular Ecology*, 21, 3403–3418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05635.x>
- Plath, E., Trauth, C., Gerhards, J., Griebel, L., & Fischer, K. (2024). Dieback of managed spruce stands in western Germany promotes beetle diversity. *Journal of Forestry Research*, 35, 48.  
<https://doi.org/10.1007/s11676-024-01695-w>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes*, 7, 355–364.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43, e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Durrant, T., Mauri, A., Tinner, W., Ballian, D., Beck, P., Birks, H., Eaton, E., Enescu, C., Salvatore, P., Popescu, I., Ravazzi, C., Welk, E., Abad Viñas, R., Azevedo, J., Barbati, A., Barredo, J., & Zecchin, B. (2016). *European Atlas of Forest Tree Species*.
- Schlötterer, C., Tobler, R., Kofler, R., & Nolte, V. (2014). Sequencing pools of individuals—Mining genome-wide polymorphism data without big funding. *Nature Reviews Genetics*, 15, 749–763. <https://doi.org/10.1038/nrg3803>
- Schmidt, A., Schneider, C., Decker, P., Hohberg, K., Römbke, J., Lehmitz, R., & Bálint, M. (2022). Shotgun metagenomics of soil invertebrate communities reflects taxonomy, biomass, and reference genome properties. *Ecology and Evolution*, 12, e8991.  
<https://doi.org/10.1002/ece3.8991>
- Schmidt, J. (1918). Racial studies in fishes. I. Statistical investigations with *Zoarcus viviparus* L. *Journal of Genetics*, 7, 105–117.
- Schneider, C., Woehle, C., Greve, C., D’Haese, C. A., Wolf, M., Hiller, M., Janke, A., Bálint, M., & Huettel, B. (2021). Two high-quality de novo genomes from single ethanol-preserved specimens of tiny metazoans (Collembola). *GigaScience*, 10, giab035.  
<https://doi.org/10.1093/gigascience/giab035>
- Schöneberg, Y. (2025). *blast2taxonomy: Version 1.4.4* [Computer software]. Zenodo.  
<https://doi.org/10.5281/zenodo.15088570>
- Schütz, R., Fukaya, K., Beermann, A. J., Díaz, C., Lenz, A.-C., Macher, T.-H., Koschorreck, J., & Leese, F. (2025). Optimizing environmental DNA metabarcoding of Archived suspended particulate matter for river biodiversity monitoring. *Environmental DNA*, 7, e70130.  
<https://doi.org/10.1002/edn3.70130>

- Seibold, S., Gossner, M. M., Simons, N. K., Blüthgen, N., Müller, J., Ambarlı, D., Ammer, C., Bauhus, J., Fischer, M., Habel, J. C., Linsenmair, K. E., Nauss, T., Penone, C., Prati, D., Schall, P., Schulze, E.-D., Vogt, J., Wöllauer, S., & Weisser, W. W. (2019). Arthropod decline in grasslands and forests is associated with landscape-level drivers. *Nature*, 574, 671–674. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1684-3>
- Shaw, R. E., Farquharson, K. A., Bruford, M. W., Coates, D. J., Elliott, C. P., Mergeay, J., Ottewell, K. M., Segelbacher, G., Hoban, S., Hvilsom, C., Pérez-Espona, S., Ruñís, D., Aravanopoulos, F., Bertola, L. D., Cotrim, H., Cox, K., Cubric-Curik, V., Ekblom, R., Godoy, J. A., ... Grueber, C. E. (2025). Global meta-analysis shows action is needed to halt genetic diversity loss. *Nature*, 638, 704–710. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08458-x>
- Shirazi, S., Meyer, R. S., & Shapiro, B. (2021). Revisiting the effect of PCR replication and sequencing depth on biodiversity metrics in environmental DNA metabarcoding. *Ecology and Evolution*, 11, 15766–15779. <https://doi.org/10.1002/ece3.8239>
- Siles, J. A., Vera, A., Labouyrie, M., van den Hoogen, J., Crowther, T. W., Romero, F., Tedersoo, L., García, C., Jones, A., Panagos, P., van der Heijden, M. G. A., Orgiazzi, A., & Bastida, F. (2025). Land Use Interacts With Climate to Influence Microbial Diversity-To-Biomass Ratios Across Europe via Soil Organic Carbon and Nitrogen. *Molecular Ecology*, 34, e17806. <https://doi.org/10.1111/mec.17806>
- Simberloff, D., Martin, J.-L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D. A., Aronson, J., Courchamp, F., Galil, B., García-Berthou, E., Pascal, M., Pyšek, P., Sousa, R., Tabacchi, E., & Vilà, M. (2013). Impacts of biological invasions: What's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution*, 28, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.013>
- Sinclair, J. S., Buchner, D., Gessner, M. O., Müller, J., Pauls, S. U., Stoll, S., Welte, E. A. R., Bässler, C., Buse, J., Dziock, F., Enss, J., Hörrén, T., Künast, R., Li, Y., Marten, A., Morkel, C., Richter, R., Seibold, S., Sorg, M., ... Haase, P. (2025). Effects of land cover and protected areas on flying insect diversity. *Conservation Biology*, 39, e14425. <https://doi.org/10.1111/cobi.14425>
- Stadhouders, R., Pas, S. D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T. H. M., & Schutten, M. (2010). The Effect of Primer-Template Mismatches on the Detection and Quantification of Nucleic Acids Using the 5' Nuclease Assay. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12, 109–117. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090035>
- Stark, R., Grzelak, M., & Hadfield, J. (2019). RNA sequencing: The teenage years. *Nature Reviews Genetics*, 20, 631–656. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>
- Stat, M., Huggett, M. J., Bernasconi, R., DiBattista, J. D., Berry, T. E., Newman, S. J., Harvey, E. S., & Bunce, M. (2017). Ecosystem biomonitoring with eDNA: Metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Scientific Reports*, 7, 12240. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12501-5>
- Stephan, W. (2019). Selective Sweeps. *Genetics*, 211, 5–13. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301319>
- Stoeppeler, M., Schladow, J. D., & Schwuger, M. J. (1990). Umweltprobenbank in der Bundesrepublik Deutschland. *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium*, 38, 1228–1234. <https://doi.org/10.1002/nadc.19900381006>



- Stothut, M., Kühne, D., Ströbele, V., Mahla, L., Künzel, S., & Krehenwinkel, H. (2024). Environmental DNA metabarcoding reliably recovers arthropod interactions which are frequently observed by video recordings of flowers. *Environmental DNA*, 6, e550. <https://doi.org/10.1002/edn3.550>
- Strelkov, P., Katolikova, M., & Väinölä, R. (2017). Temporal change of the Baltic Sea–North Sea blue mussel hybrid zone over two decades. *Marine Biology*, 164, 214. <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3249-z>
- Suthers, I. M., Richardson, A. J., & Rissik, D. (2019). The importance of plankton. In I. M. Suthers, D. Rissik, & A. J. Richardson (Eds.), *Plankton: A Guide to Their Ecology and Monitoring for Water Quality*. CSIRO Publishing. [https://doi.org/10.1071/9781486308804.BK07808\\_ch01](https://doi.org/10.1071/9781486308804.BK07808_ch01)
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, E. (2018). *Environmental DNA. From biodiversity research to application*. Oxford University Press.
- Takahashi, M., Frøslev, T., Jenkins, G., Laporte, M., Thalinger, B., Jerde, C., Rajbhandari, S., Jeppesen, T., Bissett, A., Deagle, B., Hahn, E., Pauperio, J., Newman, P., Klymus, K., & Berry, O. (2024). Best practice for publishing environmental DNA (eDNA) data according to FAIR principles. *Biodiversity Information Science and Standards*, 8, e137742. <https://doi.org/10.3897/biss.8.137742>
- Teubner, D., Wesslein, A.-K., Rønne, P. B., Veith, M., Frings, C., & Paulus, M. (2016). Is a visuo-haptic differentiation of zebra mussel and quagga mussel based on a single external morphometric shell character possible? *Aquatic Invasions*, 11, 145–154. <https://doi.org/10.3391/ai.2016.11.2.04>
- Tews, J., Brose, U., Grimm, V., Tielbörger, K., Wichmann, M. C., Schwager, M., & Jeltsch, F. (2004). Animal species diversity driven by habitat heterogeneity/diversity: The importance of keystone structures. *Journal of Biogeography*, 31, 79–92. <https://doi.org/10.1046/j.0305-0270.2003.00994.x>
- Theissinger, K., Fernandes, C., Formenti, G., Bista, I., Berg, P. R., Bleidorn, C., Bombarely, A., Crottini, A., Gallo, G. R., Godoy, J. A., Jentoft, S., Malukiewicz, J., Mouton, A., Oomen, R. A., Paez, S., Palsbøll, P. J., Pampoulie, C., Ruiz-López, M. J., Secomandi, S., ... Zammit, G. (2023). How genomics can help biodiversity conservation. *Trends in Genetics*, 39, 545–559. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.01.005>
- Tickner, D., Opperman, J. J., Abell, R., Acreman, M., Arthington, A. H., Bunn, S. E., Cooke, S. J., Dalton, J., Darwall, W., Edwards, G., Harrison, I., Hughes, K., Jones, T., Leclère, D., Lynch, A. J., Leonard, P., McClain, M. E., Muruven, D., Olden, J. D., ... Young, L. (2020). Bending the curve of global freshwater biodiversity loss: An emergency recovery plan. *BioScience*, 70, 330–342. <https://doi.org/10.1093/biosci/biaa002>
- Tournayre, O., Leuchtman, M., Filippi-Codaccioni, O., Trillat, M., Piry, S., Pontier, D., Charbonnel, N., & Galan, M. (2020). In silico and empirical evaluation of twelve metabarcoding primer sets for insectivorous diet analyses. *Ecology and Evolution*, 10, 6310–6332. <https://doi.org/10.1002/ece3.6362>
- Uhler, J., Redlich, S., Zhang, J., Hothorn, T., Tobisch, C., Ewald, J., Thorn, S., Seibold, S., Mitesser, O., Morinière, J., Bozicevic, V., Benjamin, C. S., Englmeier, J., Fricke, U., Ganuza, C., Haensel, M.,

- Riebl, R., Rojas-Botero, S., Rummler, T., ... Müller, J. (2021). Relationship of insect biomass and richness with land use along a climate gradient. *Nature Communications*, 12, Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26181-3>
- Vamos, E., Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, 1, e14625. <https://doi.org/10.3897/mbmg.1.14625>
- Vörösmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S. E., Sullivan, C. A., Liermann, C. R., & Davies, P. M. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467, 555–561. <https://doi.org/10.1038/nature09440>
- Wallace, J. B., Grubaugh, J. W., & Whiles, M. R. (1996). Biotic indices and stream ecosystem processes: Results from an experimental study. *Ecological Applications*, 6(1), 140–151. <https://doi.org/10.2307/2269560>
- Weber, S., Junk, I., Brink, L., Wörner, M., Künzel, S., Veith, M., Teubner, D., Klein, R., Paulus, M., & Krehenwinkel, H. (2023). Molecular diet analysis in mussels and other metazoan filter feeders and an assessment of their utility as natural eDNA samplers. *Molecular Ecology Resources*, 23, 471–485. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13710>
- Weigand, H., & Leese, F. (2018). Detecting signatures of positive selection in non-model species using genomic data. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 184, 528–583. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zly007>
- Weinfurtner, K., & Körner, A. (2022). *Guidelines for sampling and sample-treatment: Soil* (p. 20). [https://www.umweltprobenbank.de/upb\\_static/fck/download/SOP\\_ESB\\_Soil\\_V2.0.2\\_2022\\_en.pdf](https://www.umweltprobenbank.de/upb_static/fck/download/SOP_ESB_Soil_V2.0.2_2022_en.pdf)
- Weiss, M., & Leese, F. (2016). Widely distributed and regionally isolated! Drivers of genetic structure in *Gammarus fossarum* in a human-impacted landscape. *BMC Evolutionary Biology*, 16, 153. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0723-z>
- Welti, E. A. R., Zajicek, P., Frenzel, M., Ayasse, M., Bornholdt, T., Buse, J., Classen, A., Dziöck, F., Engelmann, R. A., Englmeier, J., Fellendorf, M., Förchler, M. I., Fricke, U., Ganuza, C., Hippke, M., Hoenselaar, G., Kaus-Thiel, A., Kerner, J., Kilian, D., ... Haase, P. (2022). Temperature drives variation in flying insect biomass across a German malaise trap network. *Insect Conservation and Diversity*, 15, 168–180. <https://doi.org/10.1111/icad.12555>
- Wilkinson, M. D., Dumontier, M., Aalbersberg, I. J., Appleton, G., Axton, M., Baak, A., Blomberg, N., Boiten, J.-W., da Silva Santos, L. B., Bourne, P. E., Bouwman, J., Brookes, A. J., Clark, T., Crosas, M., Dillo, I., Dumon, O., Edmunds, S., Evelo, C. T., Finkers, R., ... Mons, B. (2016). The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Scientific Data*, 3, Article 1. <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.18>
- Wirth, C., Bruelheide, H., Farwig, N., Marx, J., & Settele, J., (2024). *Faktencheck Artenvielfalt Bestandsaufnahme und Perspektiven für den Erhalt der biologischen Vielfalt in Deutschland. 1256 Seiten. Oekom Verlag, München, Deutschland.* <https://doi.org/10.14512/9783987263361>

- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Wright, D. H. (1983). Species-Energy Theory: An Extension of Species-Area Theory. *Oikos*, 41(3), 496–506. <https://doi.org/10.2307/3544109>
- Wunsch, A., Liesch, T., & Broda, S. (2022). Deep learning shows declining groundwater levels in Germany until 2100 due to climate change. *Nature Communications*, 13, 1221. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28770-2>
- Xiong, F., Shu, L., Zeng, H., Gan, X., He, S., & Peng, Z. (2022). Methodology for fish biodiversity monitoring with environmental DNA metabarcoding: The primers, databases and bioinformatic pipelines. *Water Biology and Security*, 1, 100007. <https://doi.org/10.1016/j.watbs.2022.100007>
- Yeo, D., Srivathsan, A., & Meier, R. (2020). Longer is not always better: Optimizing barcode length for large-scale species discovery and identification. *Systematic Biology*, 69, 999–1015. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syaa014>
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., & Stamatakis, A. (2014). PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30(5), 614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>
- Zhang, Y., Pavlovska, M., Stoica, E., Prekrasna, I., Yang, J., Slobodnik, J., Zhang, X., & Dykyi, E. (2020). Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: From bacteria to marine mammals. *Environment International*, 135, 105307. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105307>
- Zhao, J., Becker, P. R., & Meng, X.-Z. (2015). 2013 International Conference on Environmental Specimen Banks: Securing a Strategy to Monitor Emerging Pollutants in the Regional and Global Environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 1555–1558. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3715-9>
- Zhou, Y., Zhang, H., Liu, D., Khashaveh, A., Li, Q., Wyckhuys, K. A. G., & Wu, K. (2023). Long-term insect censuses capture progressive loss of ecosystem functioning in East Asia. *Science Advances*, 9, eade9341. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade9341>
- Zizka, V. M. A., Koschorreck, J., Khan, C. C., & Astrin, J. J. (2022). Long-term archival of environmental samples empowers biodiversity monitoring and ecological research. *Environmental Sciences Europe*, 34, 40. <https://doi.org/10.1186/s12302-022-00618-y>

## A Anhang zum Bericht

### A.1 Laborprotokolle zur DENA-Extraktion aus UPB-Proben

Alle DNA-Extraktionsprotokolle, die mit den verschiedenen Probenotypen der Umweltprobenbank getestet wurden, wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt, sofern es sich um kommerzielle Kits handelte. Alle anderen verwendeten Protokolle, die keine kommerziellen Kits sind, wurden wie unten beschrieben angewendet.

#### A.1.1 Protokolle nach Herstellerangaben (nicht weiter aufgeführt)

NM Tissue, NM Food, NM Microbiome

Qiagen DNeasy Plant, Qiagen PowerSoilPro

#### A.1.2 TNES-Protokoll

##### Vorbereitung

SeraSil-Mag 400 Beads von Cytival:

- ▶ 200 µl der homogenen Beadlösung in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettieren, in den Magnetständer stellen und warten bis die Beads separiert werden. Anschließend 2x mit 1 ml TE-Puffer waschen. Beads in 20x Menge TE-Puffer aufnehmen und anschließend zu 250 µl aliquotieren.
- ▶ 2 ml Bead Tube vorbereiten (3,5 g große Beads, 2,5g kleine Beads)
- ▶ *Washing buffer* (10 mM Tris HCl pH 7.5, 80% EtOH), vortexen, 1 min bei 1200 rpm, 25°C inkubieren
- ▶ *TNES-Puffer* (50 mM Tris HCl pH 7.5, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS)
- ▶ *binding buffer* (3M GuHCl, 10 mM Bis-Tris, 90% EtOH, auf pH 6 mit HCl einstellen)

##### Lyse

- ▶ 25 mg der gefriergetrockneten Proben in die Bead-Tubes einwiegen 900 µL TNES-buffer
- ▶ und 100 µL Proteinase K (10 mg/ml in 50 % Glycerin)
- ▶ 2x 45 sec. bei 4,0 M/s im Beater homogenisieren
- ▶ 20 min bei 55°C und 1400 rpm inkubieren

##### DNA-Extraktion

- ▶ 3 min bei 17.000 x g, 25°C zentrifugieren
- ▶ 240 µl Binding buffer und 20 µl magnetic beads in ein neues 1,5mL Reagiergefäß vorlegen
- ▶ 100 µL von dem Lysat hinzugeben
- ▶ 5 min bei 700 rpm, 25°C inkubieren

- ▶ 2 min im Magnetständer separieren und den Überstand entfernen
- ▶ 100 µl Washing buffer, vortexen, 1 min bei 1200 rpm, 25°C inkubieren
- ▶ 1 min im Magnetständer separieren und den Überstand entfernen
- ▶ 100 µL Washing buffer, vortexen, 1 min bei 1200 rpm, 25°C inkubieren
- ▶ 1 min im Magnetständer separieren und den Überstand entfernen
- ▶ 5 min bei 50°C und 600 rpm mit geöffnetem Deckel trocknen
- ▶ 100 µL Elution buffer (10 mM Tris HCl pH 8.5)
- ▶ 5 min bei 1200 rpm, 25°C inkubieren
- ▶ 2 min im Magnetständer separieren und 80 µl Überstand in ein neues 1,5 mL Reagiergefäß überführen

### **A.1.3 TNES SPM (terrestrik) Protokoll**

#### **Probenvorbereitung**

- ▶ 2 mL Bead-Tube vorbereiten (3,5 g große, 2,5 g kleine Ceramic beads)
- ▶ 25 mg Probe abwiegen

#### **Lyse**

- ▶ 900 µL TNES buffer (50 mM Tris HCl pH 7.5, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS) auf die Probe geben
- ▶ 2 x 45 sec im Beater bei 4,5 m/s mechanisch lysieren
- ▶ Gefäße kurz zentrifugieren, damit der Schaum sich etwas absetzt
- ▶ Zugabe von 100 µL Proteinase K (10 mg/mL in 50 % Glycerol/H<sub>2</sub>O)
- ▶ 1 h bei 56 °C und 1000 rpm im Heizblock inkubieren
- ▶ 3 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugieren

#### **Binden**

- ▶ 800 µL Lysat mit doppelter Menge Gu-HCl Binding buffer (1600 µL)
- ▶ (3M Gu-HCl, 10 mM Bis-Tris, 90% EtOH, pH 6,0)
- ▶ 650 µL Probe auf die Säule geladen und, 1 min bei 11,000 x g zentrifugiert,
- ▶ wiederholen, bis Probe aufgebraucht ist

#### **Waschen (2x wiederholen)**

- ▶ 650 µL Wash buffer (80 % EtOH, 10 mM TrisHCl, pH 7,5) pro Säule auftragen
- ▶ 1 min bei 11,000 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen

- ▶ 1 min bei 11,000 x g die Membran trocknen

#### **Elution**

- ▶ Säulen in neue 1,5 mL Reagiergefäß stellen
- ▶ gewünschte Menge (z. B. 50-100 µl) Elution buffer (10mM Tris-CL pH 8,5) auf die Säule pipettieren
- ▶ 1 min bei RT inkubieren
- ▶ 1 min bei 11,000 x g zentrifugieren

#### **Aufreinigung – *Bead clean up***

- ▶ 100 µL Probe mit 150 µL Clean up beads (1 mL Sera SpeedBeads carboxylate, 2x mit TE Minimum Puffer waschen, 50 mL Puffer aufnehmen: 20% PEG 8000, 2,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,05% Tween 20, 10 mM Tris-HCL, pH 7,6) mixen (10x resuspendieren)
- ▶ 5 min inkubieren, dann auf den Magneten stellen und mind. 5 min warten
- ▶ folgende Waschritte 2x wiederholen (auf dem Magnetständer belassen)
- ▶ 200 µL Wash buffer (80 % EtOH, 10 mM TrisHCl, pH:7,5) – Pellet nicht tangieren
- ▶ 30 sec inkubieren und Überstand abziehen
- ▶ 5 min bei RT trocknen (auf dem Magnetständer stehen lassen)
- ▶ Reaktionsgefäß vom Magnetständer nehmen, 100 µl Elution buffer (10 mM Tris HCl pH 8.5) hinzugeben
- ▶ 5 min inkubieren
- ▶ Reaktionsgefäß wieder auf den Magnetständer stellen, mind. 5 min warten
- ▶ 100 µL in ein neues Reaktionsgefäß überführen

#### **A.1.4 IME-Protokoll**

Dieses Protokoll ist eine modifizierte Kombination aus CTAB, TNES und dem Inhibitor removal Kit (Macherey-Nagel)

##### **Lyse (CTAB)**

- ▶ 3,5 g große, 2,5 g kleine Ceramic beads
- ▶ 20 mg Pflanzenmaterial in Bead-Tube einwiegen
- ▶ 1600 µl 2x CTAB Extraktion Puffer:
- ▶ (Stock: 20 g/L CTAB; 7,44 g/L Na<sub>2</sub>EDTA \* 2 H<sub>2</sub>O; 81,82 g/L NaCl; 12,11 g/L TRIS Base)
- ▶ (Zugabe: 0,2 % β-Mercaptoethanol; 100 mg/g Probe PVP; + 10 % SDS)
- ▶ 2 x 45 sec, 4,5 m/s beuten und 5 min Ultraschall



- ▶ 1 h, 60°C inkubieren und auf RT abkühlen lassen
- ▶ Gleiches Volumen Chloroform:IAA (24:1) hinzugeben, mischen
- ▶ 2000 x g, 10 min zentrifugieren
- ▶ Obere, wässrige Phase abnehmen
- ▶ 2/3 x Volumen mit Isopropanol versetzen, mischen und 1 min Ultraschall
- ▶ 30 min 4°C inkubieren
- ▶ 10.000 x g, 10 min zentrifugieren, Überstand verwerfen

#### **Binden (TNES)**

- ▶ Pellet in 240 µl Bindepuffer (3M GuHCl, 10 mM Bis-Tris, 90% EtOH, pH 6 mit HCl) und 20 µl magnetic beads aufnehmen
- ▶ 5 min bei 700 rpm, 25°C im Thermomixer inkubieren
- ▶ 2 min im Magnetständer separieren und den Überstand entfernen

#### **Waschen**

- ▶ 100 µL Waschpuffer (10 mM Tris HCl pH 7.5, 80% EtOH), vortexen, 1 min Ultraschall
- ▶ 1 min bei 25°C und 1200 rpm im inkubieren
- ▶ 1 min im Magnetständer separieren und den Überstand entfernen
- ▶ 100 µL Waschpuffer, 1 min Ultraschall bei 1200 rpm bei 25°C inkubieren
- ▶ 1 min im Magnetständer separieren und den Überstand entfernen
- ▶ 5 min bei 50°C und 600 rpm mit offenem Deckel trocknen

#### **Elution**

- ▶ 100 µL Elutionspuffer (10 mM Tris HCl pH 8)
- ▶ 5 min bei 1200 rpm, 25°C Thermomixer inkubieren
- ▶ 2 min im Magnetständer separieren und 80 µL Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführen

#### **A.1.5 Inhibitor removal**

- ▶ (Macherey-Nagel), Herstellerangaben

#### **A.1.6 Protokoll zur Isolation von DNA aus Schwebstoffen (UDE Fallstudie 1)**

##### **Probenvorbereitung**

- ▶ Proben wiegen
- ▶ Auf trockene Proben 100% EtOH geben (z. B. 8 mL EtOH auf 1g Probe)

- ▶ Bei wässrigen Proben erst abzentrifugieren, Flüssigkeit abnehmen und dann EtOH auf das Pellet geben
- ▶ 2 ml Twist-top Tubes mit je 250 mg glass beads (0,1 und 0,5 mm Durchmesser) vorbereiten
- ▶ Ziel ~250 mg Sediment pro Probe auf glass beads geben (Bsp. 2 ml Probe/EtOH Gemisch pipettieren;  $250 \text{ mg}/1000 \text{ mg} \times 8000 \text{ } \mu\text{l} = 2000 \text{ } \mu\text{L}$ )
- ▶ 3 min bei max. RPM zentrifugieren
- ▶ Ethanol mit Pipette abnehmen und werfen
- ▶ Das Pellet 12 min bei 60 °C in Vakuumzentrifuge oder Heizblock inkubieren (Pellet trocknen)

#### **Lyse**

- ▶ 900  $\mu\text{L}$  TNES auf die Pellets geben
- ▶ 2 min im Bead-Beater bei 2400 RPM mechanisch lysieren (alternativ lange Vortexen)
- ▶ Mastermix aus Prot.K und RNase A ansetzen
- ▶ 100  $\mu\text{L}$  Prot.K + 5  $\mu\text{l}$  RNase A
- ▶ 105  $\mu\text{L}$  des Mastermixes auf die Proben pipettieren
- ▶ 1 h bei 56 °C und 1000 RPM im Heizblock inkubieren (enzymatischer Verdau)
- ▶ 3 min bei max. RPM zentrifugieren

#### **Säulenextraktion**

##### **Binden**

- ▶ 800  $\mu\text{L}$  Lysat mit doppelter Menge (1600  $\mu\text{l}$ ) Gu-HCl Bindepuffer (3M Gu-HCl, 10 mM Bis-Tris, 90% EtOH, pH 6,0) mischen (entweder in 5 ml Eppis oder in tiefer 96er Platte)
- ▶ Extraktion entweder über einzelne Silica Membran Säulen (bei wenigen Proben) oder über 96er Well Filter Plate (bei vielen Proben)
- ▶ Bei einzelnen Säulen werden 650  $\mu\text{L}$  Probe auf die Säule geladen und dann bei 11,000g für 1 min zentrifugiert, wiederholen bis Probe aufgebraucht ist
- ▶ Bei 96er Filter Plate werden 1200  $\mu\text{l}$  geladen und mit einer 96-Plate Vakuumkammer durch die Filter Platte gezogen, wiederholen bis Probe aufgebraucht ist (Auffangschale unterstellen und zwischendurch leeren)

##### **Waschen (2x wiederholen)**

- ▶ 650  $\mu\text{L}$  Waschpuffer (80 % EtOH, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) pro Well/Säule auftragen und bei 11,000g 1 min zentrifugieren (Bei Platte wieder mit Vakuum ziehen)
- ▶ 1 min bei 11,000g die Membran trocknen/ 1 min Vakuum ziehen lassen
- ▶ Elution
- ▶ Säulen in neue 1,5 mL Eppis stellen, bei Platte Auffangschale durch PCR-Platte ersetzen

- ▶ Gewünschte Menge (z. B. 15-50 µL) Elution buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5) in jedes Well/Säule pipettieren
- ▶ 1 min bei RT inkubieren
- ▶ 1 min bei 11,000g zentrifugieren oder bei Platte Vakuum anschalten

#### **Aufreinigung – Bead clean up**

- ▶ 50 µL Probe vorlegen und mit 100 µl Clean up beads (1 mL Sera SpeedBeads carboxylate, 2x mit TE Minimum Puffer waschen, dann 50 ml Puffer hinzu geben: 20% PEG 8000, 2,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,05% Tween 20, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6) mixen (10-mal hoch-/runter pipettieren)
- ▶ 5 min inkubieren, dann auf den Magneten stellen und mind. 5 min warten
- ▶ folgende Waschriffe 2x wiederholen (auf dem Magneten belassen)
- ▶ 100 µL Washbuffer (80 % EtOH, 10 mM Tris-HCl, pH:7,5) – Pellet nicht stören
- ▶ 30 sek inkubieren
- ▶ Überstand verwerfen
- ▶ 5 min bei RT trocknen (auf dem Magneten stehen lassen)
- ▶ Platte vom Magneten nehmen und 50 µL Elution buffer hinzugeben (resuspendieren 10x)
- ▶ 5 min inkubieren
- ▶ Platte wieder auf den Magneten stellen, mind. 5 min warten
- ▶ 50 µL in eine neues Reaktionsgefäß überführen

**Tabelle Anhang 1: Übersicht über die Quantität und Qualität mit verschiedenen Extraktionsmethoden extrahierter DNA.**

In der Spalte „Öko“ steht „T“ für terrestrisch, „M“ für marin, „L“ für limnische Probentypen.

| Öko | Typ     | Teil    | Probenart           | Extraktionsmethode | Ausbeute<br>[µg/g] | min. Reinheit<br>[260/280] | max. Reinheit<br>[260/280] | Mittelwert Reinheit<br>[260/280] | spike in<br>Δct |
|-----|---------|---------|---------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|-----------------|
| T   | Pflanze | Blätter | Fichtentriebe       | NM Tissue          | 2239,27            | 1,35                       | 1,41                       | 0,52                             | -0,01           |
|     |         |         |                     | TNES               | 33,88              | 1,47                       | 2,54                       | 1,62                             | 0,06            |
| T   | Pflanze | Blätter | Kiefertriebe        | NM Tissue          | 3860,93            | 1,48                       | 1,53                       | 1,50                             | 0,03            |
|     |         |         |                     | TNES               | 55,33              | 1,4                        | 1,76                       | 1,58                             | -0,04           |
| T   | Pflanze | Blätter | Buchenblätter       | NM Food            | 997,65             | 2,05                       | 2,14                       | 2,10                             | -0,11           |
|     |         |         |                     | Dneasy             | 498,88             | 2,17                       | 2,2                        | 2,19                             | -0,27           |
| T   | Pflanze | Blätter | Pappelblätter       | NM Food            | 121,47             | 1,6                        | 1,75                       | 1,68                             | -0,02           |
|     |         |         |                     | TNES               | 289,39             | 1,28                       | 1,39                       | 1,33                             | 0,03            |
| T   | Gewebe  | Leber   | Rehleber            | NM Tissue          | 791,26             | 1,84                       | 1,88                       | 1,86                             | -0,12           |
|     |         |         |                     | TNES               | 233,32             | 1,79                       | 1,96                       | 1,89                             | -0,08           |
| T   | Gewebe  | Wurm    | Regenwurm           | NM Tissue          | 620,79             | 1,82                       | 1,95                       | 1,91                             | -0,13           |
|     |         |         |                     | TNES               | 135,3              | 1,7                        | 1,9                        | 1,84                             | 0,12            |
| M   | Gewebe  | Ei      | Silbermöveneiinhalt | NM Food            | 98,32              | 1,07                       | 1,56                       | 1,34                             | -0,03           |
|     |         |         |                     | Dneasy             | 9,31               | 1,06                       | 2,17                       | 1,63                             | -0,11           |
| T   | Gewebe  | Ei      | Stadttaubenei       | NM Food            | 48,15              | 0,93                       | 1,15                       | 1,04                             | -0,08           |
|     |         |         |                     | Dneasy             | 10,92              | 0,93                       | 1,67                       | 1,31                             | -0,17           |
| M   | Pflanze | Alge    | Blasentang          | IME Protokoll      | 48,82              | 1,64                       | 2,19                       | 1,99                             | -0,19<br>(+BSA) |
|     |         |         |                     | IME Protokoll      | 98,67              | 1,82                       | 2,2                        | 2,05                             | -0,37<br>(+BSA) |
| M   | Gewebe  | Muschel | Miesmuschel         | NM Food            | 8139,21            | 1,97                       | 2,01                       | 1,98                             | -0,17           |
|     |         |         |                     | NM Tissue          | 194,53             | 1,43                       | 1,68                       | 1,54                             | -0,13           |
|     |         |         |                     | TNES               | 2097,94            | 1,91                       | 2,04                       | 1,96                             | -0,03           |
|     |         |         |                     | NM Food            | 6770,81            | 1,94                       | 1,98                       | 1,96                             | -0,02           |
|     |         |         |                     | NM Tissue          | 113,52             | 1,5                        | 1,78                       | 1,62                             | -2,71           |
|     |         |         |                     | TNES               | 2044,32            | 1,93                       | 2,05                       | 1,98                             | -0,05           |
| L   |         |         |                     | NM Tissue          | 973,82             | 1,82                       | 1,91                       | 1,37                             | -0,09           |

| Öko | Typ    | Teil    | Probenart        | Extraktionsmethode | Ausbeute<br>[µg/g] | min.<br>Reinheit<br>[260/280] | max.<br>Reinheit<br>[260/280] | Mittelwert<br>Reinheit<br>[260/280] | spike<br>in<br>Δct |
|-----|--------|---------|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
|     | Gewebe | Muschel | Dreikantmuscheln | TNES               | 553,15             | 1,97                          | 2,05                          | 2,00                                | -0,08              |
| L   | Gewebe | Muschel | Dreikantmuscheln | NM Tissue          | 318,31             | 1,73                          | 1,85                          | 1,78                                | -0,14              |
|     |        |         |                  | TNES               | 603,43             | 1,87                          | 1,92                          | 1,90                                | -0,09              |
| L   | Gewebe | Muschel | Quagga muschel   | NM Tissue          | 433,14             | 1,69                          | 1,77                          | 1,73                                | -0,11              |
|     |        |         |                  | TNES               | 420,76             | 1,84                          | 1,92                          | 1,88                                | -0,06              |

Tabelle Anhang 2: Weitere Probentypen

| Öko | Typ    | Teil   | Probenart           | Extraktionsmethode | Ausbeute<br>[µg/g] | min.<br>Reinheit<br>[260/280] | max.<br>Reinheit<br>[260/280] | Mittelwert<br>Reinheit<br>[260/280] | spike<br>in<br>Δct |
|-----|--------|--------|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| L   | Gewebe | Muskel | Brassenmuskulatur   | NM Tissue          | 472,17             | 1,89                          | 2,04                          | 1,97                                | -0,03              |
|     |        |        |                     | TNES               | 87,98              | 1,38                          | 1,76                          | 1,58                                | -0,12              |
| L   | Gewebe | Leber  | Brassenleber        | NM Tissue          | 6427,51            | 1,97                          | 2,03                          | 2,00                                | -0,04              |
|     |        |        |                     | TNES               | 432,6              | 1,63                          | 1,78                          | 1,70                                | -0,1               |
| L   | Gewebe | Muskel | Aalmuttermuskulatur | NM Tissue          | 1192,3             | 2,07                          | 2,10                          | 2,09                                | -0,05              |
|     |        |        |                     | TNES               | 41,18              | 1,64                          | 2,26                          | 1,89                                | 0,08               |
| L   | Gewebe | Leber  | Aalmutterleber      | NM Tissue          | 1127,96            | 1,84                          | 1,92                          | 1,88                                | -0,02              |
|     |        |        |                     | TNES               | 163,49             | 1,57                          | 1,67                          | 1,63                                | -0,05              |
| L   | Boden  | SPM    | Schwebstoffe        | PowerSoil          | 174,22             | 1,86                          | 1,88                          | 1,87                                | -0,31              |
|     |        |        |                     | NM-Microbiome      | 66,76              | 1,91                          | 1,97                          | 1,94                                | -0,14              |
|     |        |        |                     | SPM-TNES           | 663,1              | 1,55                          | 1,58                          | 1,57                                | -0,33              |
|     |        |        |                     | PowerSoil          | 65,62              | 1,88                          | 1,92                          | 1,90                                | -0,2               |
|     |        |        |                     | NM-Microbiome      | 44,92              | 1,99                          | 2,08                          | 2,03                                | -0,08              |
|     |        |        |                     | SPM-TNES           | 124,22             | 2,04                          | 2,85                          | 2,25                                | -0,22              |
| T   |        |        |                     | PowerSoil          | 64,85              | 1,88                          | 1,9                           | 1,89                                | -0,3               |

| Öko | Typ   | Teil  | Probenart              | Extraktionsmethode | Ausbeute<br>[µg/g] | min.<br>Reinheit<br>[260/280] | max.<br>Reinheit<br>[260/280] | Mittelwert<br>Reinheit<br>[260/280] | spike<br>in<br>Δct |
|-----|-------|-------|------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
|     | Boden | Boden | Auflage/<br>Wurzelfilz | NM-Microbiome      | 36,91              | 1,87                          | 2,04                          | 1,94                                | -0,2               |
|     |       |       |                        | SPM-TNES           | 233,52             | 1,68                          | 1,8                           | 1,73                                | -0,25              |
|     |       |       |                        | PowerSoil          | 111,29             | 1,89                          | 1,91                          | 1,90                                | -0,61              |
|     |       |       |                        | NM-Microbiome      | 84,21              | 1,85                          | 1,91                          | 1,87                                | -0,57              |
|     |       |       |                        | SPM-TNES           | 242,37             | 1,47                          | 1,65                          | 1,55                                | -0,66              |
| T   | Boden | Boden | Regenwurmkot           | PowerSoil          | 106,9              | 1,89                          | 1,9                           | 1,90                                | -0,54              |
|     |       |       |                        | NM-Microbiome      | 37,46              | 1,87                          | 1,97                          | 1,93                                | -0,34              |
|     |       |       |                        | SPM-TNES           | 485,98             | 1,61                          | 1,73                          | 1,66                                | -0,45              |

## A.2 Qualitätssicherung – Kontaminationsprüfung

### A.2.1 Überarbeitung der aktuellen Protokolle der UPB für die Reinigung/Dekontamination der Ausrüstung zwischen der Probenverarbeitung

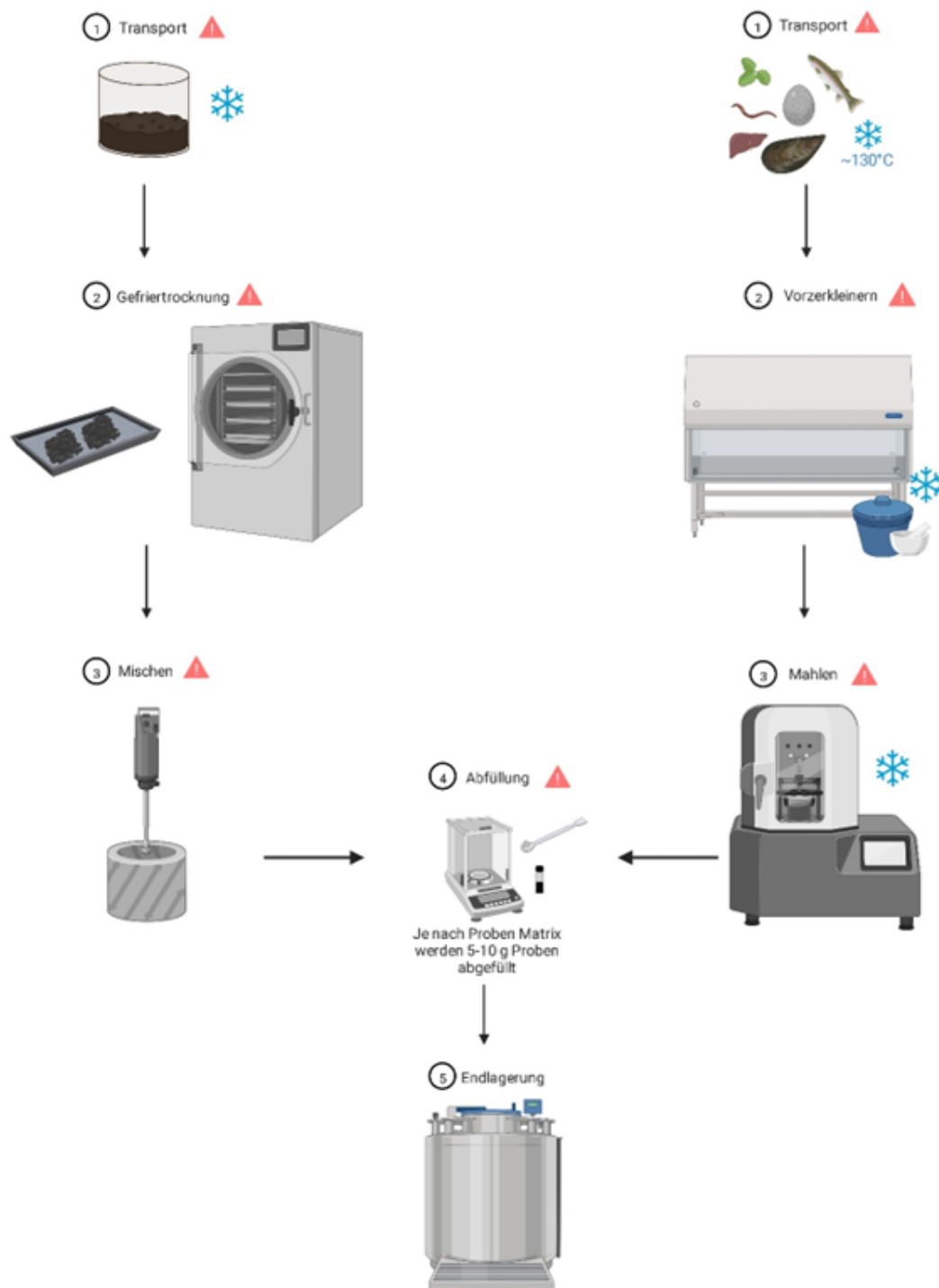
Die Protokolle für die Verarbeitung der einzelnen Probearten wurden von F-IME überarbeitet (Lesen der SOPs und Besuch der Einrichtungen für die Probenverarbeitung in der UPB). Es wurde ein Schema erstellt, das den Prozess zusammenfasst (**Abbildung Anhang 1**), und es wurden mögliche Kreuzkontaminationspunkte ermittelt.

Im Routinebetrieb der UPB werden verschiedene Proben nach dem Prinzip "Wer zuerst kommt, mahlt zuerst" oder nach bestimmten Anforderungen bearbeitet. Aus diesem Grund werden Proben, die zwar vom gleichen Typ sind, aber z. B. zu einem anderen Standort gehören, oder Proben eines anderen Typs nacheinander analysiert.

Es wurde 2022 ein regelmäßiger Probenahmeplan aufgestellt, um die Reinigungs-/Dekontaminationsschritte während des Routinebetriebs der UPB zu überprüfen. Es wurden regelmäßig DNA-Proben in den verschiedenen beteiligten Geräten (**Abbildung Anhang 2 und 3**) unmittelbar nach der Verarbeitung der Probe (als positive Kontrolle der analysierten Probe) und nach der Reinigung/Dekontamination der Geräte entnommen. Die Proben wurden zwischen der Verarbeitung von Proben desselben Probentyps und zwischen der Verarbeitung verschiedener Probentypen entnommen. Die Probenahme erfolgte mit sterilen Tupfern (Sarstedt, Artikel Nr. 80.625, Vucose, steril), und die DNA wurde mit dem NucleoMag Tissue Kit (Macherey Nagel, Deutschland).



## Abbildung Anhang 1: Schematische Abbildung der Probenverarbeitung, vom Transport bis zur Kryo-Einlagerung



Quelle: eigene Darstellung, F-IME.

**Abbildung Anhang 2A: Schwingmühle Palla VT-KM, KHD Humboldt Wedag (jetzt: MBE GmbH), geschlossenes System B: Einlauftrichter und Dosierrinne C: Auslaufrohr D: Titan-Mahlstäbe im Mahlrohr**



Quelle: eigene Darstellung, F-IME.

**Abbildung Anhang 3: Probenahmestellen: E: Auslaufrohr F: Auslaufkopf G: Titan-Mahlstäbe H: Mahlrohr**



Quelle: eigene Darstellung, F-IME.

Um das Vorhandensein von probenspezifischer DNA zu überprüfen, wurde eine Liste bereits zum Teil veröffentlichter Primer verwendet (siehe **Tabelle Anhang 3**). Die Reaktionsmischung bestand aus: 10 µL FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Deutschland), 1 µL Primer (10 pmol fw/rv), 8 µL DNA-freies Wasser, 1 µL DNA-Template. Die PCR-Bedingungen waren: 600 sek bei 95°C (Vorinkubation), gefolgt von 40 Zyklen von 10 sek bei 95°C (Denaturierung), 10 sek bei der spezifischen Annealingtemperatur (siehe **Tabelle Anhang 4**) und 10 sek bei 72°C (Elongation). Die Spezifität der amplifizierten Produkte wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft. Schmelzen: 10 sek bei 95°C, 60 sek bei 65 °C, 1 sek bei 95°C.

Die Ergebnisse der bisher durchgeführten Probenahmen zeigen, dass nach der Reinigung/Dekontamination noch DNA in den Geräten vorhanden ist (Tabelle 8). Die Schmelzkurvenanalyse zeigte das Vorhandensein spezifischer DNA in den DNA-Proben, allerdings deuten die hohen Cq-Werte (>32 Zyklen) darauf hin, dass die vorhandenen Mengen gering sind (siehe **Tabelle Anhang 4**).

**Tabelle Anhang 3: Primer, die für den Kontaminationstest verwendet wurden**

| Probenart | Primer Name | Primer Sequenz [5' . . . 3'] | Annealing Temp. [°C] | Fragmentgröße [bp] | Quelle       |
|-----------|-------------|------------------------------|----------------------|--------------------|--------------|
| Fichte    | ycf1-fw     | TTCCTTTTCGTTTGAAGCCTT        | 60                   | 200-300            | doi: 10.3732 |
|           | ycf1-rv     | TCTTATTCTGTAGATCCCATCAAT     |                      |                    |              |
| Aalmutter | ep2_fw      | TGCCTC CATCCTCATCCTCA        | 58                   | 250                | EU492262.1*  |
|           | ep2_rv      | TCCGAGGGCCTTATTTTCCG         |                      |                    |              |
| Brasse    | bream_fw    | CCAAAAGGATTAACGCTCAC         | 60                   | 103                | AP018425.1*  |
|           | bream_rv    | CTACGGTCAGAAGGAAGATG         |                      |                    |              |

\*Primerdesign vom F-IME

**Tabelle Anhang 4: qPCR-Ergebnisse des Kontaminationstests mit verschiedenen Probentypen.**

| Probenahme (Kalenderwoche) | Probenart                                  |   | CT Werte*        |           |         |
|----------------------------|--------------------------------------------|---|------------------|-----------|---------|
|                            |                                            |   | Fichte           | Aalmutter | Brasse  |
| 27                         | Fichtentriebe (Bayrischer Wald 2022)       | A | > 18,27          |           |         |
|                            |                                            | B | > 28,66          |           |         |
| 28                         | Fichtentriebe (Hochharz 2022)              | A | > 17,96          |           |         |
|                            |                                            | B | > 30,48          |           |         |
| 29                         | Aalmuttermuskulatur (Meldorfer Bucht 2022) | A | > 33,59          | > 18,92   |         |
|                            |                                            | B | > 32,29          | n.d.      |         |
| 30                         | Aalmuttermuskulatur (Mellum 2022)          |   | keine Probenahme |           |         |
|                            |                                            | B | 28,36            | > 25,94   |         |
| 30                         | Silbermöwenei (Varell-Mellum 2022)         | A | n.d.             | > 34,20   |         |
|                            |                                            | B | > 22,18          | > 25,13   |         |
| 30                         | Silbermöwenei (Heuwiese 2022)              | A | keine Probenahme |           |         |
|                            |                                            | B | n.d.             |           |         |
| 31                         | Blasentang (Königshafen 2021)              | A | n.d.             | n.d.      |         |
|                            |                                            | B | > 36,20          | n.d.      |         |
| 33                         | Blasentang (Varnkevitz 2021)               | A | keine Probenahme |           |         |
|                            |                                            | B | n.d.             | > 31,41   |         |
| 37                         | Brassenmuskulatur (Zehren 2022)            | A | > 32,39          | > 31,91   | > 17,96 |
|                            |                                            | B | > 34,99          | > 32,12   | > 30,50 |
| 38                         | Brassenmuskulatur (Barby 2022)             | A | n.d.             | > 31,58   | > 19,56 |
|                            |                                            | B | n.d.             | > 30,42   | > 31,24 |

\* Die Werte entsprechen den niedrigsten Cq-Werten der entnommenen Abstrichproben (Worst-Case-Szenario).

A = Proben wurden direkt nach der Mahlung genommen (als Positivkontrolle)

B = Proben wurden direkt nach dem Reinigungs-/Dekontaminationsprozess genommen

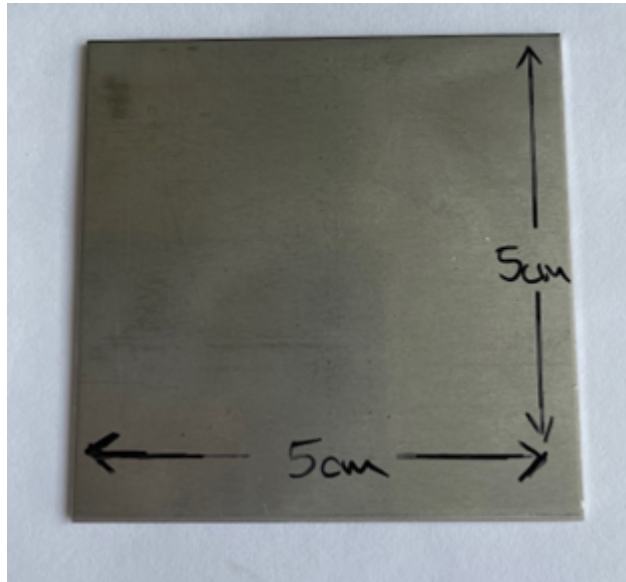
n.d. = nicht detektierbar

### A.2.2 Laboruntersuchungen zu verschiedenen Dekontaminationsstrategien

Um verschiedene Möglichkeiten zur Dekontaminierung von Geräten aus Edelstahl, die bei der Probenverarbeitung verwendet werden, zu bewerten, wurden im Labor verschiedene Strategien getestet. Zu diesem Zweck wurde eine verkleinerte Edelstahloberfläche in der Größe von 25 cm<sup>2</sup> vorbereitet (siehe **Abbildung Anhang 4**).

**Abbildung Anhang 4: Edelstahloberfläche des Labor-Dekontaminationstests**

---



Die zuvor gereinigten und autoklavierten Oberflächen wurden gemäß dem Routineverfahren des Labors mit Aalmutter-Muskel (homogenisierte Probe aus der UPB) "kontaminiert", indem ein Mikrolöffel des Pulvers auf die Oberfläche gegeben und mit demselben Löffel verteilt wurde. Nachdem die Oberflächen "kontaminiert" worden waren, wurden die folgenden Behandlungen durchgeführt:

T1: Reinigungsmittel (Pril), gefolgt von einer Spülung mit destilliertem Wasser (gemäß dem Routineprotokoll der UPB)

T2: T1 + Natriumhydroxid (0,2 M) + aqua dest

T3: T1 + Salpetersäure (max. 10%) + aqua dest

T4: T1 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ca. 10 %)

T5: T1 + UV-Licht (5 min)

T6: T1 + Autoklav (20 min, 121 °C)

T7: T1 + Spülmaschine (special, 10 min, 95 °C)

Die mit einem Tupfer abgestrichene und extrahierte Probe dient als DNA-Positivkontrolle (siehe **Tabelle Anhang 6**).

Unmittelbar nach der Anwendung jeder Behandlung wurden die Oberflächen mit sterilen Tupfern (Sarstedt, Artikel Nr. 80.625, Vucose, steril) beprobt, und die DNA wurde mit dem NucleoMag Tissue Kit (Macherey Nagel, Deutschland) zur DNA-Aufreinigung aus Zellen und Gewebe extrahiert. Anschließend wurde eine qPCR mit spezifischen Barcodes für Eelpout durchgeführt (siehe Tabelle 3). Die Reaktionsmischung bestand aus: 10 µL FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Deutschland), 1 µL Primer (10 pmol fw/rv), 8 µL DNA-freies Wasser, 1 µL DNA-Template. Die PCR-Bedingungen waren: 120 sek bei 90°C (Vorinkubation), gefolgt von 40 Zyklen von 5 sek bei 95°C (Denaturierung), 10 sek bei 58°C (Annealing) und 10 sek bei 72°C



(Elongation). Die Spezifität der amplifizierten Produkte wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft. Schmelzen: 10 sek bei 95°C, 60 sek bei 65°C, 1 sek bei 95°C.

Die Ergebnisse des Tests sind in Tabelle **Anhang 6** zusammengefasst. Die Behandlungen, die zu einer 100%-igen DNA-Entfernung (keine Amplifikation in der qPCR) führten, waren UV-Licht und die Reinigung mit der Spülmaschine, während die anderen Behandlungen zu einer Aalmutter-spezifischen Amplifikation führten, jedoch mit sehr späten Cq-Werten, was darauf hindeutet, dass Spuren von DNA in der Edelstahlplatte verblieben. Es ist wichtig anzumerken, dass die in diesem Test verwendete Spülmaschine sich von der in der UPB verwendeten unterscheidet, ebenso wie die verwendeten Reinigungsmittel. Dies könnte eine Erklärung für die DNA-Spuren sein, die nach der Reinigung/Dekontamination in der UPB in der Spülmaschine gefunden wurden.

**Tabelle Anhang 6: qPCR Ergebnisse des Dekontaminationstest**

| Behandlung       | Beschreibung                                                       | Cq*   | TM [°C] |
|------------------|--------------------------------------------------------------------|-------|---------|
| T1               | Händische Reinigung                                                | 32,34 | 86,32   |
| T2               | 0,2 NaOH                                                           | 29,82 | 86,4    |
| T3               | 10 % HNO3                                                          | 33,23 | 86,22   |
| T4               | 10 % H2O2                                                          | 30,77 | 86,14   |
| T5               | UV-Licht                                                           | n.d.  | n.d.    |
| T6               | Autoklav                                                           | 32,51 | 86,37   |
| T7               | Spülmaschine                                                       | n.d.  | n.d.    |
| Positivkontrolle | Probenmaterial der ungereinigend Oberfläche mit dem Abstrichtupfer | 18,47 | 86,22   |
| Positivkontrolle | Aalmutter (fisches Muskelgewebe)                                   | 13,13 | 86,23   |
| Negativkontrolle | Mastermix                                                          | n.d.  | n.d.    |

### A.2.3 Qualitätssicherung - Kontaminationstest für eDNA in der Kryomühle

Besonders wichtig, um die Reinheit von UPB-Homogenaten einzuschätzen, ist zu evaluieren, ob eine Kontamination von eDNA-Spuren bei der Prozessierung verschiedener Proben auftritt. Um



das abschätzen zu können, wurde die Reihenfolge prozessierter Proben aus der Kryomühle herangezogen. So wurden Proben identifiziert, die unmittelbar hintereinander vermahlen wurden. Für den folgenden Versuch wurden Baumproben der UPB verwendet, die auf eDNA-Spuren von Arthropoden untersucht wurden. Jede Baumart beherbergt typische monophage Arten von Arthropoden, die nur auf dieser Baumart zu finden sind. Falls eine Kontamination auftritt, sollten in Proben unterschiedlicher Baumarten, die nacheinander prozessiert wurden, eDNA-Spuren typischer Gliederfüßerarten einer anderen Baumart gefunden werden. Das wurde für je ein Probenpaar Kiefer-Fichte und Pappel-Buche untersucht, die 2016 nacheinander in der Kryomühle prozessiert wurden. Die Proben wurden auf eine große Sequenzierentiefe sequenziert, um auch geringe DNA-Spuren nachzuweisen. Wie Tabelle zeigt, sind keine Spuren von eDNA-Kreuzkontamination zwischen den Proben ersichtlich. Baumart-spezifische Arthropoden sind auf ihrer jeweiligen Wirtsart in großer Readzahl zu finden, nicht aber in der nachfolgend prozessierten Baumprobe einer anderen Art.

**Tabelle Anhang 7: Readzahl der 10 häufigsten Wirts-spezifischen Arten von Arthropoden, die aus Blattproben einer Pappel und einer Kiefernblattprobe der UPB von 2016 nachgewiesen wurden**

| Order       | Genus          | Species        | Wirtsart     | Beech_2014  | Poplr_2016 | Beech_2016  | Beech_2018  |
|-------------|----------------|----------------|--------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| Lepidoptera | Phyllonorycter | populifoliella | Pappel       | 0           | 18643      | 0           | 0           |
| Lepidoptera | Gypsonoma      | aceriana       | Pappel       | 0           | 8368       | 0           | 0           |
| Hemiptera   | Pemphigus      | spirothecae    | Pappel       | 0           | 6426       | 0           | 0           |
| Lepidoptera | Stigmella      | trimaculella   | Pappel       | 0           | 6302       | 0           | 0           |
| Lepidoptera | Subacronicta   | megacephala    | Pappel       | 0           | 2407       | 0           | 0           |
| Lepidoptera | Gypsonoma      | oppressana     | Pappel       | 0           | 1744       | 0           | 0           |
| Lepidoptera | Phyllonistis   | unipunctella   | Pappel       | 0           | 1609       | 0           | 0           |
| Lepidoptera | Stegania       | trimaculata    | Pappel       | 0           | 760        | 0           | 0           |
| Lepidoptera | Ectoedemia     | hannoverella   | Pappel       | 0           | 603        | 0           | 0           |
| Lepidoptera | Ancylis        | laetana        | Pappel       | 0           | 283        | 0           | 0           |
| Total_Reads |                |                |              | 88468       | 106565     | 86380       | 103180      |
| Order       | Genus          | Species        | Host_species | Spruce_2014 | Pine_2016  | Spruce_2016 | Spruce_2018 |
| Lepidoptera | Cedestis       | subfasciella   | Kiefer       | 0           | 10544      | 0           | 0           |
| Hemiptera   | Pineus         | pini           | Kiefer       | 0           | 7570       | 0           | 0           |
| Lepidoptera | Exoteleia      | dodecella      | Kiefer       | 0           | 5701       | 0           | 0           |
| Hemiptera   | Eulachnus      | brevipilosus   | Kiefer       | 0           | 4416       | 0           | 0           |
| Hemiptera   | Eulachnus      | agilis         | Kiefer       | 0           | 748        | 0           | 0           |
| Hemiptera   | Eulachnus      | sp.            | Kiefer       | 0           | 251        | 0           | 0           |
| Hemiptera   | Schizolachnus  | pineti         | Kiefer       | 0           | 147        | 0           | 0           |
| Hemiptera   | Eulachnus      | brevipilosus   | Kiefer       | 0           | 68         | 0           | 0           |
| Hemiptera   | Phytocoris     | pini           | Kiefer       | 0           | 66         | 0           | 0           |
| Lepidoptera | Cedestis       | sp.            | Kiefer       | 0           | 33         | 0           | 0           |
| Total_Reads |                |                |              | 17642       | 53155      | 99294       | 74568       |

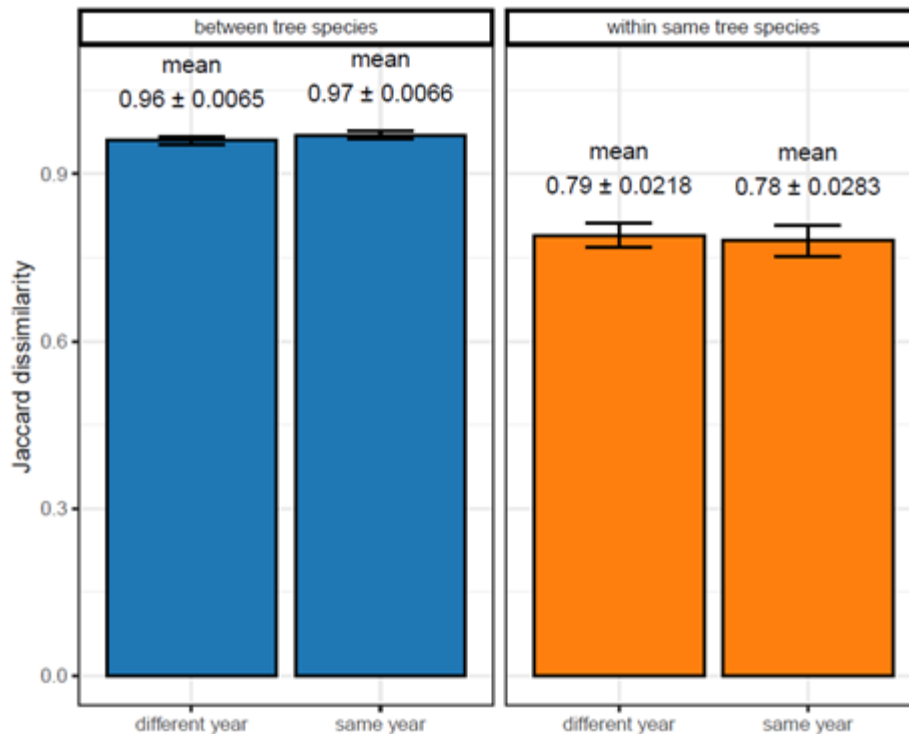
Rechts neben der Probe ist die Baumprobe eingetragen, die unmittelbar folgend in der Kryomühle prozessiert wurde (eine Buche von 2016 nach der Pappel und eine Fichte von 2016 nach der Kiefer). Davor und danach sind jeweils Proben vom selben Standort dargestellt, die im Vorjahr oder Folgejahr gesammelt wurden. Die Gesamtreadzahl für jede Probe ist unterhalb der Tabelle dargestellt. Trotz hoher Sequenzierentiefe von gut 100,000 Reads, ist keine Kreuzkontamination von eDNA zwischen Mahlgängen ersichtlich.

In einem weiteren Versuch wurde die Beta-Diversität zwischen Baumproben untersucht, die unmittelbar hintereinander oder in verschiedenen Jahren in der Kryomühle prozessiert wurden. Eine Kontamination zwischen Baumproben, die direkt nacheinander prozessiert wurden, sollte zu einer signifikanten Abnahme der Beta-Diversität führen. Auch dieser Effekt ist nicht sichtbar

(Abbildung Anhang 5). Eine Kontamination von eDNA-Spuren bei der Kryovermahlung ist daher unwahrscheinlich. Die Ergebnisse dieser Tests wurden auch in Krehenwinkel et al. (2022a) vorgestellt.

Vergleiche verschiedener Baumarten sind in Blau, Vergleiche innerhalb der gleichen Baumart in Orange dargestellt. Eine Kreuzkontamination zwischen Mahlgängen würde eine signifikante Reduktion der Beta-Diversität erwarten lassen, das ist hier nicht der Fall.

**Abbildung Anhang 5: Beta-Diversität der Arthropodengemeinschaft zwischen UPB-Baumproben, die im selben Jahr unmittelbar konsekutiv in der Kryomühle prozessiert wurden (same year) oder in verschiedenen Jahren prozessiert wurden (different year).**



Quelle: eigene Darstellung, UT.

#### A.2.4 Qualitätssicherung – Kreuzkontaminationen, UPB, Projektgruppe UT

Ein wichtiger biologischer Faktor in Ökosystemen ist die Zusammensetzung der gesamten Lebensgemeinschaft. Durch die regulären Probennahmen der UPB eröffnet sich ein bisher ungenutztes Fenster, zu denselben Zeitpunkten mittels DNA aus Wasserproben vor Ort die Lebensgemeinschaften der Standorte zu dokumentieren. Am 14. und 15.8.2023 wurden durch die UPB in der Saar Brassen beprobt. Wir haben von den Mitarbeitern der UPB vom selben Standort vier Mal 1l Wasser von verschiedenen Orten am Gewässer und zu verschiedenen Zeitpunkten der Probenahme erhalten. Am 14.8.2023 wurden vom Ufer der Saar und vom Ort des aufzubauenden Netzes Wasserproben genommen. Am 15.8.2023 wurde eine Wasserprobe jeweils vor und nach dem Einholen des Netzes gesammelt. Die Wasserproben wurden am selben Tag gefiltert und die Filterpapiere bis zur DNA-Extraktion eingefroren.

Die vorhandene DNA wurde durch mechanisches Behandeln der Filter mit Keramikkügelchen gelöst. Durch das Qiagen Puregene Tissue Kit ist die DNA isoliert und anschließend durch ein

PCR-Verfahren mit speziellen Fisch-mitochondrien Primer Sequenzen amplifiziert worden (Tabelle Anhang 7).

**Tabelle Anhang 7: Primer-Details um die Fisch-Lebensgemeinschaft der Wasserproben am Brassen Probenahme Standort festzustellen.**

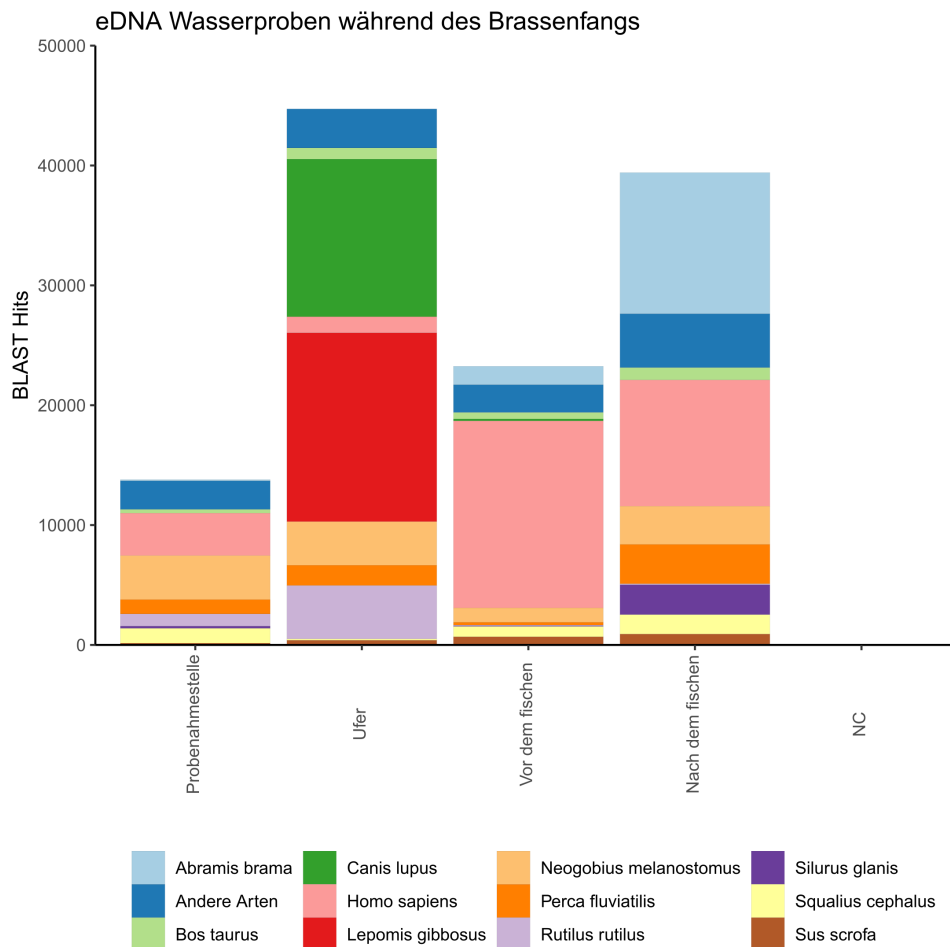
| Primer Name | Richtung  | Sequenz (5'-3')                                           |
|-------------|-----------|-----------------------------------------------------------|
| Tele02_F    | Vorwärts  | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAACTCGTGCCAGCCACC          |
| Tele02_R    | Rückwärts | GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTGGGTATCTAATCCCAGTTT<br>G |

Die PCR-Produkte sind über den Illumina MiSeq der Arbeitsgruppe Biogeographie sequenziert worden und die Daten liegen vor. Die Sequenzen wurden nach der Sequenzier-Adapter und Primer-Sequenz Entfernung mittels BLAST gegen die ‚nr‘ (nicht redundant) Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) gesucht und zu einem Taxon zugeordnet.

Die vorläufigen Ergebnisse sind in Abbildung Anhang dargestellt. Wie zu erwarten war, finden wir eine gänzlich andere Lebensgemeinschaft zwischen Ufer und Standort des Netzes. Im Besonderen finden wir kaum Brassen Treffer. Das ändert sich am Folgetag, nachdem das Netz bereits aufgestellt worden war. Nun finden wir etwas Brassen aber auch einen enormen menschlichen Anteil in den Treffern. Besonders viel DNA reichert sich direkt nach dem Einholen des Netzes im Bereich der Probenahme an.

Vorläufig zu diesen Funden können wir sagen, dass die Aufnahme von Wasserproben in den regulären Probenahmezyklus zu einem bestimmten Zeitpunkt stattfinden muss. Ob die Gemeinschaft besser vor oder nach dem Netzaufstellen abgebildet werden kann, wird im nächsten Zwischenbericht ausgewertet. Das Ufer ist eher ungeeignet, da es eine gänzlich andere Zusammensetzung und viele terrestrische Einflüsse zeigt. Die starke Anreicherung an Brassen-DNA direkt nach dem Einholen des Netzes erscheint zunächst auch ungünstig für das Vorhaben.

## Abbildung Anhang 6: Darstellung der mit eDNA rekonstruierten Lebensgemeinschaft am Saar-Standort der Brassen-Probennahme vom 14./15.8.2023



Die Wasserproben für „Probenahmestelle“ und „Ufer“ wurden am 14.8.2023 vor dem Aufbau des Netzes gesammelt. Die Proben von „Vor dem Fischen“ und „Nach dem Fischen“ stammen vom 15.8.2023 an der Stelle wo das Netz sich befand. Die häufig aufgetretenen Arten sind farblich hervorgehoben, unter „Andere Arten“ finden sich die restlichen BLAST-Treffer.  
Quelle: eigene Darstellung, UT.

### Verarbeitung der Proben vor der Homogenisierung

Um die Betriebsabläufe der UPB-Projektgruppe Trier im Hinblick auf DNA-basierte Methoden zu optimieren, wurden zwei Untersuchungen auf Kontamination durchgeführt. Proben können kontaminiert werden durch gebundene DNA (1) auf Oberflächen mit denen sie direkt oder indirekt in Kontakt kommen oder (2) an freien Partikeln in der Luft, im Folgenden als Luftpartikel bezeichnet. Wir wollten für beide Fälle herausfinden, (i) was die potenziellen Quellen von Kontamination sind, (ii) welche Veränderungen der Kontamination nach festgelegten Zeitabständen identifizierbar sind, und (iii) welche Arten von Kontamination wir feststellen können. Wir präsentieren in diesem Zwischenbericht die vorläufigen Ergebnisse dieser Untersuchungen.

### Oberflächenkontamination

Zwischen Probenahmen und der Verarbeitung der Proben werden die Oberflächen in den Laboren der UPB-Projektgruppe Trier gereinigt durch vollentsalztes (VE) Wasser. Werkzeuge und Gefäße durchlaufen einen maschinellen Spülvorgang. Mittels steriler Tupfer (Swabs) wurden Abstriche von 19 Oberflächen aus drei Probenkontakt-Kategorien genommen (Tabelle),

wodurch die (i) potenziellen Quellen von Kontamination identifiziert werden können. Die Abstriche alle Oberflächen wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt, (ii) um weiterhin festzustellen, ob oder wie sich die potenziell festgestellte Kontamination über die Zeit verändert. Die gewählten Zeitpunkte waren der 14.8.2023, einen Tag bevor die geplante Brassen-Probenahme und die Aufarbeitung der Fische in Trier stattfinden sollte, sowie der 15.8.2023, dem Tag direkt nach der Probenahme, Aufarbeitung und Reinigung. Ein letztes Mal wurden Abstriche der Oberflächen am 18.8.2023 genommen.

Die vorhandene DNA des Abstriches wurde durch mechanisches Behandeln der Tupfer mit Keramik Kügelchen gelöst. Durch das Qiagen Puregene Tissue Kit ist die DNA isoliert und anschließend durch ein PCR-Verfahren mit allgemeinen mitochondrialen Primern zu Sequenzen amplifiziert worden (**Tabelle Anhang 8**).

Über dieses Verfahren konnte anschließend ermittelt werden (iii) mit welcher Art von Kontamination in der UPB-Projektgruppe Trier an den jeweiligen Oberflächen gerechnet werden kann. Die PCR-Produkte sind über den Illumina MiSeq der Arbeitsgruppe Biogeographie sequenziert worden und die Daten liegen vor. Die Sequenzen wurden nach der Sequenzier-Adapter und Primer-Sequenz Entfernung mittels BLAST gegen die ‚nr‘ (nicht redundant) Datenbank des NCBI gesucht und zu einem Taxon zugeordnet.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit entschieden wir uns nur die UPB relevanten Arten farblich hervorzuheben. Zusätzlich sind Suchergebnisse auf Mensch, eines häufig gefundenen Bakteriums (*Penicillium sclerotiorum*) und eines Schimmelpilzes (*Anthrocladium fulminans*) farblich unterschieden. Alle anderen Suchergebnisse wurden unter ‚Andere Arten‘ gruppiert und zählen als Umweltkontamination zusammen mit den drei zuletzt genannten. Viele dieser Arten kommen häufig an Gegenständen und Oberflächen vor, die ungeschützt Staubpartikeln ausgesetzt sind.

**Tabelle Anhang 8: Oberflächen-Kategorien zur Untersuchung von Kontamination an der UPB-Projektgruppe Trier**

| Kategorie 1<br>Direkter Probenkontakt                         | Kategorie 2<br>Primäre Arbeitsflächen | Kategorie 3<br>Sonstige Flächen |
|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Edelstahlgefäß innen (alle Proben)                            | Cleanbench                            | Isolierbehälter außen           |
| Edelstahlwanne innen (Blätter + Dreikantmuscheln)             | Biometrietisch Außenbiometrie         | Innenseite Schubläden/Schränke  |
| Edelstahlkörbe (Blasentang + Miesmuscheln)                    | Biometrietisch im Labor               | Waagen                          |
| Teflonbeutel innen (Rehlebern)                                | Arbeitsfläche links im Labor          | Zentrifuge                      |
| Petrischalen innen (Regenwürmer + Fischlebern)                | Trockenschrank                        | Griffe Dewar                    |
| Sezierbesteck/Skalpellklingen (Muscheln, Fische, Regenwürmer) |                                       | Cryohandschuhe innen            |
| Teflonplättchen (Fischlebern)                                 |                                       | Tastatur PC Cryolager           |

**Tabelle Anhang 9: Primer-Details um die Kontamination in der UPB-Projektgruppe Trier zu untersuchen**

| Primer Name | Richtung  | Temp | Sequenz (5'-3')            |
|-------------|-----------|------|----------------------------|
| MCO_IntF    | Vorwärts  | 46°C | GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC |
| Fol_deg_rev | Rückwärts | 46°C | TANACYTCNGGRTGNCCRAARAAYCA |

Da am 15.8.2023 im Rahmen der regulären Probenahme in der UPB-Projektgruppe Trier Brassen (*Abramis brama*) verarbeitet wurden, sind wir in der Lage die Rückstände dieser Art im speziellen nachzuverfolgen. Beginnend am 14.8.2023 finden wir lediglich eben beschriebene Umweltkontamination an Edelstahlwannen, -körben und den Rehleber-Beuteln der Oberflächen mit direktem Probenkontakt (**Abbildung Anhang 7**). Auf einigen primären Arbeitsflächen finden wir noch Rückstände von Brassen-DNA, jedoch überwiegt die Umweltkontamination auf allen nicht-abgedeckten und Staub ausgesetzten Arbeitsflächen. Unter den sonstigen Flächen findet sich ebenfalls Brassen-DNA, insbesondere an den Waagen, den Dewar Griffen und besonders viel an der Zentrifuge. Diese Oberflächen kommen jedoch nicht mit den Proben direkt in Kontakt.

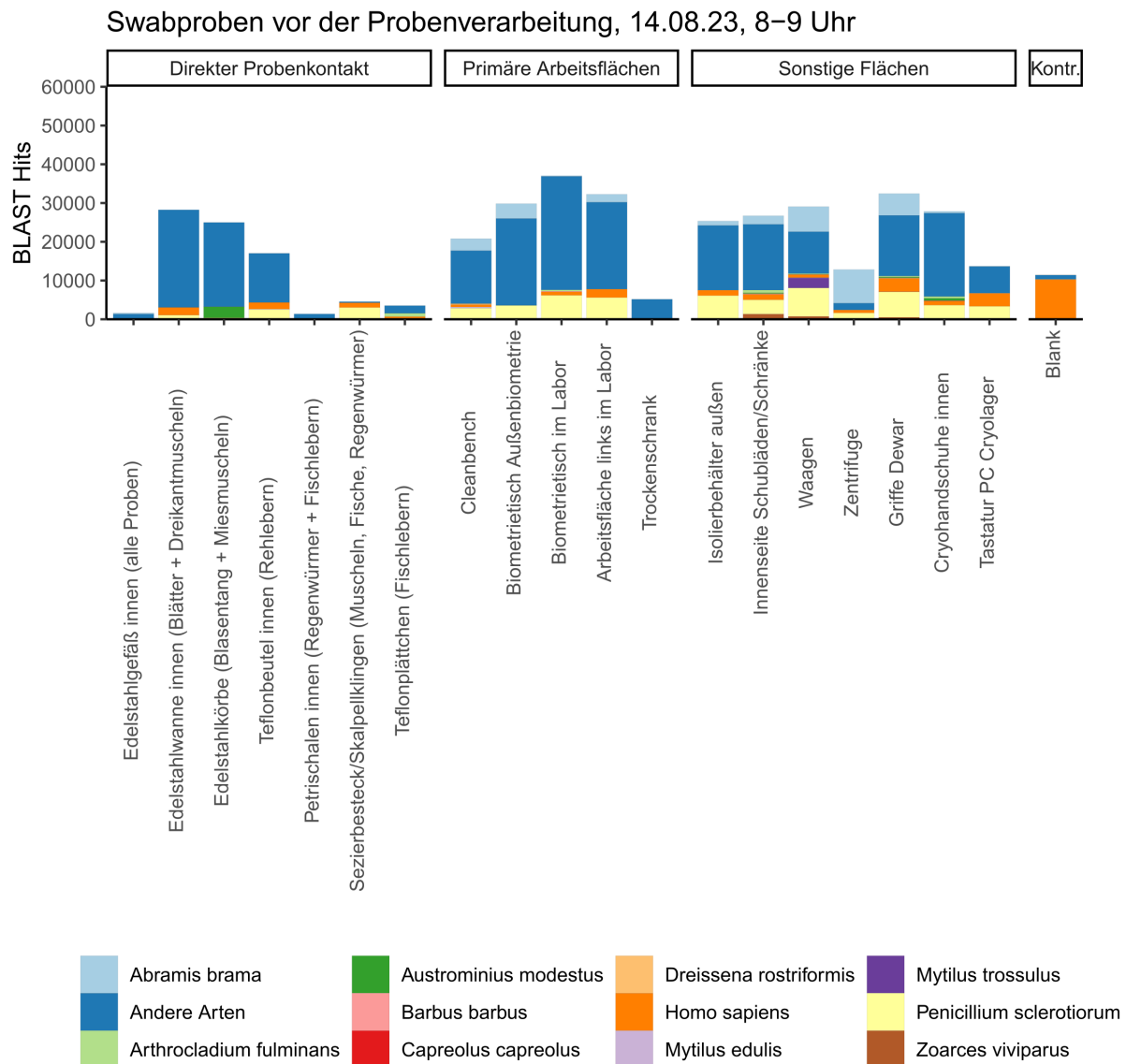
Am 15.8.2023 wurden erneut Abstriche von allen untersuchten Flächen genommen. Der generelle Trend deutet darauf hin, dass die Umweltkontamination anschließend bei fast allen primären Arbeitsflächen und denen mit direktem Probenkontakt einbricht (**Abbildung Anhang 8**). Ausnahmen sind die Edelstahlkörbe für Miesmuschelproben, Teflonplättchen, die Cleanbench und der Trockenschrank.

Brassenspezifische Treffer finden wir an diesem Tag vermehrt am Sezierbesteck, der Cleanbench, dem Biometrietisch und den Arbeitsflächen links im Labor. Bei den sonstigen Flächen finden wir wenig Veränderungen, abgesehen von einem vermehrten Auftreten von Brassen-DNA.

Betrachten wir dann die Abstriche ein paar Tage später sieht man, dass die Umwelt-Kontamination bei den primären Arbeitsflächen wieder zu nimmt und auf vielen Flächen reduzieren sich die Brassenspezifischen Treffer leicht (**Abbildung Anhang 9-11**).

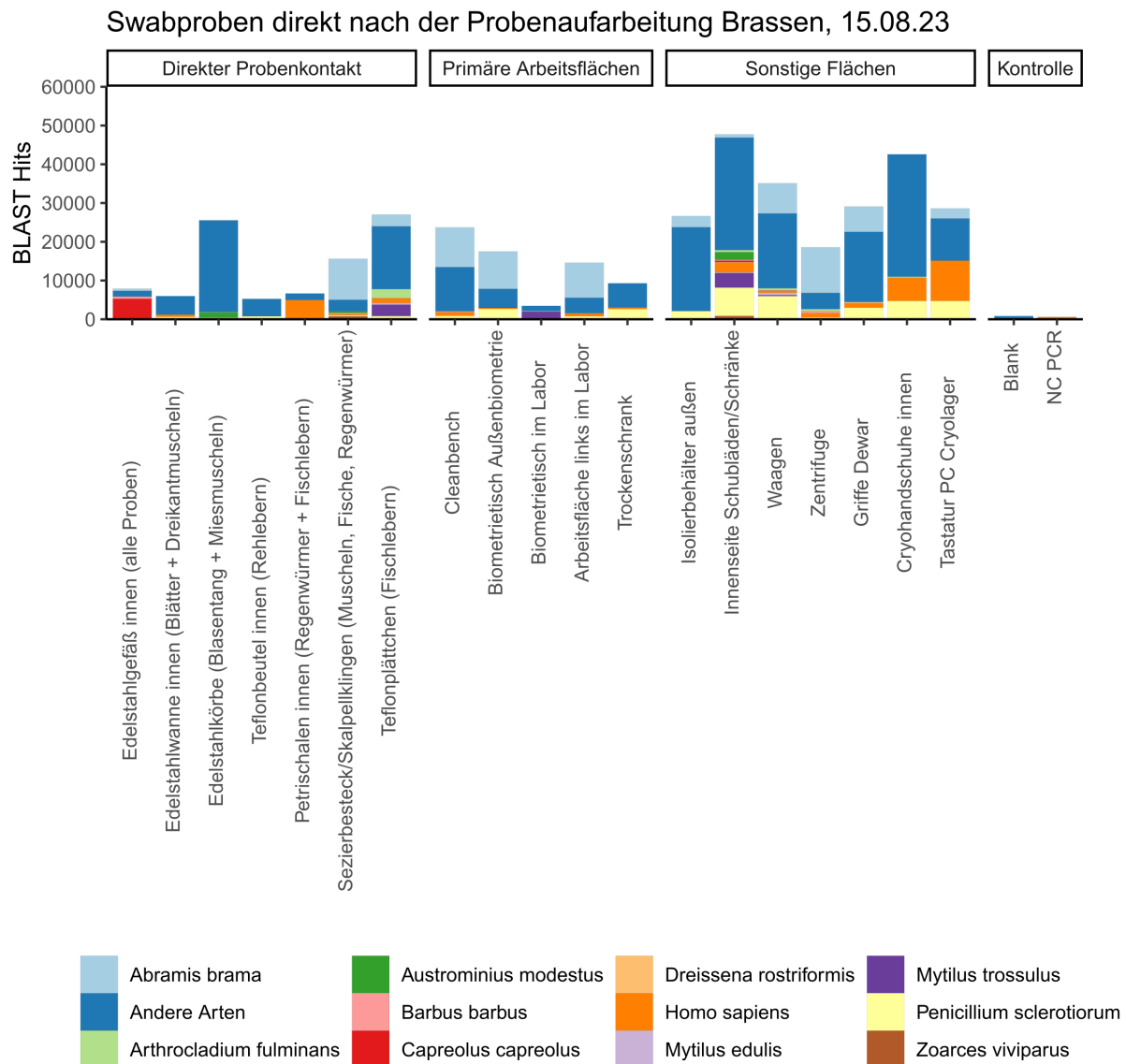


**Abbildung Anhang 9: Darstellung der absoluten Suchtreffer von Oberflächen Abstrichen am 14.8.2023**



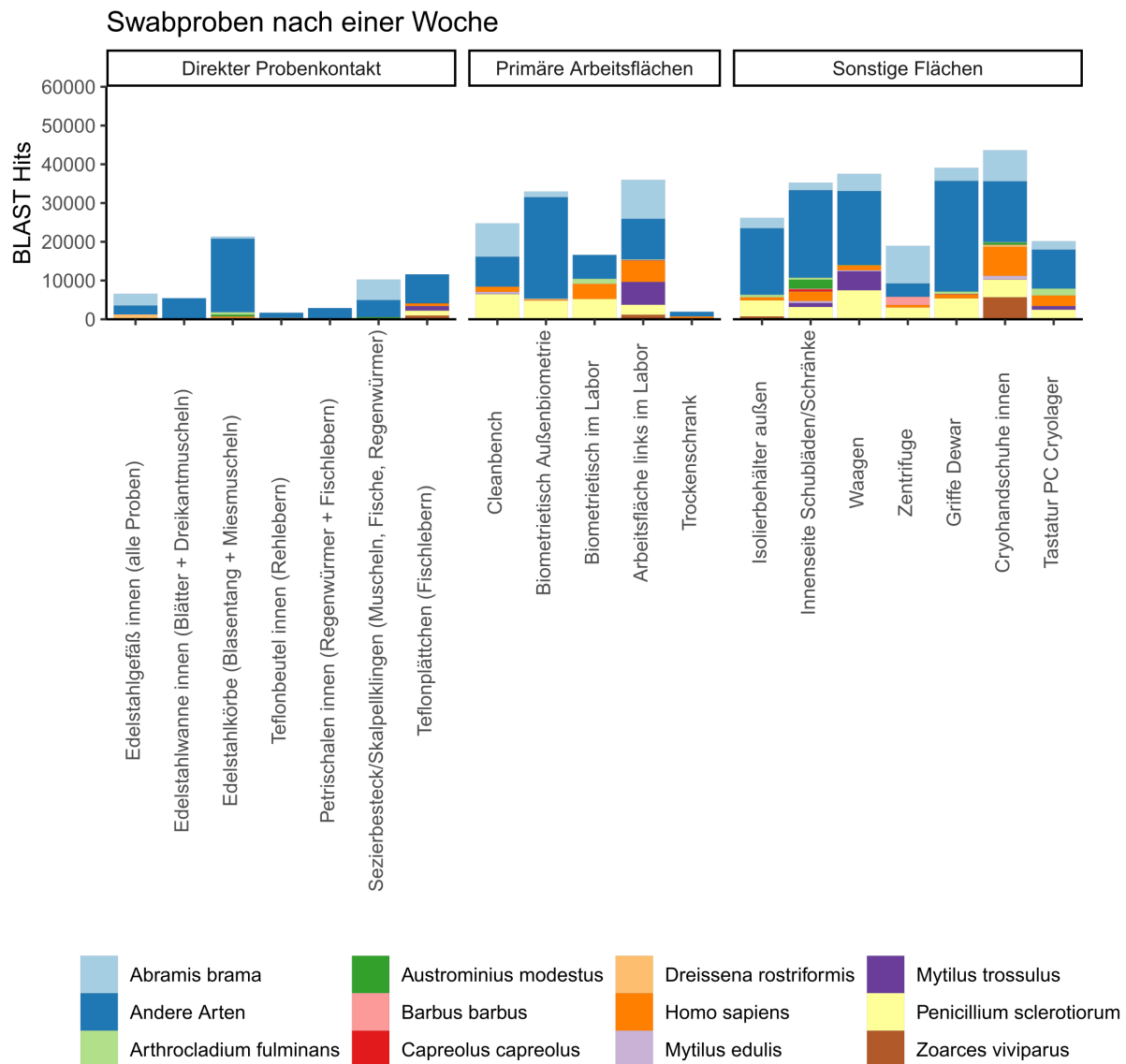
Die Flächen sind unterteilt nach Ihrer Kontaktart mit den zu verarbeitenden Proben an der UPB-Projektgruppe Trier. Die Kontrolle stammt von einem unbenutzten Tupfer. Unter „Andere Arten“ sind alle Taxon Treffer zusammengefasst, die nicht als UPB-Probe bearbeitet werden, oder die sehr wenige Treffer bei der Suche ergaben. Quelle: eigene Darstellung, UT:

**Abbildung Anhang 10: Darstellung der absoluten Suchtreffer von Oberflächen Abstrichen am 15.8.2023**



Die Flächen sind unterteilt nach ihrer Kontaktart mit den zu verarbeitenden Proben an der UPB-Trier. Die Kontrolle stammt von einem unbenutzten Tupfer. Als „NC PCR“ (Negativkontrolle) wird eine PCR-Reaktion ohne zugesetzte Probe bezeichnet, welches die Reagenzien auf vorherige DNA-Kontamination testet. Unter „Andere Arten“ sind alle Taxon-Treffer zusammengefasst, die nicht als UPB-Probe bearbeitet werden, oder die sehr wenige Treffer bei der Suche ergaben. Quelle: eigene Darstellung, UT.

**Abbildung Anhang 11: Darstellung der absoluten Suchtreffer von Oberflächen Abstrichen am 18.8.2023**



Die Flächen sind unterteilt nach Ihrer Kontaktart mit den zu verarbeitenden Proben an der UPB-Projektgruppe Trier. Unter „Andere Arten“ sind alle Taxon Treffer zusammengefasst, die nicht als UPB-Probe bearbeitet werden, oder die sehr wenige Treffer bei der Suche ergaben. Quelle: eigene Darstellung, UT.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die allgemeine Umweltkontamination bemerkenswerterweise eine größere Belastung darstellt als Treffer von Arten, die in der UPB-Projektgruppe Trier bearbeitet werden. Diese sind nicht in signifikanten Mengen aufgetaucht. Als Ausnahme sehen wir die Brassen, welche vor den zwei letzten Abstrich-Zeitpunkten verarbeitet wurden. Dementsprechend erscheint die Reinigung mit VE-Wasser als effektiv genug in dem Sinne, dass die Kontamination zwischen den Probenahmen nicht sonderlich akkumuliert wird. Die Kontamination von den verarbeiteten Arten selbst baut sich anscheinend über die Zeit ab, was mit der zunehmenden Umweltkontamination zusammenhängen könnte.

Die hier präsentierten Ergebnisse durchlaufen momentan weitere statistische Auswertungen. Im kommenden Zwischenbericht werden wir die abschließenden Ergebnisse vorstellen und

entsprechende Empfehlungen zur weiteren Reduktion der Gefahr für Kontaminationen darlegen.

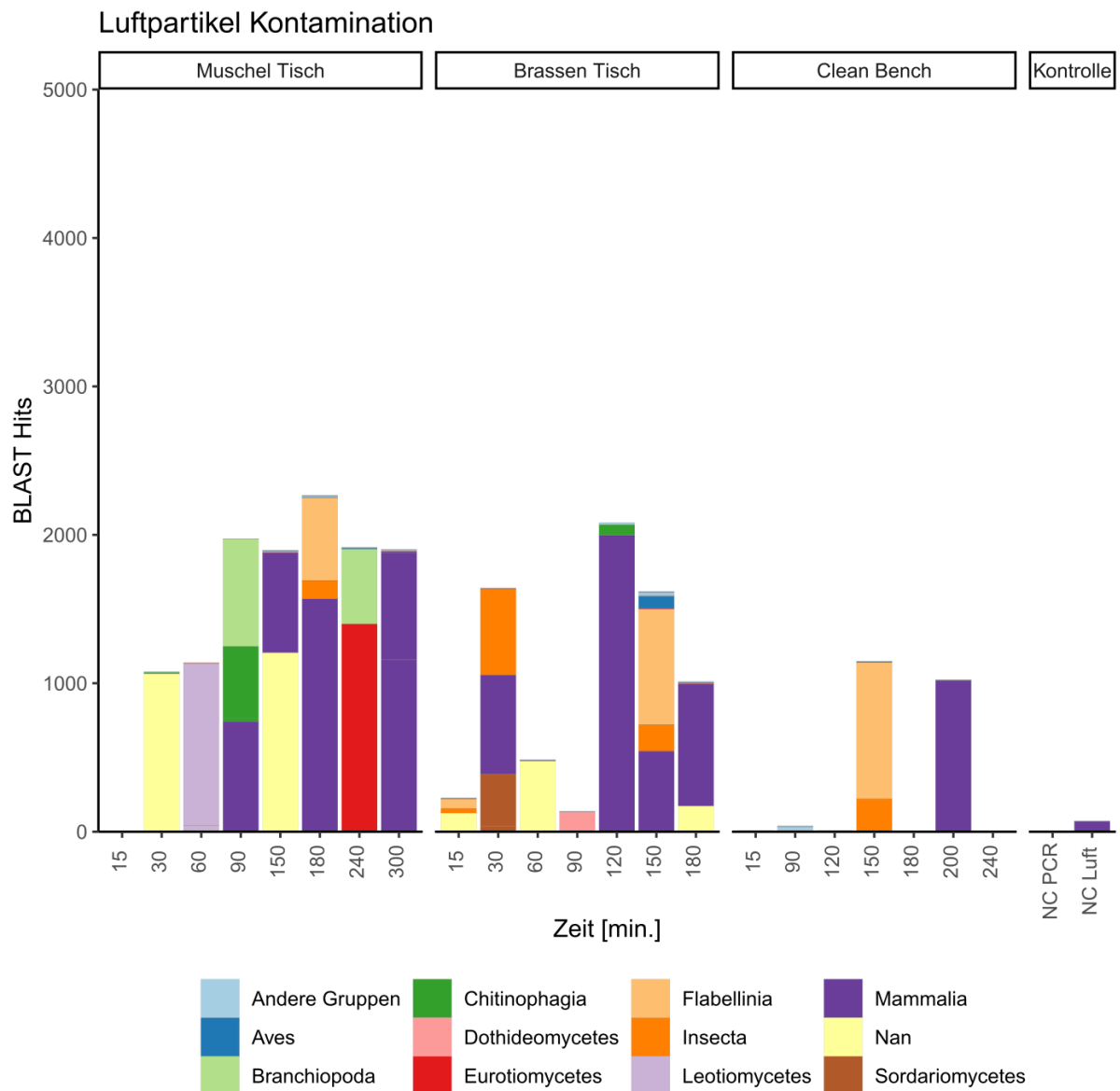
### **Luftpartikel Kontamination**

Der zweite Teil der Untersuchungen von potenziellen Kontaminationsquellen an der UPB-Trier beschäftigt sich mit der Frage nach Luftübertragung. Staubpartikel könnten verantwortlich sein für den graduellen Anstieg der Umweltkontamination im Teil ‚Oberflächenkontamination‘. Der Versuchsaufbau bestand aus einer Reihe von 1,5ml Reaktionsgefäßen, die mit dem gleichen Volumen an Zellysepuffer befüllt waren. Der Versuch wurde am 14.8.2023 durchgeführt. Wir stellten sicher, dass der Puffer keine flüchtigen Bestandteile enthielt, die sich potenziell an den Proben der UPB niederlassen können. Die Mischung besteht aus 1M Tris (pH8), 5M NaCl, 0,5M EDTA (pH8) und 10 % SDS. Des Weiteren wurden die Reaktionsgefäße am jeweiligen Standort in einem passenden Halter vor dem Umfallen gesichert. Als Standorte wurden drei Hauptarbeitsflächen ausgewählt, die auch mit Abstrichen auf Kontamination überprüft wurden: der Tisch an dem die Muscheln verarbeitet werden, der Tisch für die Brassen-Außenbiometrie und die aktive Cleanbench. Die Proben wurden gesammelt, indem die offenen Reaktionsgefäße im Halter der Umgebung ausgesetzt wurden. Nach einem festgelegten Zeitplan wurden nacheinander die Gefäße geschlossen. Die DNA-Extraktion, PCR und Auswertung erfolgte wie beschrieben in Teil ‚Oberflächenkontamination‘.

Die Ergebnisse aus **Abbildung Anhang 12** können positiv bewertet werden. Negativkontrollen zeigen, dass der verwendete Puffer und die PCR frei von Umweltkontamination sind. Die gefundenen Treffer sind durchgehend sehr wenige im Vergleich zu den Abstrichen. Das impliziert bereits eine sehr geringe Gefahr für Kontamination durch Luftpartikel. Die Menge der Kontamination ist zudem unterschiedlich von Standort zu Standort. Die Cleanbench hat zum Zeitpunkt des Versuches aktiv Luft über die Proben abgesaugt und wir können dort die geringste Kontamination feststellen. Man würde zudem erwarten, dass sich Kontamination graduell über die Zeit aufbaut. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Umweltkontaminationen über die Luft zufällig geschehen.

Die gefundenen Treffer stammen auch hauptsächlich von Mammalia; im Detail sehen wir, dass sie zum Großteil menschlichen Ursprungs sind. Ansonsten tauchen sehr viele Pilz- und Bakterien-Treffer auf. Nur sehr wenige Treffer können wir UPB-relevanten Arten zuordnen. Eine detaillierte statistische Auswertung wird im nächsten Zwischenbericht präsentiert.

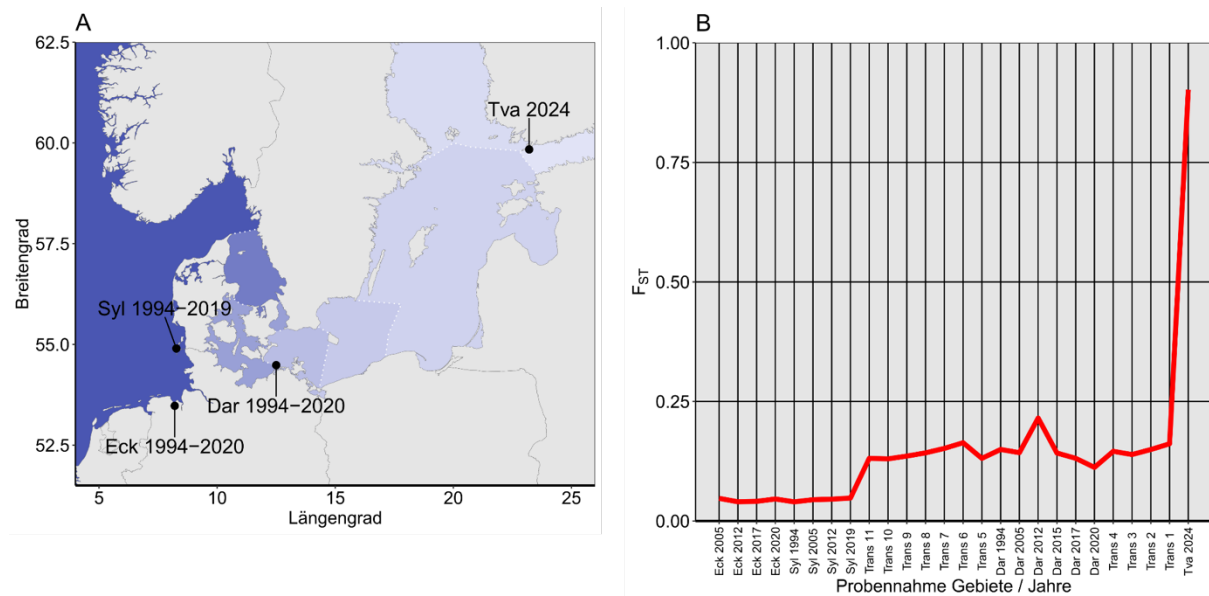
**Abbildung Anhang 12: Darstellung der absoluten Suchtreffer von Luftpartikel Kontaminationen am 14.8.2023**



Die Ergebnisse sind nach den Standorten der Probengefäße unterteilt. Als „NC PCR“ (Negativkontrolle) wird eine PCR-Reaktion ohne zugesetzte Probe bezeichnet, welches die Reagenzien auf vorherige DNA-Kontamination testet. Die „NC Luft“ Kontrolle stammt von einem Reaktionsgefäß, welches nicht offen der Luft ausgesetzt wurde. Es soll den Zellysepuffer auf vorhergehende DNA-Kontamination testen. Unter „Andere Gruppen“ sind alle Taxon Treffer zusammengefasst, die nicht zu denjenigen gehören, die die meisten Treffer bei der Suche ergaben. Die Gruppe „Nan“ umfasst viele Bakterien, die in der Datenbank nicht mit Klassen eingeteilt wurden. Quelle: eigene Darstellung, UT.

### A.3 Hybridisierungsanalyse *Mytilus*

Abbildung Anhang 13: Durchgeführte zusätzliche Auswertung zur Artreinheit der Miesmuschel Proben

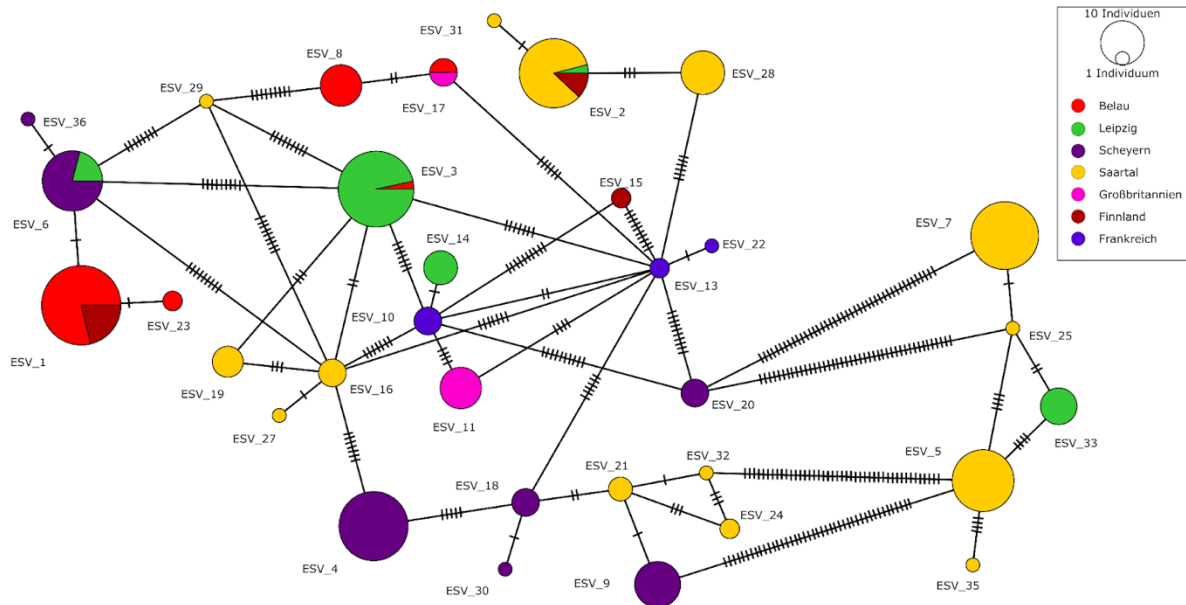


(A) Die Probenahmegebiete (Eckwarderhörne 'Eck'; Sylt 'Syl'; Darsser Ort 'Dar') der Umweltprobenbank und der zusätzliche Standort in Finnland (Tvärminne 'Tva') und die Zonierung der Ostsee nach Salinitäten (verändert nach <https://ostsee-der-zukunft.experience-science.de/hintergruende/einflussfaktoren/salzgehalt.html>). (B) Genomische Differenzierung ( $F_{ST}$ ) von zwischenartlichen fixierten Nukleotidpolymorphismen. Zwischen den Proben von Eckwarderhörne 1994 (*Mytilus edulis*) und Tvärminne 2024 (*Mytilus trossulus*) wurden alle Polymorphismen identifiziert, die stark zwischen den Arten differenziert sind ( $F_{ST} \geq 0,9$ ). Dieser reduzierte Datensatz wurde dann zwischen Eckwarderhörne 1994 und allen anderen Proben verwendet um den gesamtgenomischen Durchschnitt zu berechnen. Zusätzliche Proben wurden 2019 von der Umweltprobenbank in Transketen (Trans.1-11) innerhalb von 30 km um den Darsser Ort gesammelt und sind ebenfalls in diesem Datensatz ausgewertet. Die einzelnen Proben sind nach Jahre (links nach rechts aufsteigend) und geographischer Reihenfolge (links: Westen; rechts: Osten) sortiert. Quelle: eigene Darstellung, UT.



#### A.4 Analyse der genetischen Diversität von *Lumbricus terrestris*

**Abbildung 13: Genetische Verwandtschaft der ESVs der vier Probenahme­flächen (Belau, Leipzig, Scheyern, Saartal) der Sonderbeprobung.**



Ein Kreis repräsentiert dabei ein ESV, also eine einzigartige COI-Sequenz. Die Striche auf den verbindenden Linien zeigen, durch wie viele Sequenzunterschiede sich die ESVs unterscheiden und zeigt damit die genetische Verwandtschaft. Die Größe der Kreise ist proportional zur Anzahl der Individuen, in denen die ESV gefunden wurde. Die Farbe gibt an, auf welcher Probenahme­fläche die Individuen gesammelt wurden. Quelle: eigene Darstellung, UT.

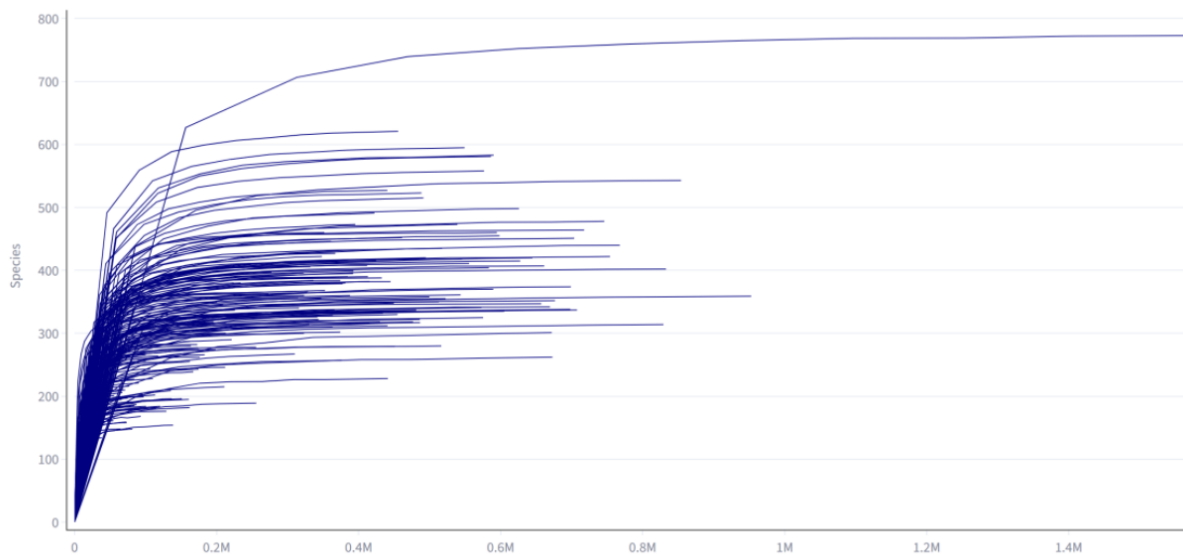
## A.5 Schwebstoffproben – 16S-Metabarcoding-Daten

Die Daten des 3. genetischen Markers für die Schwebstoff-Zeitreihe liegt vor, wurde aber noch nicht im Detail ausgewertet. Hier wird eine kurze Übersicht über vorläufige Ergebnisse aus der Masterarbeit von Ann-Christin Lenz (UDE) geliefert.

Sequenziertiefe: Eine Rarefaction-Analyse zeigt, dass mit einer Ausnahme (Prossen 2015) alle Proben ab einer Sequenziertiefe von 100 000 reads gesättigt waren (**Abbildung Anhang 14**).

**Abbildung Anhang 14: Sättigungsanalyse der 16S-Metabarcoding-Daten aus allen Schwebstoffproben zur Bestimmung der nötigen Sequenziertiefe**

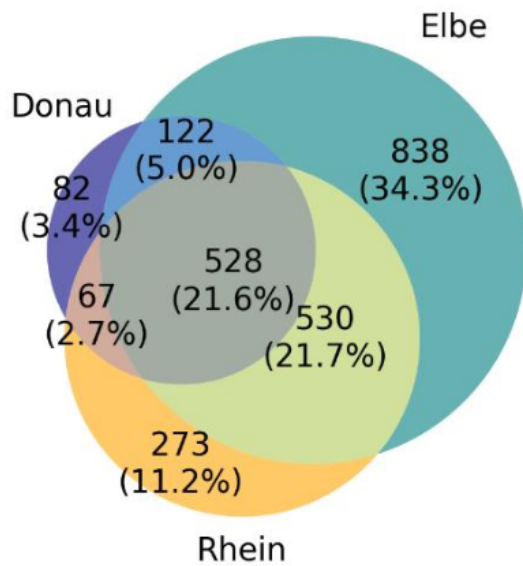
---



Auf der Y-Achse sind bakterielle OTUs (3% Ähnlichkeit) dargestellt, auf der X-Achse die Sequenziertiefe. Quelle: eigene Darstellung, UDE.

Die Vergleiche der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diversität zeigten einen substanzielle Überlapp von 528 OTUs (21,6%) über alle Probestellen der Einzugsgebiete hinweg (**Abbildung Anhang 15**). Die Donau wies den geringsten Teil einzigartiger OTUs auf (n=82), während diese Anzahl in der Elbe sehr hoch war (n=838). Die Lebensgemeinschaften wiesen zwischen den Flüssen und Probestellen meist deutliche Unterschiede auf, die räumlich viel stärker ausgeprägt waren als zeitliche Änderungen (**Abbildung Anhang 16**).

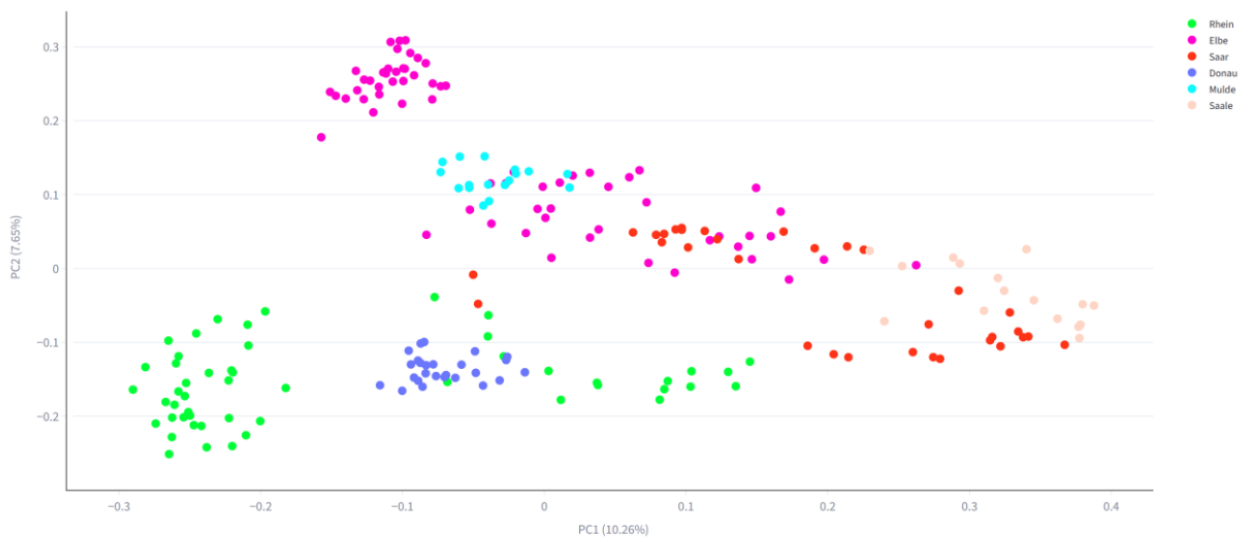
**Abbildung Anhang 15: Ähnlichkeit der bakteriellen Lebensgemeinschaften innerhalb und zwischen den Flüssen**



Basierend auf 16S-OTU-Daten. Quelle: eigene Darstellung, UDE.

**Abbildung Anhang 16: Ähnlichkeit der bakteriellen Lebensgemeinschaften innerhalb und zwischen den Flüssen**

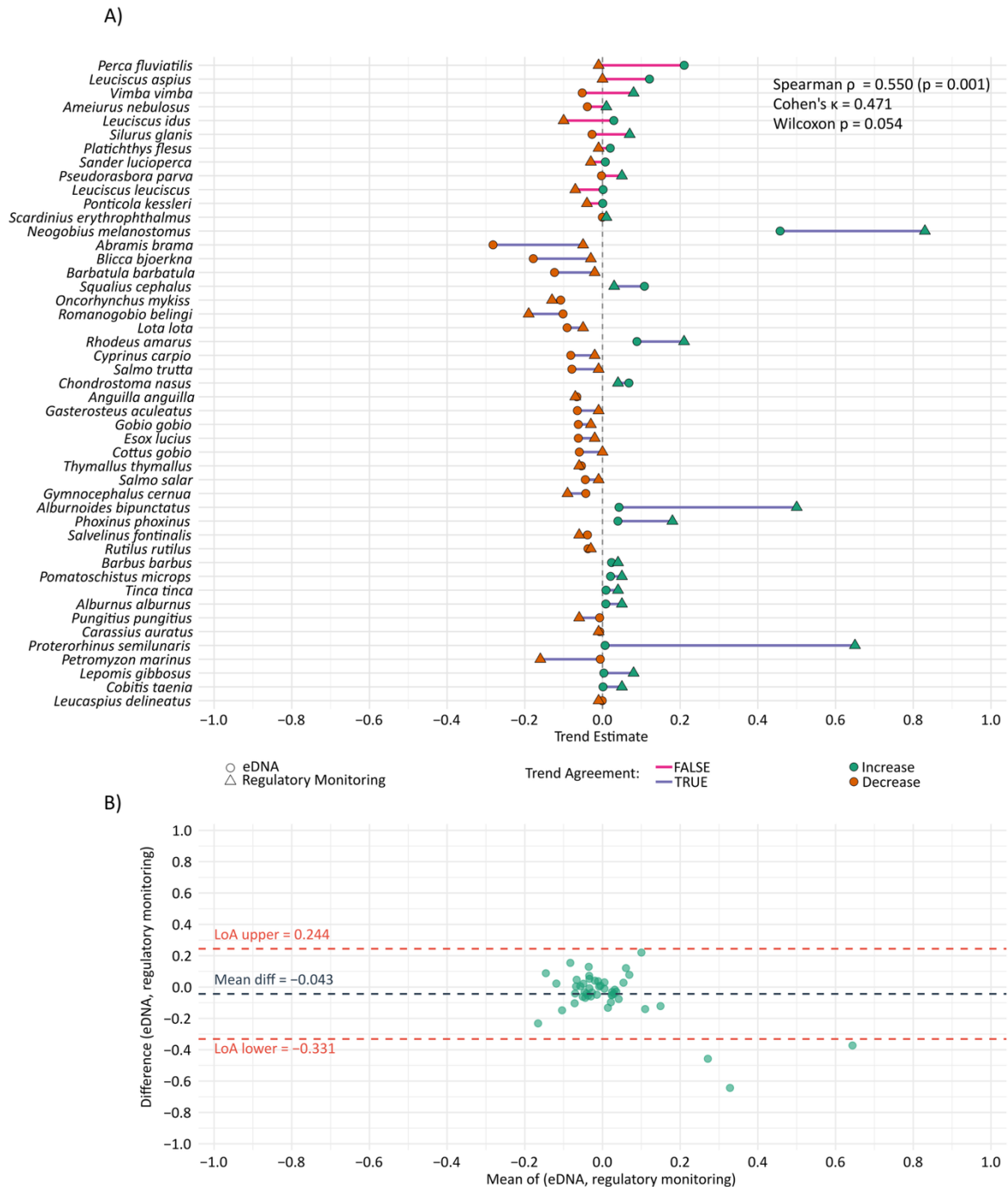
Fluss: ANOSIM R=0.642, p=0.001



Principle-Component-Analyse, dargestellt die ersten zwei Hauptkomponenten (PC1 und PC2). Flusseinzugsgebiete farblich abgegrenzt. Quelle: eigene Darstellung, UDE.

## A.6 Fallstudie 1: Fischdiversität in Deutschland basierend auf den SPM-Proben

Abbildung Anhang 16: Vergleich der Abweichung der mit eDNA-Metabarcoding und klassischen fischereilichen-Methoden erhobenen Daten



Vergleich artspezifischer Zeittrends zwischen eDNA- und behördlichem Monitoring. A) Artspezifische Trendschätzungen aus eDNA-Daten (Kreise) und behördlichem Monitoring (Dreiecke), farbkodiert nach Trendrichtung (orange = Abnahme, grün = Zunahme). Verbindungslinien zeigen die Übereinstimmung zwischen den Methoden (blau = konkordante Trends, rosa = diskordante Trends). B) Bland-Altman-Diagramm zur Darstellung der Übereinstimmung zwischen den Datensätzen. Die mittlere Differenz zwischen den Trendschätzungen aus eDNA und behördlichem Monitoring betrug -0,043 (schwarz gestrichelte Linie), mit 95%-Übereinstimmungsgrenzen von -0,331 bis 0,244 (rot gestrichelte Linien). Quelle: Schütz et al. (2025)

## A.7 Statistische Informationen zur raumzeitlichen Verteilung der Varianz für die OTUs aus Fallstudie 9

**Tabelle Anhang 10: Ergebnisse der molekularen Varianzanalyse (AMOVA) für fünf Beispiel-OTUs bei einem Differenzierungsgrad von 20 %**

|                |                    | Taxon    |                |             |           |             |
|----------------|--------------------|----------|----------------|-------------|-----------|-------------|
|                |                    | 14_Acari | 103_Coleoptera | 240_Diptera | 274_Acari | 568_Diptera |
|                |                    | a        |                |             |           |             |
| Geography      | % Variation among  | 9.68657  | 15.15977       | ---         | 0.83534   | ---         |
|                | % Variation within | 90.3134  | 84.84023       | ---         | 99.16466  | ---         |
|                | $\Phi$ ST          | 0.09687  | 0.15160        | ---         | 0.00835   | ---         |
|                | p-value $\Phi$ ST  | < 0.001  | < 0.001        | ---         | 0.025     | ---         |
| Time (decades) | % Variation among  | 17.7560  | 1.84269        | 18.85262    | 0.06601   | 14.05429    |
|                | % Variation within | 82.2439  | 98.15731       | 81.14738    | 99.93399  | 85.94571    |
|                | $\Phi$ ST          | 0.17756  | 0.01843        | 0.18853     | 0.00066   | 0.14054     |
|                | p-value $\Phi$ ST  | < 0.001  | 0.233          | < 0.001     | 0.928     | < 0.001     |
| Tree           | % Variation among  | 8.04773  | ---            | ---         | ---       | ---         |
|                | % Variation within | 91.9522  | ---            | ---         | ---       | ---         |
|                | $\Phi$ ST          | 0.08048  | ---            | ---         | ---       | ---         |
|                | p-value $\Phi$ ST  | < 0.001  | ---            | ---         | ---       | ---         |

Statistisch signifikante p-Werte sind fett gedruckt. Zur Berechnung des Zeitsignals wurden die Daten aus den Jahren 1990–1999, 2000–2009 und 2010–2018 in drei Jahrzehnte gruppiert. Quelle: eigene Darstellung, SGN.

## A.8 Informationen der Öffentlichkeit

### Abbildung Anhang 17: Übersicht über Seite 1 der Druckfahne des TrendDNA-Übersichtsartikels für Biospektrum

#### Biodiversitätswandel

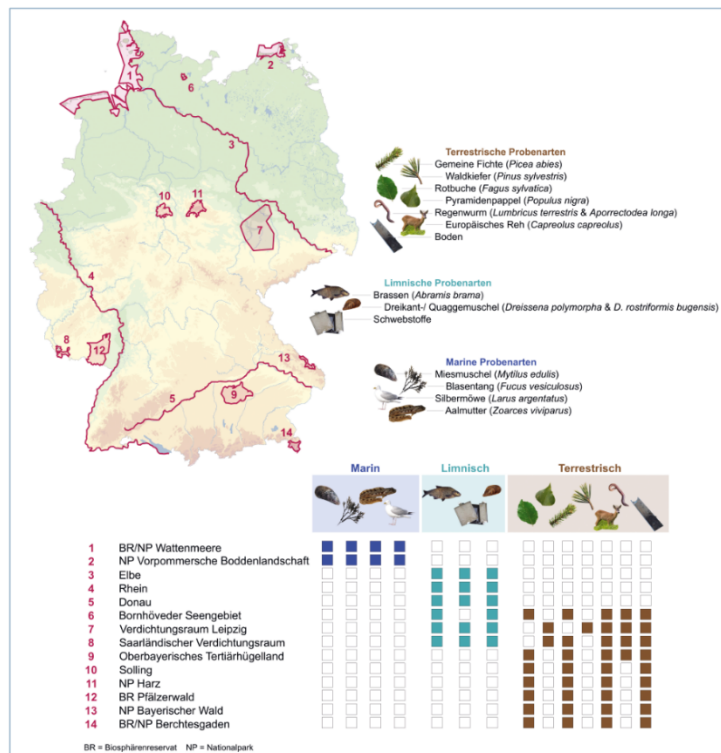
# Die Umweltprobenbank – eine Schatzkammer für die Biodiversitätsforschung

JULIAN HANS\*, ISABELLE JUNK\*, MANUEL STOTHUT, LINA FRANK, ROBIN SCHÜTZ, MARIE BRASSEUR & NICO FUHRMANN

\*DIESE AUTOREN HABEN GLEICHERMASSEN ZU DIESER ARBEIT BEIGETRAGEN.

**The German Environmental Specimen Bank is a pollution monitoring program for the systematic collection and archiving of environmental samples from sites across Germany since the 1980s. The storage at temperatures below -130 °C preserves the sample's initial state and the integrity of all molecules for the long term. The TrendDNA project uses cutting-edge molecular methods that allow using these archived samples for pressing research questions about biodiversity under global change.**

DOI: 10.1007/s12268-026-2746-3  
© The Author(s) 2026



▲ Abb. 1: Die Umweltprobenbank des Bundes mit Probenahmegebieten und dort beprobten Arten.

■ Vor nahezu fünf Jahrzehnten begann eine Gruppe von Wissenschaftler:innen im Auftrag des Umweltbundesamts Konzepte zur systematischen Sammlung und Lagerung von Proben aus der Umwelt bei kryogenen (= extrem niedrigen) Temperaturen zu entwickeln, um diese in ihrem ursprünglichen Zustand langfristig zu konservieren. Dabei stand folgende Fragestellung im Vordergrund: Wie können Umweltproben so gesammelt und archiviert werden, dass sie künftigen Generationen unverändert als wissenschaftliche Ressource zur Verfügung stehen, um Umweltveränderungen – auch rückwirkend – untersuchen zu können? Die auf dieser Idee begründete Umweltprobenbank des Bundes [1] war eine Wette auf die Zukunft der Forschung. Während die Messung von Schadstoffkonzentrationen in den Proben zur Abbildung des Belastungszustands der Umwelt von Beginn an Teil des Routineprogramms der Umweltprobenbank ist, wurde in den letzten Jahren zunehmend das Potenzial des Probenarchivs für die Biodiversitätsforschung erkannt. Die frühe Vision des Archivs erweist sich insbesondere angesichts der globalen Biodiversitätskrise als besonders vorausschauend, da die Proben heute auch wertvolle Einblicke in langfristige ökologische Veränderungen ermöglichen [2].

Die Umweltprobenbank zählt zu den wenigen biologischen Archiven, die die Untersuchung von langen, standardisierten Zeitreihen ermöglichen. Seit über 30 Jahren werden deutschlandweit Human-, Schwebstoff-, Boden-, Tier- und Pflanzenbeprobungen unter Anwendung hochstandardisierter Verfahren durchgeführt. Marine Ökosysteme werden dabei durch eine Fisch- (*Zoarces viviparus*), eine Muschel- (*Mytilus edulis*), eine Braunalgen- (*Fucus vesiculosus*) und eine Möwenart (*Larus argentatus*) repräsentiert. Limnische Ökosysteme werden durch Schwebstoffe, eine Fisch- (*Abramis brama*) und zwei Süßwassermuschelarten (*Dreissena polymorpha*, *D. rostriformis bugensis*) abgebildet, während in terrestrischen Systemen vier Baum- (*Fagus sylvatica*, *Populus nigra*, *Picea abies*, *Pinus sylvestris*), zwei Regenwurmart