



# DNA-METABARCODING DES ZOOPLANKTONS

## EINSATZ MODERNER MOLEKULARBIOLOGISCHER MONITORINGMETHODEN IM BODENSEE

**Dem Monitoring kommt eine grosse Bedeutung in der Erkennung von Veränderungen zu und liefert die Grundlage für ein effektives Management seitens der Wasserwirtschaft. Das Institut für Seenforschung (ISF) der Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg (LUBW) koordiniert das Monitoring der Gewässerqualität des Bodensees im Rahmen der Internationalen Gewässerschutzkommission für den Bodensee (IGKB). Ziel der vorliegenden Studie war es, ein Metabarcoding-Protokoll zum Monitoring des Zooplanktons des Bodensees zu entwickeln, um das gemeinsame Monitoring der Bodenseeanrainerstaaten durch moderne molekularbiologische Methoden zu ergänzen.**

*Iris Dröscher; Thorsten Rennebarth\*; Bernd Wahl; Frauke Lüddecke; Petra Teiber-Siessegger  
Institut für Seenforschung (ISF) der Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg (LUBW)*

### RÉSUMÉ

#### MÉTABARCODING DE L'ADN DE LA COMMUNAUTÉ DE ZOOPLANKTON DU LAC DE CONSTANCE

L'objectif consistait à développer un protocole de metabarcoding pour surveiller le zooplancton du lac de Constance afin de compléter la surveillance générale opérée par les pays riverains du lac dans le cadre de la Commission internationale de protection des eaux du lac de Constance avec des méthodes modernes de biologie moléculaire. Afin d'évaluer la pertinence qualitative et quantitative du metabarcoding, (1) des listes d'espèces obtenues par ce procédé ont été comparées avec celles basées sur des critères morphologiques, d'une part, et (2) des fréquences de séquence spécifiques aux taxons avec les biovolumes spécifiques aux espèces, d'autre part. À une exception près pour chaque espèce, toutes les espèces de cladocères et copépodes identifiées au microscope ont également pu être détectées de manière génétique. En raison de la grande diversité génétique des rotifères et de l'inefficacité des amorces universelles, seules 7 des 26 espèces détectées au microscope optique ont aussi pu être détectées par biologie moléculaire. Cependant, le procédé de metabarcoding a permis d'identifier 5 espèces de copépodes et 7 espèces de rotifères supplémentaires. D'une part, les espèces présentant une faible densité de population ne sont, dans certains cas, pas

### EINLEITUNG

Aktuell wird der potenzielle Einsatz molekularbiologischer Verfahren im biologischen Monitoring und in der Bewertung von Oberflächengewässern nach EG-Wasserrahmenrichtlinie untersucht und diskutiert [z. B. 1–3]. Beim Metabarcoding wird DNA aus Proben extrahiert, um bestimmte Genabschnitte (d. h. Marker) mithilfe möglichst universeller Primer zu amplifizieren und über das *Next-Generation-Sequencing* (NGS)-Verfahren zu sequenzieren. Gut geeignete Marker sind in möglichst allen Taxa einer bestimmten taxonomischen Gruppe vorhanden, weisen andererseits aber auch ausreichend artspezifische Bereiche auf, um zwischen Taxa differenzieren zu können. Herkömmliche, auf Sanger-Sequenzierung basierende DNA-Barcoding-Protokolle sind sehr kosten- und arbeitsaufwändig, da jeweils nur ein DNA-Fragment sequenziert wird. Das NGS-Verfahren hingegen ermöglicht die simultane Sequenzierung tausender DNA-Fragmente. Im Allgemeinen lassen sich zwei Metabarcoding-Verfahren unterscheiden. Das eDNA-Metabarcoding zielt dabei auf Umwelt-DNA (d. h. eDNA) ab, also auf genetisches Material, das von Organismen an die Umwelt abgegeben wird (z. B. Faeces, abgestossene Zellen). Während Umweltproben nur

\* Kontakt: [Thorsten.Rennebarth@lubw.bwl.de](mailto:Thorsten.Rennebarth@lubw.bwl.de)

sehr wenig relevante DNA enthalten und diese zudem meist degradiert ist, enthalten Organismenproben DNA von relativ hoher Qualität. Diese Form des Metabarcodings (Bulk-Metabarcoding) eignet sich daher insbesondere, wenn Organismenproben, wie im Falle des Zooplanktons, relativ einfach zu erhalten sind [4]. Zur Evaluation des Bulk-Metabarcoding-Verfahrens hinsichtlich der qualitativen und quantitativen Aussagekraft wurden einerseits (1) die durch das Metabarcoding gewonnenen Artenlisten mit den auf morphologischen Kriterien basierenden Artenlisten und andererseits (2) die taxonspezifischen Sequenzhäufigkeiten mit den artspezifischen Biovolumina (als Proxy der Biomasse) verglichen. Die Ergebnisse werden für die taxonomischen

Gruppen der Cladocera, Copepoda sowie Rotifera separat diskutiert.

### VORGEHENSWEISE

Zwischen November 2019 und November 2020 wurden monatlich an fünf bis sechs ausgewählten Probenahmestellen im Bodensee-Obersee zeitlich simultan jeweils zwei Zooplanktonproben mit zwei Schliessnetzen mit Aufsatzkegel und einer Maschenweite von 55 µm genommen. Die Proben wurden für die lichtmikroskopische Auswertung in Zuckerformol bzw. für das Bulk-Metabarcoding in 96%igem Ethanol fixiert. Bei der lichtmikroskopischen Auswertung des Zooplanktons wurde das taxonspezifische Biovolumen [cm<sup>3</sup>/l] ermittelt.

Für das Bulk-Metabarcoding wurde die DNA aus den Proben extrahiert und die genetischen Marker durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Zur Charakterisierung der Zooplankton-Artengemeinschaft wurden sowohl die mitochondriale *Cytochrom c Oxidase Subunit 1* (COI) als auch die ribosomale *Internal Transcribed Spacer*-Region (ITS1) als Markergen verwendet. Um möglichst viele Taxa zu amplifizieren, wurden degenerierte Primer, d.h. ein Gemisch aus ähnlichen Primer-Sequenzen, verwendet. Als Grundlage wurden die Primerpaare mICOIntF und jgHCO2198 bzw. ITS2 und ITS5 verwendet. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden durch die Firma Eurofins mittels *Next Generation*-Sequenzierung von Amplikons mittels



Fig. 1 Beispiele der Gruppe Cladocera.

a *Bosmina coregonii* gehört zu den Cladoceren und wird im Metabarcoding zuverlässig nachgewiesen.

b Der Wasserfloh *Daphnia galeata* ist ein häufiger Vertreter der Cladocera im Plankton des Bodensees. Die Nachweise über das Metabarcoding und die mikroskopische Analyse verliefen unproblematisch.

c *Diaphanosoma brachyurum* gehört zu den weniger zahlreich vorkommenden Cladoceren. Im vorgestellten Projekt verlief der genetische Nachweis über den COI-Bereich mässig, während der Nachweis über den ITS-Bereich nicht funktionierte.

d *Leptodora kindtii* gehört zu denjenigen Cladoceren, die regelmäßig, aber nur in geringen Individuenzahlen im Bodensee gefunden werden. Im Metabarcoding gelang der Nachweis mit der COI-Region zuverlässig, der Nachweis über die ITS-Region gelang im vorgestellten Projekt nicht.

(©LUBW)

Taxon	Biovolumen [%]	# Reads COI 95%	# Reads COI 98%	# Reads ITS 95%	# Reads ITS 98%	# Proben Mikroskopie	# Proben Metabarcoding	rho	p
<i>Bosmina coregoni</i> / <i>B. longicornis</i>	3,9	2047	2006	2	2	60	63	<b>0,9</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Bosmina longirostris</i>	0,2	47	47	2	2	6	18	0,3	0,039
<i>Bosmina longispina</i>	0,5	0	0	8	8	9	43	0,3	0,035
<i>Bythotrephes longimanus</i>	5,7	492	491	0	0	36	37	<b>0,8</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Chydorus (sphaericus)</i>	0,5	62	63	0	0	1	3	0,0	0,825
<i>Daphnia cucullata</i>	30,3	176	2	363	308	56	63	<b>0,9</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Daphnia galeata</i>	10,6	434	432	1340	1103	42	63	0,4	0,001
<i>Daphnia hyalina</i>	17,2	11721	11680	0	0	45	63	<b>0,5</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Daphnia x krausi</i>	3,2	0	0	0	0	15	0		
<i>Daphnia x obscura</i>	11,1	2574	2554	0	0	58	63	0,3	0,036
<i>Diaphanosoma brachyurum</i>	8,6	8	0	0	0	33	27	<b>0,8</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Diaphanosoma orghidani</i>	0	2	0	0	0	0	1		
<i>Leptodora kindtii</i>	8	168	167	0	0	47	49	<b>0,8</b>	<b>&lt; 0,001</b>

Tab. 1 Ergebnis des Metabarcoding-Verfahrens für die Cladoceren. Blau hervorgehoben sind Taxa, die nur mikroskopisch bestimmt wurden, und rot solche, die nur genetisch erfasst wurden. Für jedes Taxon sind sowohl das über alle Kampagnen gemittelte relative Biovolumen und die über alle Kampagnen gemittelte Anzahl der Reads (d. h. der klassifizierten Sequenzen) für die beiden Markergene bei einer Übereinstimmung von mindestens 95% bzw. 98% mit der Referenzsequenz angegeben. Ausserdem ist für jedes Taxon festgehalten, in wie vielen der insgesamt 63 Proben es durch das lichtmikroskopische bzw. molekularbiologische Verfahren detektiert wurde, sowie das Ergebnis der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen der Anzahl der detektierten Reads (Summe der COI- und ITS-Reads bei Übereinstimmung von mind. 95%) und dem taxonspezifischen Biovolumen ( $N = 63$ ).

Illumina MiSeq Technologie sequenziert. Die DNA-Sequenzen wurden anschliessend mit den in der frei zugänglichen Referenzdatenbank GenBank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) hinterlegten Sequenzen abgeglichen. Neben frei zugänglichen Referenzsequenzen wurden ausserdem eigene Referenzsequenzen verwendet, die durch Sanger-Sequenzierung einiger anhand morphologischer Merkmale identifizierter Individuen (*Daphnia hyalina*, *D. x obscura*, *D. galeata*, *Bosmina longicornis*, *Eudiaptomus gracilis* und *Mesocyclops leukartii*) ermittelt wurden.

## ERGEBNISSE

### GRUPPE CLADOCERA

Mit Ausnahme von *Daphnia x krausi* konnten alle zwölf mikroskopisch bestimmten Cladocerenarten auch molekularbiologisch nachgewiesen werden (Tab. 1, Fig. 1a-d). Für *Daphnia x krausi*, eine relativ seltene Art, fehlen Referenzsequenzen. Setzt man eine Übereinstimmung von mindestens 98% mit der Referenzsequenz voraus, wird *Diaphanosoma brachyurum*, eine relativ häufige Cladocere, nicht klassifiziert. Dies ändert sich, wenn man eine Übereinstimmung von nur 95% voraussetzt. Unter dieser Voraussetzung wurden ausserdem auch einige wenige Sequenzen als *Diaphanosoma orghidani* klassifiziert. *Diaphanosoma orghidani*

ist in Osteuropa, Zentral- und Kleinasien, Irak und im östlichen Nordafrika verbreitet. Es handelt sich daher wahrscheinlich um eine Fehlklassifikation. Es sind aber auch Funde dieser pelagisch lebenden Art aus Hafengebieten und einem Altarm des Rheins in der Nähe von Bonn bekannt [5]. Mit dem COI-Marker konnte eine doppelte Anzahl von Arten ermittelt werden als mit dem ITS-Marker. Dennoch wurde *Bosmina longispina* nur durch das ITS-Metabarcoding erfasst. Im Allgemeinen wurden die einzelnen Arten über das Metabarcoding in mehr Proben nachgewiesen als über die mikroskopische Auswertung alleine. Ausgenommen davon sind die problematischen Arten *Daphnia x krausi* und *Diaphanosoma brachyurum*. Darüber hinaus wurde für einige der Cladoceren-Taxa (d. h. für *Daphnia hyalina*, *Bythotrephes longimanus*, *Diaphanosoma brachyurum*, *Leptodora kindtii*, *Bosmina coregoni/Bosmina longicornis*, *Daphnia cucullata*) eine mittlere bis sehr hohe Korrelation zwischen der Anzahl der Reads und dem taxonspezifischen Biovolumen ermittelt.

### GRUPPE COPEPODA

Mit Ausnahme von *Eudiaptomus graciloides* konnten alle zehn mikroskopisch bestimmten Copepodenarten auch molekularbiologisch nachgewiesen werden (Tab. 2, Fig. 2). *Eudiaptomus graciloides* wurde jedoch nur in einer einzigen Zähl-

probe gefunden, und dies könnte erklären, warum diese seltene Art nicht auch genetisch nachgewiesen wurde. Allerdings wurden über das molekularbiologische Verfahren sechs bzw. neun zusätzliche Arten (bei einer Übereinstimmung mit der Referenzsequenz von mind. 98% bzw. 95%) erfasst. Dabei handelt es sich um *Acanthocyclops robustus*, *A. vernalis*, *A. americanus*, *Cyclops kikuchii*, *Cyclops ochridanus*, *Diaptomus castor*, *Eudiaptomus macruroides*, *Hesperodiaptomus arcticus* und *Megacyclops viridis*. Das Vorkommen von *Acanthocyclops robustus* im Bodensee ist aus dem Langzeitmonitoring bekannt, das von *A. vernalis* und *A. americanus* hingegen nicht. Es handelt sich um kryptische Arten des *Acanthocyclops vernalis*-Artenkomplexes, die anhand klassischer morphologischer Merkmale kaum unterscheidbar sind [6]. Eine Fehlklassifikation ist unwahrscheinlich, da die Arten auch bei Erhöhung des Schwellenwerts für die Sequenzähnlichkeit auf 100% klassifiziert wurden. Dasselbe gilt für *Cyclops kikuchii*. Vormalig als Unterart von der im Bodensee vorkommenden *Cyclops vicinus* geführt, ist *Cyclops kikuchii* unter anderem aus einem künstlichen Weiher (Neuweiher) in der Nähe von Meersburg bekannt [7]. Das Vorkommen von *Megacyclops viridis* im Bodensee ist aus dem Langzeitmonitoring bekannt. *Cyclops ochridanus*, eine genetisch eng mit *C. divergens* verwandte Art, ist hin-

Taxon	Biovolumen [%]	# Reads COI 95%	# Reads COI 98%	# Reads ITS 95%	# Reads ITS 98%	# Proben Mikroskopie	# Proben Metabarcoding	rho	p
<i>Acanthocyclops americanus</i>	0	10	10	65	51	0	43		
<i>Acanthocyclops robustus</i>	0	10	10	0	0	0	17		
<i>Acanthocyclops vernalis</i>	0	118	112	346	18	0	6		
<i>Cyclops abyssorum</i>	16,5	769	120	1301	1299	62	63	<b>0,7</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Cyclops kikuchii</i>	0	0	0	37	38	0	10		
<i>Cyclops ochridanus</i>	0	0	0	1	1	0	2		
<i>Cyclops strenuus</i>	6,3	0	0	20	20	1	4	0	0,797
<i>Cyclops vicinus</i>	2,8	0	0	676	676	4	30	0,4	0,004
<i>Diacyclops (bicuspidatus)</i>	0,3	0	0	12	9	2	11	0,2	0,139
<i>Diaptomus castor</i>	0	0	0	57	0	0	63		
<i>Eucyclops macruroides</i>	0	3	0	0	0	0	1		
<i>Eudiaptomus gracilis</i>	38,8	661	649	0	0	63	63	0,2	0,075
<i>Eudiaptomus graciloides</i>	7,7	0	0	0	0	1	0		
<i>Hesperodiaptomus arcticus</i>	0	0	0	1	0	0	1		
<i>Macrocyclops albidus</i>	3,2	0	0	30	26	1	25	-0,1	0,441
<i>Megacyclops viridis</i>	0	0	0	273	272	0	53		
<i>Mesocyclops leuckarti</i>	18,7	1380	1211	24266	23986	63	63	<b>0,5</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Thermocyclops crassus</i>	1,8	30	29	78	31	2	62	0,1	0,672
<i>Thermocyclops oithonoides</i>	4,0	7828	7480	2952	2756	37	61	<b>0,8</b>	<b>&lt; 0,001</b>

Tab. 2 Ergebnis des Metabarcoding-Verfahrens für die Copepoden. Blau hervorgehoben sind Taxa, die nur mikroskopisch bestimmt wurden, und rot solche, die nur genetisch erfasst wurden. Für jedes Taxon sind sowohl das über alle Kampagnen gemittelte relative Biovolumen und die über alle Kampagnen gemittelte Anzahl der Reads (d. h. der klassifizierten Sequenzen) für die beiden Markergene bei einer Übereinstimmung von mindestens 95% bzw. 98% mit der Referenzsequenz angeben. Ausserdem ist für jedes Taxon festgehalten, in wie vielen der insgesamt 63 Proben es durch das lichtmikroskopische bzw. molekularbiologische Verfahren detektiert wurde, sowie das Ergebnis der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen der Anzahl der detektierten Reads (Summe der COI- und ITS-Reads bei Übereinstimmung von mind. 95%) und dem taxonspezifischen Biovolumen ( $N = 63$ ).



Fig. 2 Unter den Copepoda gehört *Cyclops abyssorum* zu den häufigeren Arten im Bodensee. Der Nachweis über das Metabarcoding verlief sowohl bei der Verwendung der COI-Region als auch bei der Verwendung der ITS-Region zuverlässig. (©LUBW)

gegen ein Endemit aus dem Ohridsee [8]. *Diaptomus castor* ist unter anderem aus dem Litzelsee bei Radolfzell/Markelfingen bekannt und bewohnt nahezu

ausschliesslich kleinere Wasseransammlungen, die in der Regel nicht ausdauernd sind [9]. Auch die mitteleuropäische Art *Eudiaptomus macruroides* tritt bevorzugt

in perennierenden Kleingewässern, in Teichen aber auch im Litoral grösserer Seen auf [10]. *Hesperodiaptomus arcticus* bewohnt alpine Seen Nordamerikas [11]. Es handelt sich bei diesen Taxa daher mit grosser Wahrscheinlichkeit um Fehlklassifikationen. Im Gegensatz zu den Cladoceren konnte hier mit dem ITS-Marker eine höhere Anzahl von Arten erfasst werden als mit dem COI-Marker. Dennoch wurden *Acanthocyclops robustus* und *Eudiaptomus gracilis* nur durch das COI-, aber nicht durch das ITS-Metabarcoding erfasst. Auch bei den Copepoden wurden die einzelnen Arten über das Metabarcoding im Allgemeinen in mehr Proben nachgewiesen als über die mikroskopische Auswertung allein. Nur für wenige der Copepoden konnte eine mittlere bis hohe Korrelation (*Mesocyclops leuckarti*, *Cyclops abyssorum*, *Thermocyclops oithonoides*) zwischen der Anzahl der Reads und dem taxonspezifischen Biovolumen ermittelt werden.

#### GRUPPE ROTIFERA

Bezüglich der Rotiferen konnten von 26 lichtmikroskopisch bestimmten Arten

Taxon	Biovolumen [%]	# Reads COI 95%	# Reads COI 98%	# Reads ITS 95%	# Reads ITS 98%	# Proben Mikroskopie	# Proben Metabarcoding	rho	p
<i>Ascomorpha ecaudis</i>		3	0	0	0	0	1		
<i>Ascomorpha ovalis</i>	0,5	0	0	0	0	41	0		
<i>Asplanchna priodonta</i>	48,9	0	0	0	0	45	0		
<i>Bdelloidea</i>	0,1	0	0	0	0	3	0		
<i>Brachionus angularis</i>	0,1	0	0	0	0	1	0		
<i>Brachionus calyciflorus</i>		0	0	3	0	0	1		
<i>Brachionus quadridentatus</i>		24	20	0	0	0	1		
<i>Collotheca</i>	0,1	0	0	0	0	50	0		
<i>Colurella adriatica</i>		1	0	0	0	0	7		
<i>Conochilus hippocrepis</i>	0,0	0	0	0	0	1	0		
<i>Conochilus natans</i>	0,5	0	0	0	0	4	0		
<i>Conochilus unicornis</i>	0,1	0	0	0	0	34	0		
<i>Euchlanis dilatata</i>		0	0	10	10	0	2		
<i>Filinia terminalis</i>	0,1	0	0	0	0	8	0		
<i>Gastropus stylifer</i>	0,8	0	0	0	0	55	0		
<i>Kellicottia longispina</i>	0,3	828	806	0	0	59	61	<b>0,8</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Keratella cochlearis</i>	0,5	6802	5143	1080	871	63	63	<b>0,9</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Keratella hiemalis</i>	0,4	0	0	0	0	26	0		
<i>Keratella quadrata</i>	0,3	1420	3	11	11	42	58	<b>0,7</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Keratella ticinensis</i>	0,0	0	0	0	0	1	0		
<i>Keratella valga</i>		0	0	3	3	0	8		
<i>Lecane bulla</i>		4	4	2	2	0	2		
<i>Lepadella rhomboides</i>		1	0	0	0	0	1		
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	3,6	7683	7654	326	322	49	63	<b>0,5</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Polyarthra major</i>	1,6	0	0	0	0	29	0		
<i>Polyarthra remata</i>	0,1	0	0	0	0	31	0		
<i>Polyarthra vulgaris</i>	8,4	1	0	0	0	59	1	0	0,744
<i>Pompholyx sulcata</i>	0,1	0	0	0	0	36	0		
<i>Synchaeta</i>	11,4	258	254	0	0	51	38	<b>0,6</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Synchaeta pectinata</i>	11,2	2	2	2865	2862	58	62	<b>0,6</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Trichocerca</i>	5,1	0	0	0	0	2	0		
<i>Trichocerca porcellus</i>	0,2	0	0	0	0	6	0		
<i>Trichocerca rousseleti</i>	0,0	0	0	0	0	1	0		
<i>Trichocerca similis</i>	5,7	0	0	0	0	3	0		

Tab. 3 Ergebnis des Metabarcoding-Verfahrens für die Rotiferen. Blau hervorgehoben sind Taxa, die nur mikroskopisch bestimmt wurden, und rot solche, die nur genetisch erfasst wurden. Für jedes Taxon sind sowohl das über alle Kampagnen gemittelte relative Biovolumen und die über alle Kampagnen gemittelte Anzahl der Reads (d. h. der klassifizierten Sequenzen) für die beiden Markergene bei einer Übereinstimmung von mindestens 95% bzw. 98% mit der Referenzsequenz angegeben. Ausserdem ist für jedes Taxon festgehalten, in wie vielen der insgesamt 63 Proben es durch das lichtmikroskopische bzw. molekularbiologische Verfahren detektiert wurde, sowie das Ergebnis der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen der Anzahl der detektierten Reads (Summe der COI- und ITS-Reads bei Übereinstimmung von mind. 95%) und dem taxonspezifischen Biovolumen ( $N = 63$ ).

nur sieben Taxa auch molekularbiologisch nachgewiesen werden (Tab. 3, Fig. 3a und b). Mittels Metabarcoding wurden jedoch acht zusätzliche Arten (*Ascomorpha ecaudis*, *Brachionus calyciflorus*, *Brachionus quadridentatus*, *Colurella dilatata*, *Euchlanis dilatata*, *Keratella valga*, *Lecane bulla* und *Lepadella rhomboides*) erfasst, die lichtmikroskopisch nicht bestimmt wurden. Bei *Keratella valga*, eine Art, die aus Gewässern mit acidem Charakter be-

kannt ist [12], handelt es sich mit einer hohen Wahrscheinlichkeit um eine Fehlklassifikation. Die übrigen Arten sind jedoch aus dem Bodensee bekannt. Da sie nur in einer Minderzahl der untersuchten Proben detektiert wurden, handelt es sich um relativ seltene Arten, die wahrscheinlich aus diesem Grund nicht lichtmikroskopisch nachgewiesen wurden. Die 19 Arten, die nur lichtmikroskopisch, aber nicht genetisch erfasst wurden, sind hin-

gegen mit wenigen Ausnahmen durchaus häufige bis sehr häufige Arten. Rotiferen zeichnen sich durch eine hohe genetische Vielfalt aus und sind aufgrund der Ineffizienz universeller Primer nur schwer zu sequenzieren [13]. Die Arten, die sowohl lichtmikroskopisch als auch über das Metabarcoding erfasst wurden, wurden durch das molekularbiologische Verfahren, mit Ausnahme von *Polyarthra vulgaris*, allerdings gut repräsentiert. Das

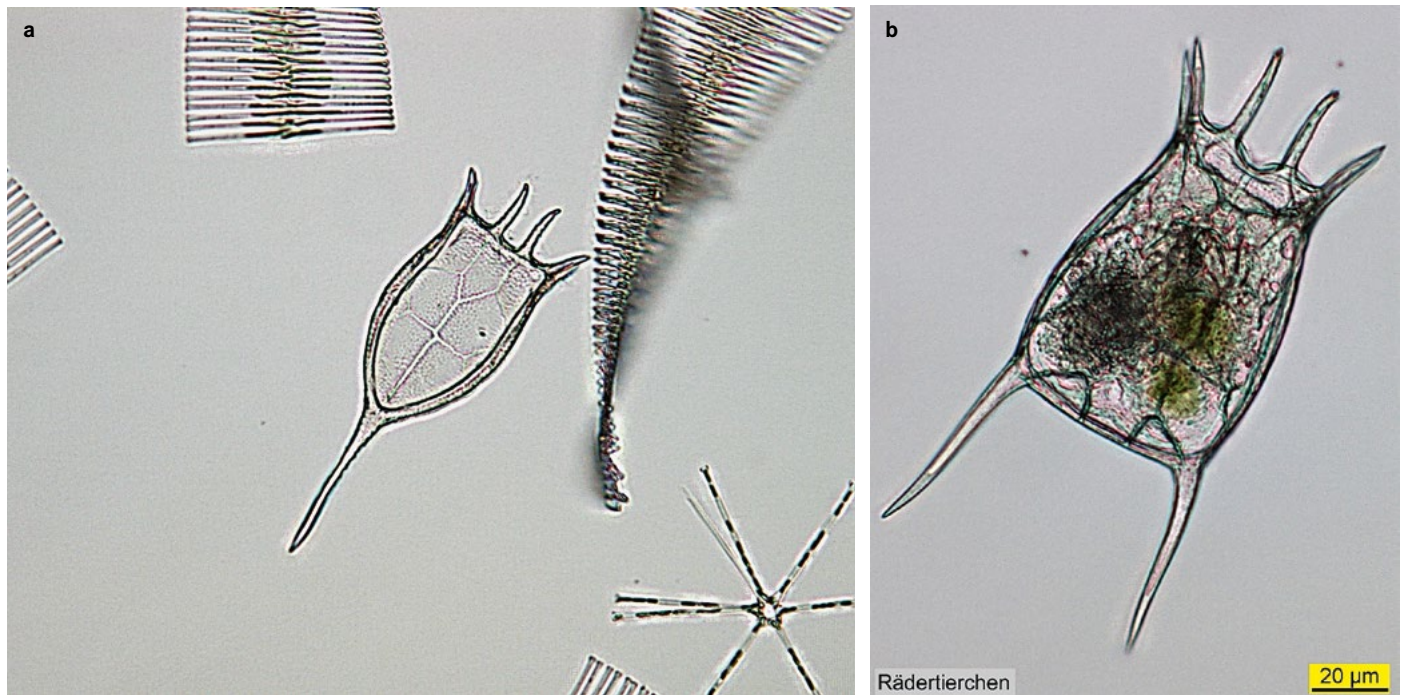


Fig. 3 Beispiele der Gruppe Rotifera.

a Rädertiere sind genetisch relativ divers und bereiten daher bei der Suche nach geeigneten Primern für das Metabarcoding oft Probleme. Die hier abgebildete *Keratella cochlearis* wurde jedoch sowohl im Metabarcoding als auch in der mikroskopischen Zählung nachgewiesen.

b Mittels Metabarcoding konnte das Rädertier *Keratella quadrata* im Bodensee gut nachgewiesen werden – bei Rädertieren (Rotifera) ist dies jedoch oftmals nicht der Fall. (©LUBW)

heisst, es bestanden keine beträchtlichen Differenzen hinsichtlich der Anzahl der Proben mit nachgewiesenen Funden für die beiden Verfahren. Für diese Arten bestand ausserdem eine mittlere bis sehr hohe Korrelation zwischen dem Biovolumen und der Anzahl der klassifizierten Sequenzen.

## DISKUSSION

Im Allgemeinen wurde über das Metabarcoding die Artengemeinschaft an den einzelnen Probestellen vollständiger erfasst als über die lichtmikroskopische Auswertung. Nachdem Zooplanktonproben standardmässig nicht komplett ausgezählt werden, ist es vorstellbar, dass insbesondere Arten geringer Populationsdichte in den lichtmikroskopischen Teilproben unter Umständen nicht erfasst wurden. Auch war die Differenz der Anzahl der Proben mit nachgewiesenen Funden für die beiden Verfahren bei den Copepoden stärker ausgeprägt als bei den Cladoceren. Das lässt sich einerseits darauf zurückführen, dass Nauplien (d. h. die Entwicklungsstadien der Copepoden) zwar lichtmikroskopisch nicht näher bestimmt werden können, aber über das Metabarcoding sehr wohl ihrer taxonomischen Einheit zugeordnet werden können. An-

dererseits legen Copepoden im Vergleich zu Cladoceren ein grösseres Fluchtverhalten zu Tage [14]. Wird bei der Flucht DNA an die Umwelt abgegeben (z. B. in Form von abgeworfenen Gelehen [15]) und diese in der Probe miterfasst, dann ist denkbar, dass diese Arten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit über das molekularbiologische als das lichtmikroskopische Verfahren erfasst werden. Die Artidentifikation hängt unter anderem aber auch von der Wahl des Markergens ab. Durch die parallele Verwendung zweier Markergene konnte ihre Eignung direkt miteinander verglichen werden. Während über das COI-Metabarcoding mehr Cladoceren erfasst wurden als über das ITS-Metabarcoding, funktionierte das ITS-Metabarcoding mit den Copepoden im Allgemeinen besser als das COI-Metabarcoding. Dennoch bestanden taxonspezifische Unterschiede hinsichtlich der Effizienz der beiden Marker. Das Ergebnis verdeutlicht, dass sich die Artidentifikation durch die Kombination evolutionär unabhängiger Marker erhöhen kann. Auch durch eine weniger strenge Festlegung des Cut-Off-Wertes der Sequenzähnlichkeit konnte die Artengemeinschaft vollständiger erfasst werden bzw. ein robusteres Ergebnis hinsichtlich der Anzahl der klassifizierten Sequenzen erzielt werden (*Daphnia*

*cucullata*, *Diaphanosoma brachyurum*, *Acanthocyclops vernalis*, *Cyclops abyssorum* und *Keratella quadrata*). Aufgrund der unterschiedlichen Eignung von Primern für verschiedene taxonomische Gruppen kann auch die Wahl der Primer die Anzahl der genetisch nachweisbaren Arten in Bulkproben beeinflussen. So scheinen die in dieser Studie gewählten Primer für einen Grossteil der Rotiferen nur bedingt geeignet zu sein. Aufgrund der jüngsten Entwicklung neuer Primerpaare speziell für die Amplifizierung des

## DANKSAGUNG

Diese Studie erhielt Unterstützung durch das Forschungsprojekt «SeeWandel: Leben im Bodensee – gestern, heute und morgen» im Rahmen des Interreg V-Programms «Alpenrhein-Bodensee-Hochrhein (Deutschland/Österreich/Schweiz/Liechtenstein)», welches Mittel aus dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung sowie Fördergelder vom Schweizer Bund und den Kantonen erhält. Es bestand keine aktive Mitwirkung seitens der Geldgeber bei der Entwicklung des Studiendesigns, der Datenerfassung und -analyse, der Entscheidung zur Veröffentlichung oder bei der Erstellung des Manuskriptes.

Markergens COI in Rotiferen [13] kann in Zukunft die Diversität dieser taxonomischen Gruppe mittels molekularbiologischer Verfahren möglicherweise noch besser abgebildet werden. Dies ist von erheblichem Interesse, insbesondere angesichts der hohen Plastizität der morphologischen Merkmale der Rotiferen [16].

## SCHLUSSFOLGERUNG

Die Projektergebnisse heben hervor, dass lichtmikroskopische und molekularbiologische Methoden sich sinnvoll ergänzen können. Lichtmikroskopische Methoden liefern im Gegensatz zum Metabarcoding-Verfahren Informationen zur relativen Häufigkeit der einzelnen Arten sowie zur Alters-, Gröszen- oder Geschlechtsstruktur der Zooplankton-Population. Andererseits können kryptische Arten (z. B. Artenkomplexe) und Larvenstadien (z. B. Nauplii der Copepoden) über das Metabarcoding unterschieden werden. Auch ist es möglich, seltene bzw. schwer fassbare Arten, die mit herkömmlichen mikroskopischen Verfahren übersehen werden können, genetisch zu erfassen. Dennoch müssen die Ergebnisse des Metabarcodings auch kritisch betrachtet werden, um potenzielle Fehlklassifikationen als solche zu erkennen. Auch können falsch-negativ Ergebnisse in Abhängigkeit von den gewählten Markergenen, den verwendeten Primern und der (Un-)Vollständigkeit der Referenzdatenbank nicht ausgeschlossen werden. Das entwickelte Metabarcoding-Protokoll bietet sich insbesondere zur raschen Erfassung der Artenzusammensetzung der Copepoden und Cladoceren an.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Greyer, M. et al. (2018): *Integrative Taxonomie mit DNA-Barcoding – Einsatzmöglichkeiten molekularbiologischer Verfahren zur Ermittlung des ökologischen Zustandes nach EG-Wasserrahmenrichtlinie: Erste Erfahrungen aus der Praxis. Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie. p. 24*
- [2] Pawlowski, J. et al. (2020): *Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen. Bundesamt für Umwelt: Bern. p. 77*
- [3] Schenekar, T.; Schletterer, M.; Weiss, S. (2020):

*eDNA als neues Werkzeug für das Gewässermonitoring – Potenzial und Rahmenbedingungen anhand ausgewählter Anwendungsbeispiele aus Österreich. Österreichische Wasser- und Abfallwirtschaft 72: 155–164*

- [4] van der Loos, L.M.; Nijland, R. (2021): *Biases in bulk: DNA metabarcoding of marine communities and the methodology involved. Molecular Ecology 30: 3270–3288*
- [5] Weiler, W. (1997): *Erstfund von Diaphanosoma orghidani Negrea 1982 (Crustacea: Sidaidae) für Deutschland und ihre Begleitarten. Lauterbornia 32: 73–77*
- [6] Dodson, S.I.; Grishanin, A.; Gross, K.; Wyngaard, G. (2003): *Morphological analysis of some cryptic species in the Acanthocyclops vernalis species complex from North America. Hydrobiologia 500: 131–141*
- [7] Einsle, U. (1994): *Cyclops kikuchii Smirnov, 1932 (Copepoda, Cyclopoida), eine selbständige Art aus süddeutschen Gewässern. Crustaceana 66: 240–246*
- [8] Krajiček, M. et al. (2016): *The genus Cyclops (Copepoda, Cyclopoida) in Europe. Zoologica Scripta 45: 671–682*
- [9] Kiefer, F. (1974): *Beitrag zur Kenntnis der castor-Gruppe der Gattung Diaptomus (sens. restr.) (Crus-*

*tacea, Copepoda). Beiträge zur naturkundlichen Forschung in Südwestdeutschland 33: 209–218*

- [10] Mirabdullayev, I.; Dahms, H. (1999): *Die Cyclopoida (Copepoda, Crustacea) der Stadt Oldenburg und ihrer Umgebung. Drosera 99: 115–124*
- [11] McNaught, A.S. et al. (1999): *Restoration of the food web of an alpine lake following fish stocking. Limnology and Oceanography 44: 127–136*
- [12] Nedbalová, L. et al. (2006): *Biological recovery of the Bohemian Forest lakes from acidification. Biologia 61: S453–S465*
- [13] Zhang, Y. et al. (2021): *A new set of highly efficient primers for COI amplification in rotifers. Mitochondrial DNA Part B Resources 6: 636–640*
- [14] Stich, H.B.; Maier, G.; Hoppe, A. (2010): *Projekt Zooplankton – Probenahme. Bericht des Instituts für Seenforschung. Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg. p. 35*
- [15] Svensson, J.E. (1996): *Clutch detachment in a copepod after capture by a predator. Journal of Plankton Research 18: 1369–1374*
- [16] Gilbert, J.J. (2017): *Non-genetic polymorphisms in rotifers: Environmental and endogenous controls, development, and features for predictable or unpredictable environments. Biological Reviews 92: 964–992*

## > SUITE DU RÉSUMÉ

saisies lors de l'examen au microscope optique, car le décompte des échantillons de zooplancton n'est, par défaut, pas intégral. D'autre part, les nauplius (c.-à-d. les stades de développement des copépodes) ainsi que les espèces cryptiques ne peuvent pas être identifiés plus précisément avec le microscope optique, le metabarcoding permet néanmoins de les attribuer à leur unité taxonomique. En raison de différences spécifiques aux taxons dans l'efficacité des marqueurs utilisés, à savoir la sous-unité du cytochrome c oxydase 1 (COI) et l'espaceur interne transcrit (ITS1), la combinaison des deux marqueurs a permis d'augmenter l'identification des espèces. Même si le metabarcoding ne permet pas de déterminer précisément la fréquence relative des espèces, une corrélation entre le biovolume spécifique aux taxons et le nombre de copies de gènes amplifiés existait pour certains taxons. De manière générale, ce procédé permet une saisie rapide et économique de la composition des espèces de zooplancton, en particulier des cladocères et copépodes. Les résultats obtenus par ce biais doivent cependant être considérés de manière critique, afin de pouvoir identifier comme telles de possibles erreurs de classification (c.-à-d. les faux positifs). Il existe également la possibilité de considérer les faux négatifs comme des sources d'erreur potentielles en fonction des gènes marqueurs choisis, des amorces utilisées et de l'exhaustivité ou incomplétude de la base de données de référence.